

Partie 2



A la recherche des
oscillateurs circadiens

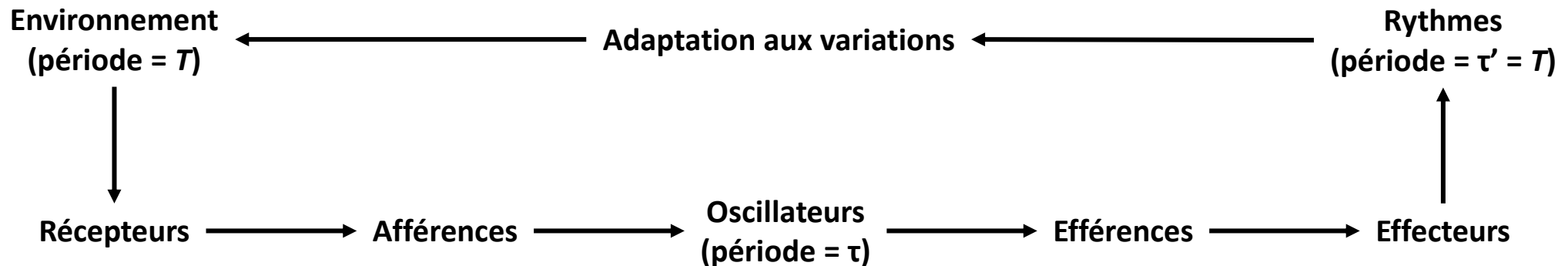
Introduction

Les rythmes biologiques : les EFFETS d'un processus oscillant auto-entretenu

Chaque processus oscillant est relié :

- Au monde extérieur par des **circuits afférents** qui le modifient via des synchroniseurs (*zeitgeber*)
- A des **systèmes effecteurs** auxquels il communique sa périodicité grâce à des **circuits efférents**
 - Exemples de systèmes effecteurs : motoneurones + muscles (activité locomotrice)
chaines nerveuses et neuroendocriniennes (rythmes comportementaux ou endocriniens)

NB : **afférent** = qui rentre dans un organe / **efférent** = qui sort d'un organe



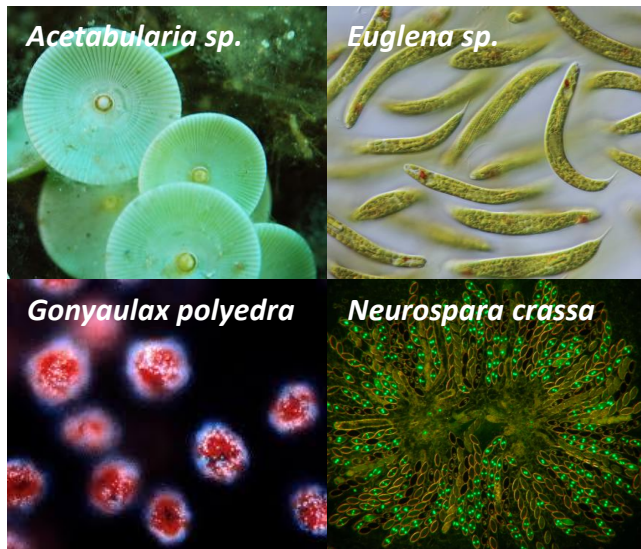
Introduction

Objectifs du chapitre

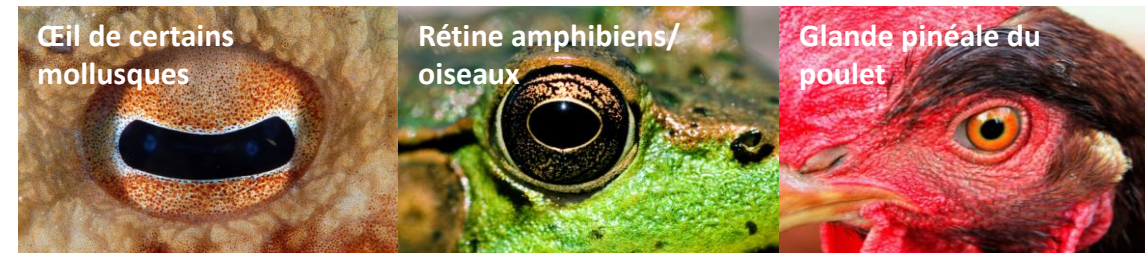
Répondre aux questions suivantes :

- Où et comment sont perçus les stimuli — essentiellement la lumière — qui influencent le système oscillant ?
- Que sait-on des voies qui acheminent ces informations vers le système oscillant ?
- Ce système oscillant est-il unique ou multiple ?
- Est-il identique chez tous les systèmes vivants qui expriment la rythmicité ?

Chez les **unicellulaires** : les éléments du schéma précédent sont tous réunis **au sein d'une même cellule**



Chez les **métazoaires**, les **cellules de certains organes sont des oscillateurs** (assemblage de dizaines/centaines de milliers de cellules oscillantes)



1. Les racines biochimiques de la machinerie circadienne

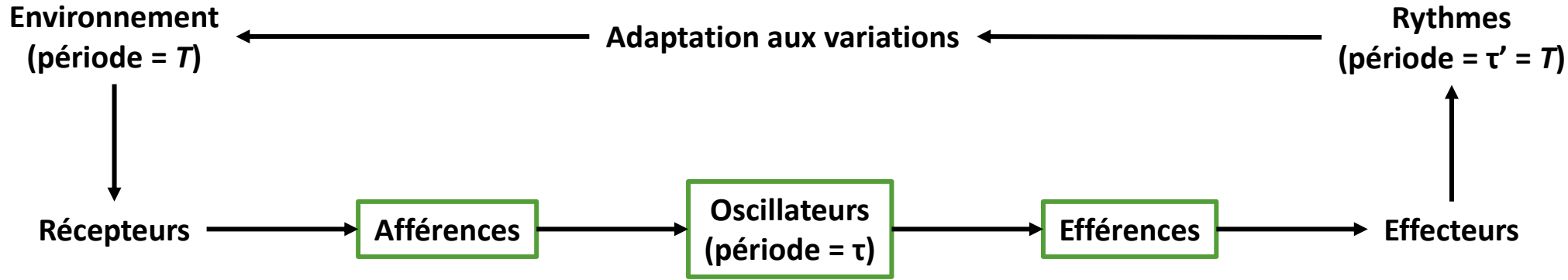
Introduction

Deux voies d'approche pour étudier les bases moléculaires et génétiques des rythmes biologiques :

- l'utilisation de **drogues** dont on connaît le site et le mode d'action ;
- l'utilisation des techniques de la **génétique** et du **génie génétique**

Difficulté principale liée à l'usage des drogues : comment savoir si l'on agit sur l'**horloge** ou sur les **aiguilles de l'horloge** ?

→ Connaissances encore partielles, non du fonctionnement, mais de la nature de l'oscillateur



1. Les racines biochimiques de la machinerie circadienne

Introduction

Deux voies d'approche pour étudier les bases moléculaires et génétiques des rythmes biologiques :

- l'utilisation de **drogues** dont on connaît le site et le mode d'action ;
- l'utilisation des techniques de la **génétique** et du **génie génétique**

Difficulté principale liée à l'usage des drogues : comment savoir si l'on agit sur l'**horloge** ou sur les **aiguilles de l'horloge** ?

→ Connaissances encore partielles, non du fonctionnement, mais de la nature de l'oscillateur

Les expériences mobilisant l'usage de drogues sont analogues à celles faisant varier la luminosité à différents moments du jour ou de la nuit (administration en continu ou par intermittence) → étude de la variation de la **période** et de la **phase du rythme**

Trois niveaux de l'organisation cellulaire étudiés au moyen de drogues :

- le métabolisme énergétique
- la synthèse protéique
- le fonctionnement membranaire

1. Les racines biochimiques de la machinerie circadienne

Les inhibiteurs respiratoires

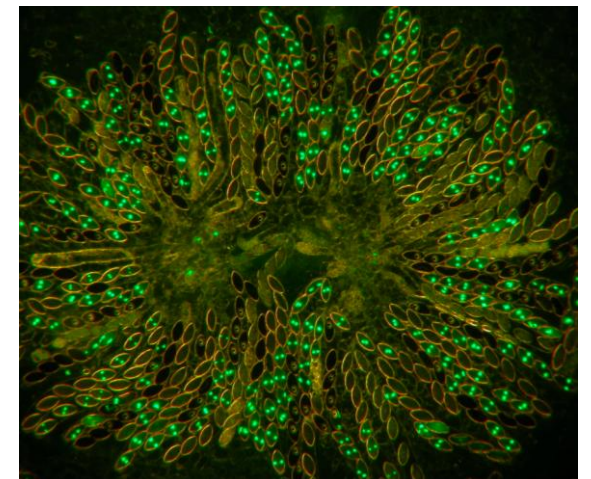
Tous les inhibiteurs (poisons respiratoires) **produisent des avances ou des retards de phase** mais **aucun ne supprime le rythme**.

Exemple : rôle des mitochondries chez *Neurospora crassa*

- Administration d'oligomycine (inhibiteur de l'ATPase) → déphasage (avance ou retard de phase selon l'heure d'administration)
- Augmentation de la quantité de protéines mitochondriales (mutation ou drogue) → accélération du rythme de conidiation (diminution de la période)

Hypothèses :

- **Les mitochondries font partie de l'horloge**
- **OU** elles exercent leurs **effets sur le système oscillant** à travers leur **action dans le métabolisme énergétique**



Neurospora crassa

1. Les racines biochimiques de la machinerie circadienne

Les inhibiteurs de l'expression génique

Les inhibiteurs de la **transcription** : la synthèse d'ARNm à partir d'un gène, nécessaire à la genèse de la rythmicité circadienne ?

Expériences chez une algue unicellulaire, *Acetabularia sp.* :

- Le rythme circadien de la photosynthèse **persiste dans un fragment anucléé**
- Si on greffe dans ce fragment le noyau d'un autre fragment : **l'ensemble adopte le rythme du donneur**
- L'administration d'actinomycine D (inhibiteur de la synthèse de l'ARNm) supprime le rythme dans le fragment anucléé mais pas dans le fragment nucléé → importantes réserves d'ARNm dans ce dernier

Ainsi, la transcription n'est pas essentielle à la genèse du rythme circadien qui est pourtant contrôlée pour le noyau...



Acetabularia sp.

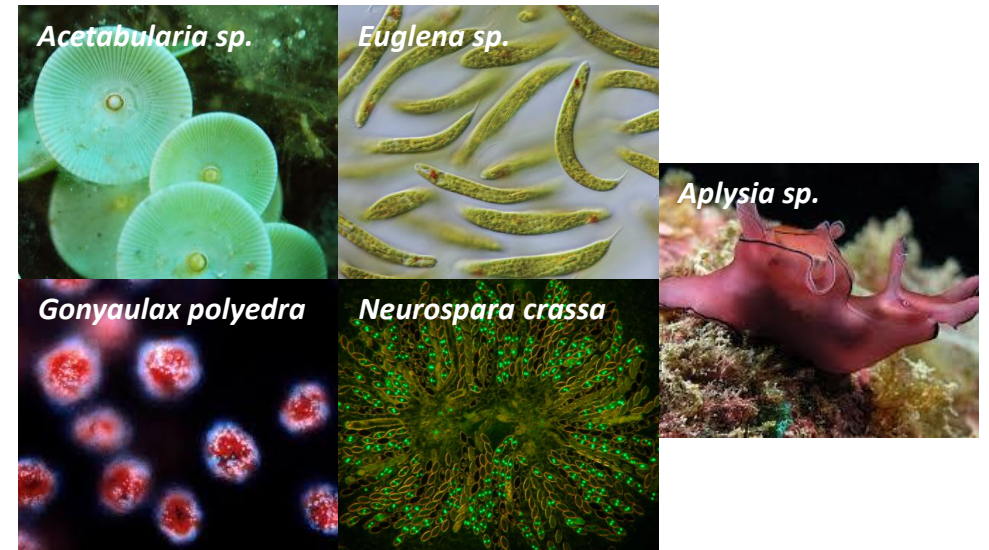
1. Les racines biochimiques de la machinerie circadienne

Les inhibiteurs de l'expression génique

Les inhibiteurs de la **traduction** (synthèse protéique)

→ Action au niveau des ribosomes 80S du cytoplasme (cycloheximine, furomycine)
ou au niveau des ribosomes 70S des organites (chloramphenicol)

Toutes les expériences menées (espèces ci-contre) démontrent que **la synthèse protéique au niveau des ribosomes 80S est essentielle pour l'expression de la rythmicité circadienne**



1. Les racines biochimiques de la machinerie circadienne

Les inhibiteurs de l'expression génique

Les inhibiteurs de la **traduction** (synthèse protéique)

→ Action au niveau des ribosomes 80S du cytoplasme (cycloheximine, furomycine)
ou au niveau des ribosomes 70S des organites (chloramphenicol)

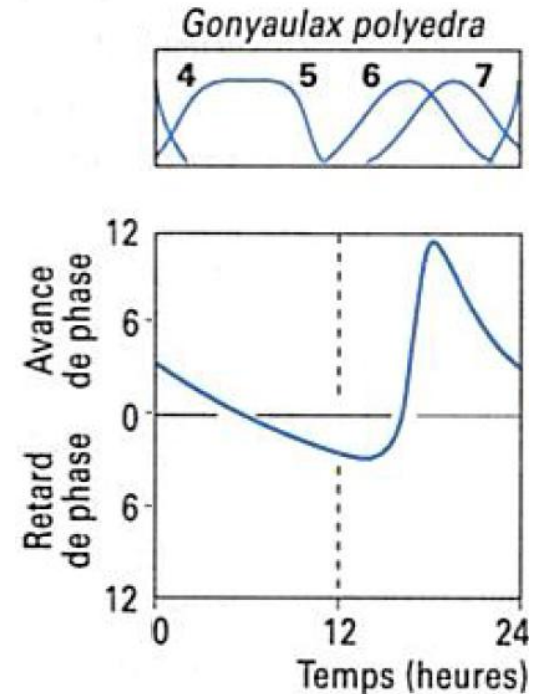
Toutes les expériences menées (espèces ci-contre) démontrent que **la synthèse protéique au niveau des ribosomes 80S est essentielle pour l'expression de la rythmicité circadienne**

Exemple : *Gonyaulax polyedra*



CRP obtenue en étudiant séparément chacun des quatre rythmes du flagellé unicellulaire, Gonyaulax polyedra

4 : division cellulaire
5 : photosynthèse
6 : luminescence
7 : rayonnement



1. Les racines biochimiques de la machinerie circadienne

Les inhibiteurs de l'expression génique

Les inhibiteurs de la **traduction** (synthèse protéique)

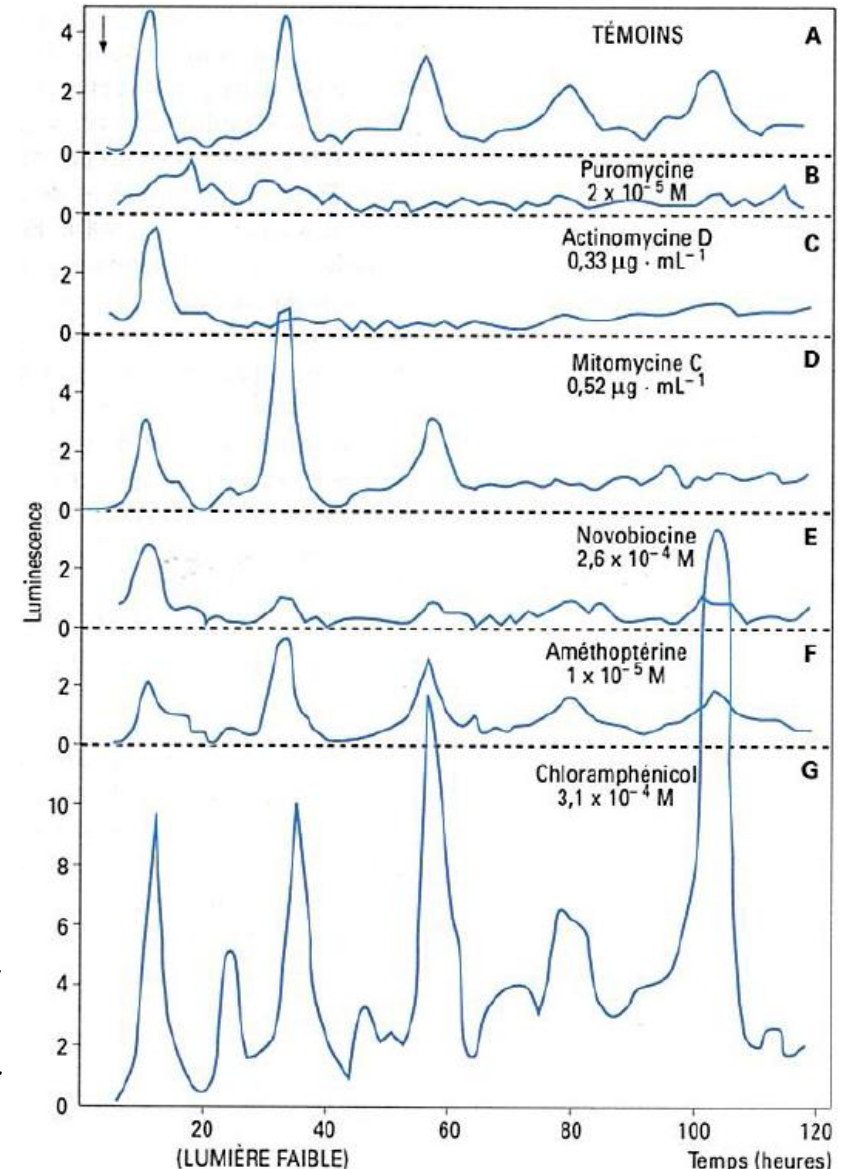
→ Action au niveau des ribosomes 80S du cytoplasme (cycloheximine, furomycine)
ou au niveau des ribosomes 70S des organites (chloramphenicol)

Toutes les expériences menées (espèces ci-contre) démontrent que
**la synthèse protéique au niveau des ribosomes 80S est essentielle
pour l'expression de la rythmicité circadienne**

Exemple : *Gonyaulax polyedra*



*Enregistrement du rythme circadien de
luminescence chez un dinoflagellé
unicellulaire, Gonyaulax polyedra élevé
dans des milieux de culture contenant
différents inhibiteurs de la synthèse
protéique ajoutés au moment indiqué par
la flèche (Karakasian & Hastings, 1963)*



1. Les racines biochimiques de la machinerie circadienne

Les inhibiteurs de l'expression génique

Les inhibiteurs de la **traduction** (synthèse protéique)

- Hypothèse : **les rythmes circadiens seraient dus à un ARNm spécifique à durée de vie longue**, traduit quotidiennement, et dont le produit (protéine) serait incorporé au niveau membranaire de façon circadienne
- Distinction entre ces **protéines rythmiques essentielles** (« *essential clock proteins* ») et les protéines « banales » dont elles contrôleraient rythmiquement la synthèse.

Nombreuses inconnues encore :

- Les protéines rythmiques essentielles sont-elles l'**horloge** ou les **aiguilles de l'horloge** ?
- Plusieurs protéines en jeu ? (certains poisons font disparaître certains rythmes circadiens et pas d'autres)

1. Les racines biochimiques de la machinerie circadienne

Les inhibiteurs de l'expression génique

Les inhibiteurs de la **traduction** (synthèse protéique)

- Hypothèse : **les rythmes circadiens seraient dus à un ARNm spécifique à durée de vie longue**, traduit quotidiennement, et dont le produit (protéine) serait incorporé au niveau membranaire de façon circadienne
- Distinction entre ces **protéines rythmiques essentielles** (« *essential clock proteins* ») et les protéines « banales » dont elles contrôleraient rythmiquement la synthèse.

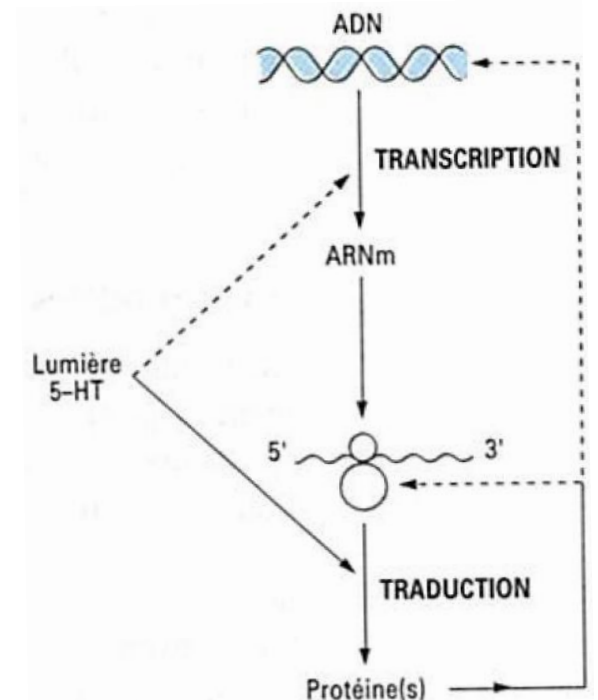
Exemple : *Bulla sp.*

- Oscillateur circadien dans l'œil (cellules neuronales de l'œil)
- L'oscillateur est sensible à la lumière et à la sérotonine
- Rôle essentiel de la traduction, et rôle de la transcription fortement suspecté
- Fréquence du rythme circadien = celle des potentiels d'action au niveau du nerf optique



Bulla sp.

Modèle théorique susceptible d'expliquer la génération du rythme circadien de l'œil du Bulla impliquant la transcription et la traduction. Ce rythme peut être entrainé par la lumière (transcription) ou la sérotonine (5-HT ; traduction)



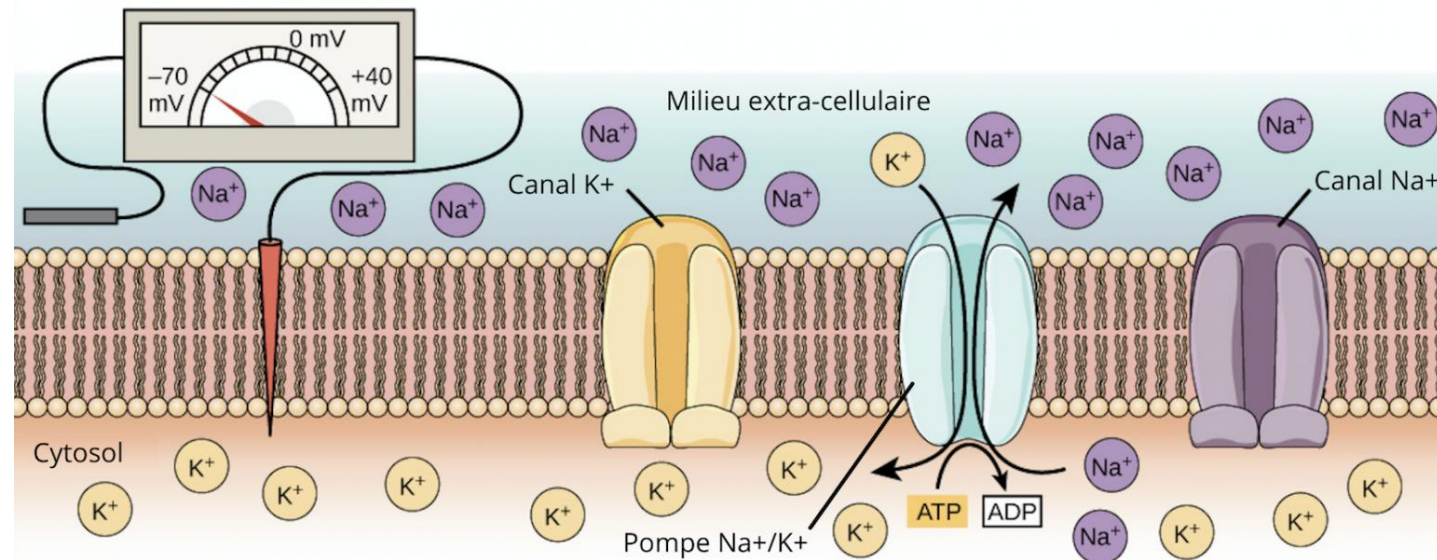
1. Les racines biochimiques de la machinerie circadienne

Le rôle de la membrane plasmique et la traduction du signal

Production de **potentiels d'action rythmiques** : résultante de processus membranaires où interviennent les canaux ioniques et les perméabilités à différents ions

Preuves expérimentales du rôle de la membrane :

- Altération de la composition des membranes en acides gras → modifie la durée de la période et la compensation thermique
- Administration d'alcool → agit sur la structure de la membrane → déphasages
- La perméabilité de la membrane joue un rôle important dans la genèse des rythmes



2. L'approche génétique

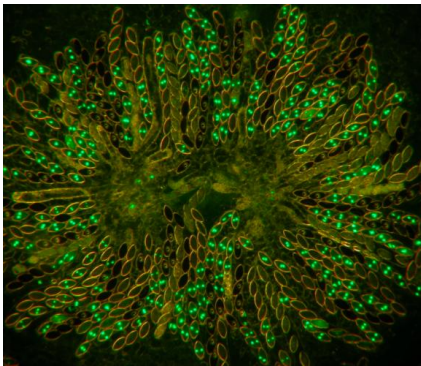
Introduction

Objectif des études : savoir où se trouve localisé le processus qu'on appelle oscillation circadienne.

1971 : première description d'une **mutation** affectant la **valeur de la période du rythme circadien** de l'activité locomotrice et de l'éclosion des pupes chez *Drosophila melanogaster*

Deux approches d'étude (complémentaires) possibles à partir de ces mutants : **analyse phénotypique** ou **analyse des gènes**

Modèles biologiques classiques :



Neurospora crassa



*Drosophila
melanogaster*



*Drosophila
pseudoobscura*



*Chlamydomonas
reinhardtii*

2. L'approche génétique



Drosophila melanogaster

La génétique des rythmes biologiques chez la Drosophile

En 1971, trois mutants sont rapportés chez *D. melanogaster* (Konopka & Benzer, 1971) :

→ 3 mutants : 3 allèles d'un même gène, le **gène *per*** (« *period* »)

- *per^s* (*short period*) : raccourci la période de 24 à 19 h
- *per^l* (*long period*) : allonge la période de 24 à 29 h
- *per⁰* : supprime l'activité rythmique circadienne

Depuis, description d'**autres mutants du gène *per***, par exemple chez *D. melanogaster* :

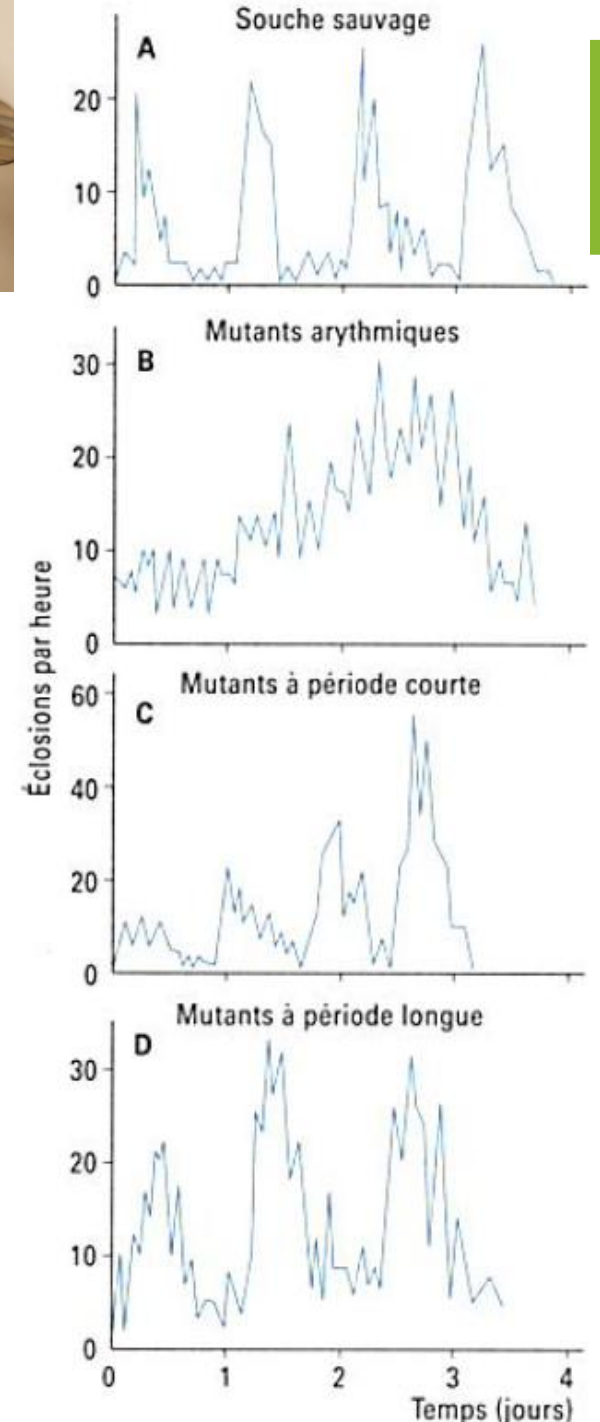
- *per⁰²*, *per⁰³*, *per⁰⁴* : arythmiques
- *per^{l2}* : longue période
- *per^{lv}* : bigarré, qui paraît disparate

Autres gènes :

- ***clk*** (« *clock* ») : raccourcit le rythme
- ***and*** (« *andante* ») : allonge le rythme
- ***disco*** : arythmie totale

NB : **Obtention des mutants** : irradiation ou drogues mutagènes

Rythme d'éclosion de *D. melanogaster* élevée en DD (20°C). **A** : La population normale dite sauvage. **B** : Les mutants *per⁰*. **C** : Les mutants *per^s*. **D** : Les mutants *per^l* (Konopka & Benzer, 1971).



2. L'approche génétique

La génétique des rythmes biologiques chez la *Drosophile*

Localisation chromosomique :

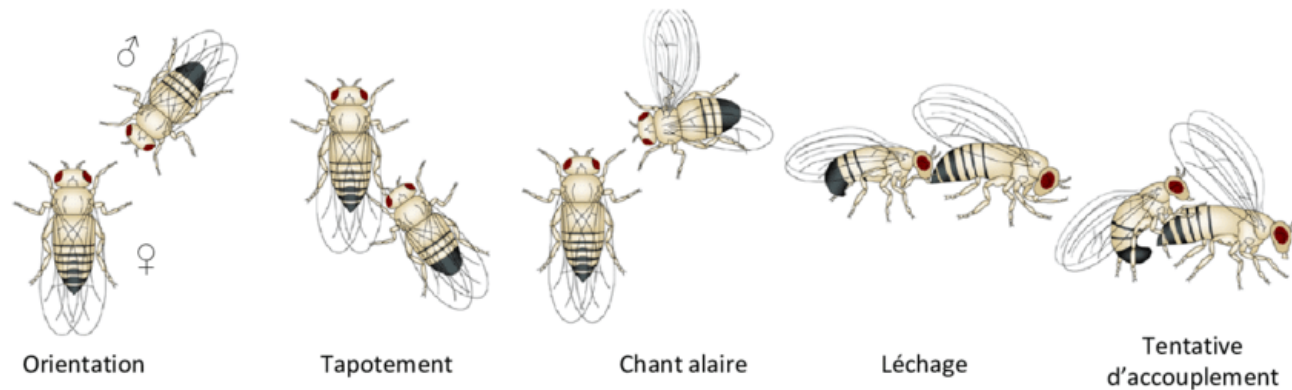
- Chez *D. melanogaster* :
 - *per, clk, and, disco* : chromosome X
 - autres gènes *psi* et *gat* : autosomes
- Chez *D. pseudoobscura* : 5 mutants arythmiques provenant de 2 gènes : chromosome X

2. L'approche génétique

Les modifications phénotypiques résultant de la mutation *per*

La mutation du gène *per* est une **mutation pléiotropique** (= qui affecte plusieurs fonctions) :

- Rythmes circadiens d'éclosion et d'activité locomotrice
- Durée des stades larvaires et de la pupaison allongée (*per^l*) ou raccourcie (*per^s*)
- Rythme circadien du potentiel membranaire des glandes salivaires : disparaît chez *per⁰*
- Rythme comportemental ultradien de chant de parade des mâles (=stridulation des ailes devant la femelle avant l'accouplement)



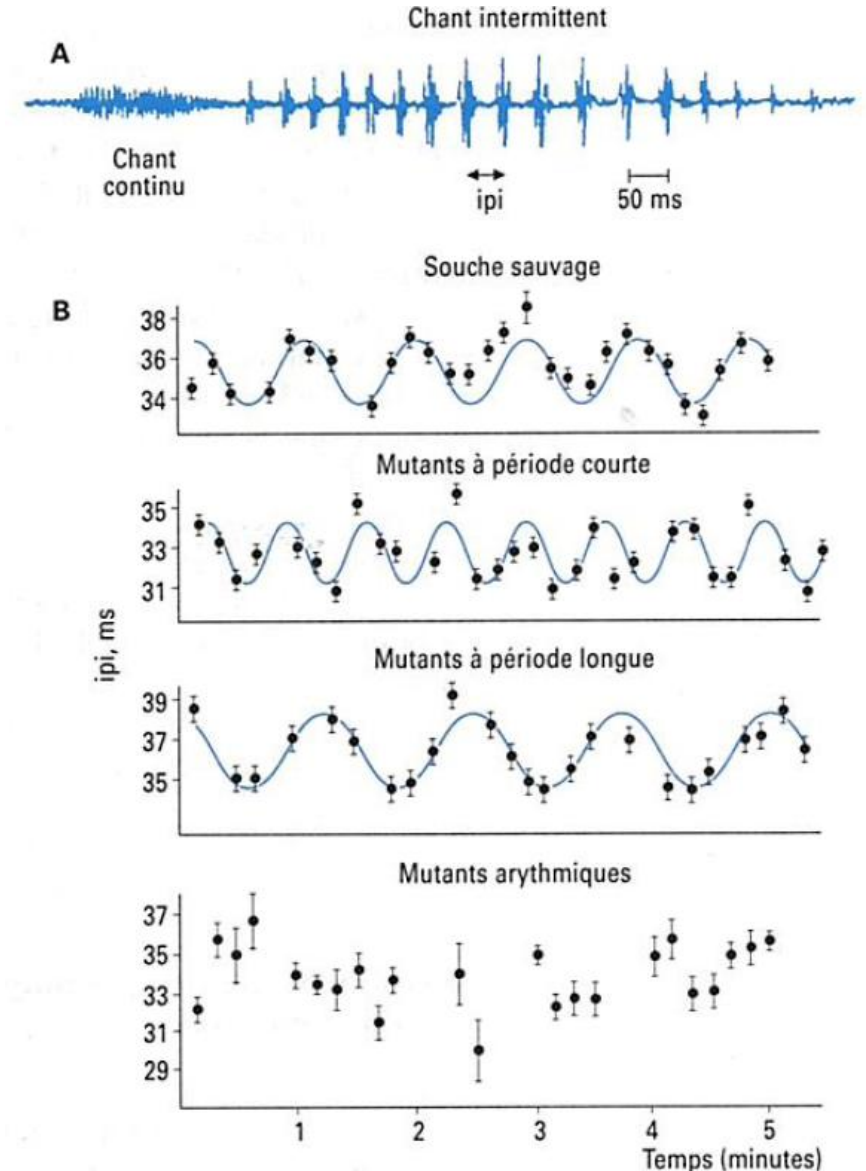
2. L'approche génétique

Les modifications phénotypiques résultant de la mutation *per*

Cas du rythme comportemental ultradien de chant de parade des mâles (=stridulation des ailes devant la femelle avant l'accouplement)

A : Chant de parade d'un mâle de *D. melanogaster*. A noter : à droite, le train de sonorités intermittentes avec l'intervalle entre deux impulsions sonores (*ipi*).

B : La mutation affecte l'intervalle entre deux impulsions sonores. De haut en bas : souche sauvage (période = 56 s), mutants *per^s* (période = 40 s), mutants *per^l* (période = 76 s), mutants *per⁰* (absence de rythme (Kyriacou & Hall, 1980).



2. L'approche génétique

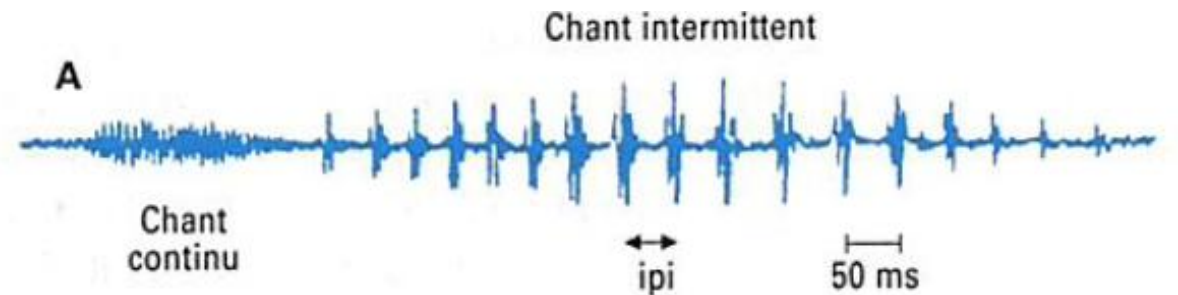
Les modifications phénotypiques résultant de la mutation *per*

Cas du rythme comportemental ultradien de chant de parade des mâles
(=stridulation des ailes devant la femelle avant l'accouplement)

La période des intervalles varie entre les espèces :

- Environ 1 min chez *D. melanogaster*
- Environ 30 sec chez *D. simulans*

→ Le chant nuptial permet la reconnaissance entre mâles et femelles d'une même espèce



Preuve du rôle du gène *per* dans le codage du chant :

- Transfert du gène *per* de *D. simulans* à un mutant *per*⁰¹ de *D. melanogaster*

→ **Restauration d'un chant nuptial** chez le mutant arythmique **identique à celui de *D. simulans***

Rythme ultradien **compensé thermiquement** mais la compensation disparaît aux hautes températures chez les mutants *per*

2. L'approche génétique

Les modifications phénotypiques résultant de la mutation *per*

Effet additif des allèles *per* :

- Période du génotype per^+ / per^+ (sauvage) < période du génotype per^l / per^+ < période du génotype per^l / per^l
- lien avec la production d'ARNm : $per^s > per^+ > per^l$

Localisation anatomique (d'au moins) deux oscillateurs

- Expérience 1 : **greffe d'un cerveau** provenant d'un mutant per^s dans l'abdomen d'un mutant per^{01}
 - Le cerveau greffé confère au receveur l'activité rythmique du donneur
 - Le cerveau contient cet oscillateur
- Expérience 2 : création de **mouches mosaïques gynandromorphes**
 - ½ provient d'un mâle à rythme rapide (de 18 à 19 heures)
 - ½ provient d'une femelle à rythme plus lent (de 21 à 22 heures)



2. L'approche génétique

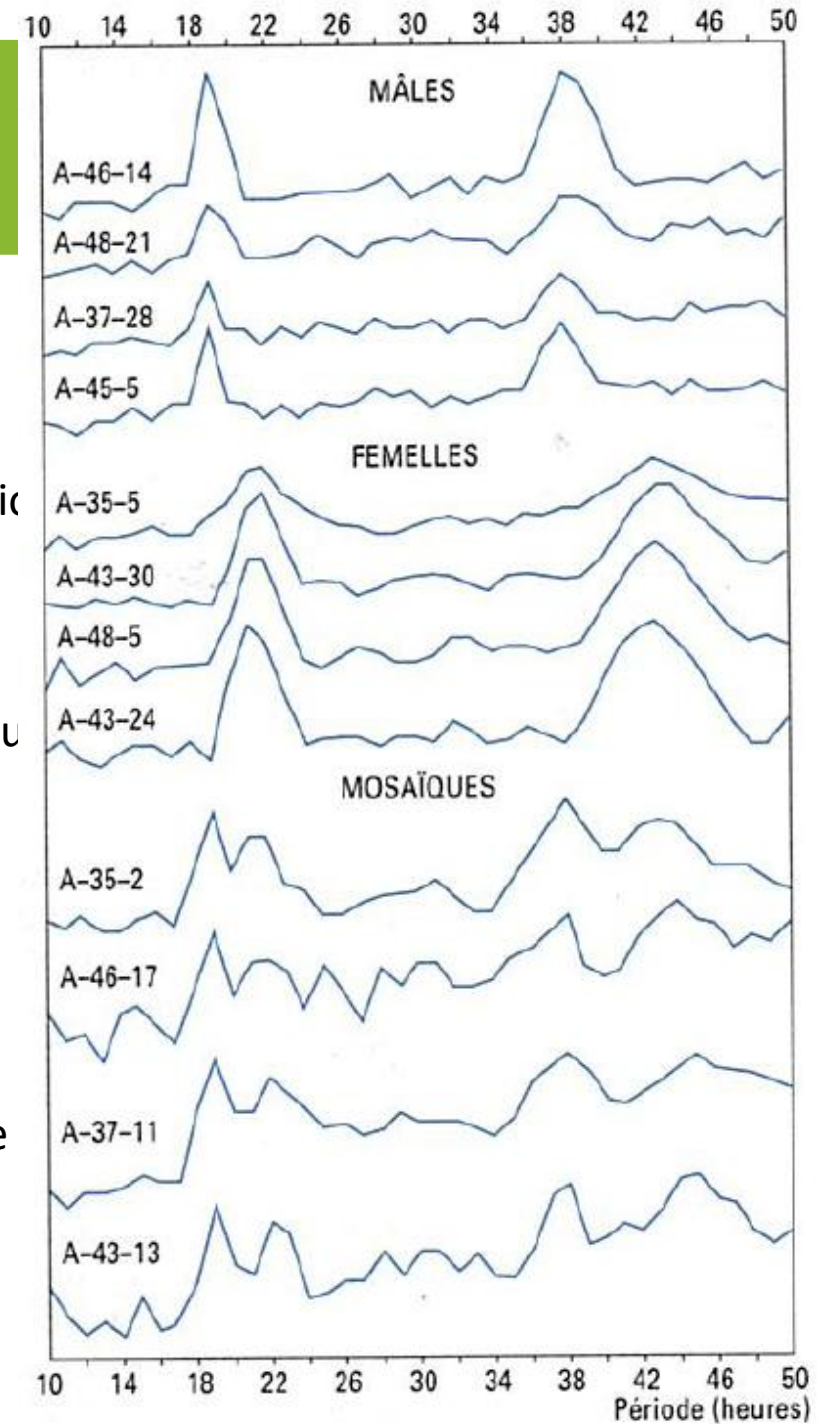
Les modifications phénotypiques résultant de la mutation *per*

Effet additif des allèles *per* :

- Période du génotype per^+ / per^+ (sauvage) < période du génotype per^l / per^+ < période du génotype per^s / per^s
- lien avec la production d'ARNm : $per^s > per^+ > per^l$

Localisation anatomique (d'au moins) deux oscillateurs

- Expérience 1 : **greffe d'un cerveau** provenant d'un mutant per^s dans l'abdomen d'un sauvage
→ Le cerveau greffé confère au receveur l'activité rythmique du donneur
→ Le cerveau contient cet oscillateur
 - Expérience 2 : création de **mouches mosaïques gynandromorphes**
 - ½ provient d'un mâle à rythme rapide (de 18 à 19 heures)
 - ½ provient d'une femelle à rythme plus lent (de 21 à 22 heures)
 - Le **rythme locomoteur de ces mouches mosaïques est bimodal** : une composante rapide à 19 heures et une composante lente à 22 heures
 - Chaque demi-cerveau **est le siège d'un oscillateur indépendant, sans rétroaction de l'un sur l'autre**
- Périodogramme du rythme de l'activité locomotrice de mouches mâles per^s , femelles per^s/per^+ , et de gynandromorphes, mâles et femelles (Konopka et al., 1983)*



2. L'approche génétique

Les modifications phénotypiques résultant de la mutation *per*

Effet additif des allèles *per* :

- Période du génotype per^+ / per^+ (sauvage) < période du génotype per^l / per^+ < période du génotype per^l / per^l
- lien avec la production d'ARNm : $per^s > per^+ > per^l$

Localisation anatomique (d'au moins) deux oscillateurs

- Expérience 1 : **greffe d'un cerveau** provenant d'un mutant per^s dans l'abdomen d'un mutant per^{01}
 - Le cerveau greffé confère au receveur l'activité rythmique du donneur
 - Le cerveau contient cet oscillateur
- Expérience 2 : création de **mouches mosaïques gynandromorphes**
 - ½ provient d'un mâle à rythme rapide (de 18 à 19 heures)
 - ½ provient d'une femelle à rythme plus lent (de 21 à 22 heures)
- Le **rythme locomoteur de ces mouches mosaïques est bimodal** : une composante rapide à 19 heures et une composante lente à 22 heures
- Chaque demi-cerveau **est le siège d'un oscillateur indépendant, sans rétroaction de l'un sur l'autre**

Les neurones seraient les générateurs du rythme

2. L'approche génétique

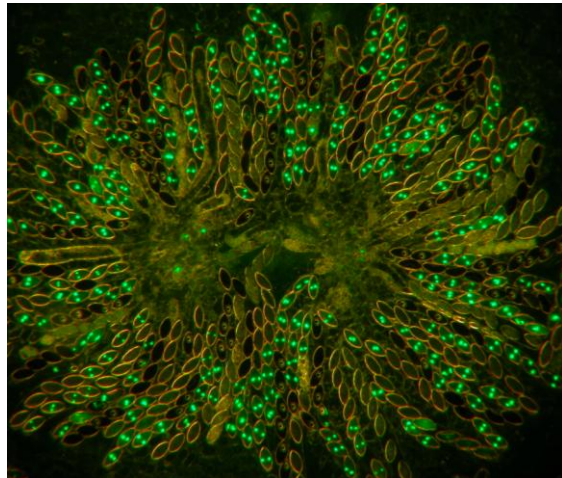
La génétique des rythmes biologiques chez *Neurospora crassa*

Neurospora crassa : en phase asexuée, présente un rythme circadien de conidiation

- 7 loci repérés avec plusieurs allèles
- En particulier, le **gène *frq*** (pour *frequency*) :
possède une **séquence similaire à celle du gène *per*** de *Drosophila*
→ synthèse d'une protéine rythmique très voisine



Neurospora crassa



*Rythme de conidiation
(bandes sombres) chez N.
crassa cultivé en boîtes de
Petri sur un milieu agar.
L'écart entre les bandes
sombres est d'environ 24
heures lorsque la boîte est
placée sous température
constante.*



2. L'approche génétique

Les autres mutants de *period*

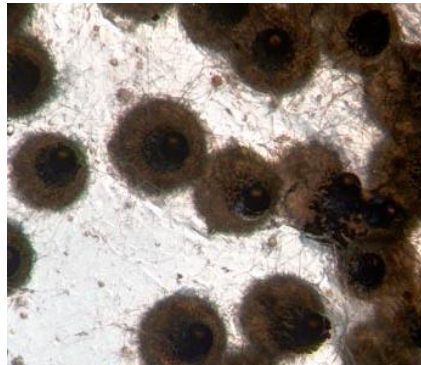
Mise en évidence de mutants affectant les rythmes biologiques chez d'autres organismes dès les années 1980/90 :



*Chlamydomonas
reinhardtii*



Euglena gracilis



Podospora sp.



*Mesocricetus
auratus*



Mus musculus

2. L'approche génétique

Les autres mutants de *period*

Chez les Mammifères, deux protéines impliquées : PERIOD (abrégé en PER) et CRYPTOCHROME (abrégé en CRY)

- Synthèse dans les **noyaux suprachiasmatiques** (zone de l'hypothalamus)
- Synthèse selon un rythme circadien (quantité maximale en début de nuit)
- **Mise à l'heure uniquement par la lumière reçue par les yeux** (cellules ganglionnaires de la rétine ; expression par un pigment photosensible, la **mélanopsine**)
- Les **noyaux suprachiasmatiques** agissent comme une « horloge maitre » asservissant des « oscillateurs esclaves » dans les tissus périphériques (ex. : foie, cœur, reins, peau, rétine).

