

# RYTHMES

<http://www.sf-chronobiologie.org>

## Sommaire

**Éditorial** 33

### Article

J. Menet : L'apport des techniques de biologie moléculaire dans le domaine de la chronobiologie : passé, présent et futur. 37

### Résumés

Séminaire de chronobiologie médicale d'Aussois 48

**Annonces de congrès et conférences** 34, 36, 47, 62

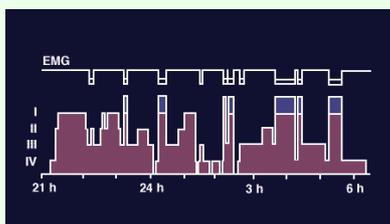
### Rubriques

Mise à jour de l'annuaire électronique 34

Notre site Web 35

Résumé de thèse 63

Chronobiologistes 64



## Éditorial

*Le syndrome de Smith-Magenis, un modèle pour l'étude de l'horloge circadienne chez l'homme.*

Le syndrome de Smith-Magenis se caractérise par des anomalies somatiques, crâniofaciales en particulier, un retard mental de sévérité variable, des troubles du comportement, et des troubles du sommeil, dont le phénotype le plus fréquent est une avance de phase. Ce syndrome est habituellement relié à une délétion interstitielle (3,5MB) du chromosome 17 (p11.2). Cependant, des délétions atypiques (plus petites ou plus importantes) et des mutations du gène RAI1 peuvent être associées à ce syndrome. La quasi-totalité des patients explorés jusqu'alors (sauf un) présentait un profil de 24 h de mélatonine sanguine ou urinaire totalement inversé, associé à des profils de cortisol et de GH normaux. Des études complémentaires ont montré que le rythme de température était normal. Ces résultats hétérogènes concernant les rythmes ouverts semblaient donc exclure une inversion dans le fonctionnement interne de l'horloge circadienne.

Un travail récent de l'université d'Oregon, issu du groupe de Smith et Magenis, en association avec Alfred Lewy, vient de montrer qu'une patiente atteinte de ce syndrome présentait une sécrétion de mélatonine nocturne, inhibée par l'administration de lumière nocturne (2000 lux entre 23:00 et 0:30) et un rythme de cortisol normal. Le trouble du sommeil se caractérise par une insomnie avec absence de sommeil lent profond, mais n'est donc pas associé à une anomalie de sécrétion de mélatonine. La délétion atypique qui est importante (6MB) à proximité du centromère n'est pas associée à une anomalie de la sécrétion de mélatonine.



Le syndrome de Smith-Magenis n'a pas encore livré tous ses secrets et constitue plus que jamais un modèle pour disséquer le fonctionnement de l'horloge circadienne chez l'homme, en relation avec les rythmes de mélatonine et de veille-sommeil.

**Bruno Claustrat**  
Président

## Neuroscience 2009



### Neuroscience 2009 (Oct. 17-21, in Chicago, Ill )

will offer unequalled scientific content in a world class city. Chicago, a hub of science and nightlife, is a welcoming host for the 39th annual meeting of the [Society for Neuroscience](http://www.sfn.org).

Browse the Web site <http://www.sfn.org/am2009/> to learn more and check back frequently for updates.

Contribute to the Neuroscience 2009 scientific program.

[Abstract submission](#) opens April 23 and closes May 14. Last year, SfN received nearly 16,000 abstract submissions.

Each year satellite events occur during SfN's annual meeting. These events are for annual meeting attendees, but are not planned or sponsored by SfN. Learn how to [reserve space for your event](#) in Chicago.

## Vos coordonnées accessibles sur le site de la SFC

M, Mme, Mlle, Prénom, Nom :

Tel:

Fax:

Titres, fonctions :

Courriel :

Adresse :

Mots clefs :



### Pensez à actualiser vos données

**Utilisez ce formulaire pour une première inscription ;**

**Modifiez vos données en ligne si nécessaire (voir page 35).**

Etienne CHALLET, Secrétaire Général de la SFC  
 Laboratoire de Neurobiologie des Rythmes  
 UPR 3212, Université de Strasbourg  
 5 rue Blaise Pascal, 67084 STRASBOURG Cedex  
 Tel: 03.88.45.66.93; Fax: 03.88.45.66.54  
 e-mail: [challet@neurochem.u-strasbg.fr](mailto:challet@neurochem.u-strasbg.fr)

## Visitez régulièrement le site Web de la SFC

Le site de la Société Francophone de Chronobiologie est consultable à l'adresse

<http://www.sf-chronobiologie.org>

Tout comme l'ancien site, il comporte une présentation de la société et de ses activités ainsi qu'un annuaire de ses membres. Chaque membre recevra un courrier avec un nom de login et un mot de passe personnel qui lui donnera un accès personnel pour notamment modifier sa fiche. Le site constitue aussi une riche source d'informations sur la recherche et l'enseignement qui portent sur la chronobiologie, ainsi que sur l'actualité de cette discipline. Je vous laisse explorer le site de manière plus approfondie et compte sur vous tous pour l'alimenter régulièrement et le faire vivre longtemps !

Sophie LUMINEAU

Mercredi 1er Juillet 2009

**SFC** Société Francophone de Chronobiologie  
L'étude des rythmes du monde vivant

Accueil | La SFC | Actualités | Annonces | Bibliographie | Espace membre | Services | Liens |

Accueil | Plan du site | Contact

Membre? > Vous identifier

**Recherche**  
dans tout le site  
> recherche avancée

- A propos de la SFC
- Les activités de la SFC
- Actualités
  - Evénements
  - Actualités diverses
  - Soutenances
- Annonces
- Bibliographie
- Espace membres
- Forums
- L'annuaire des membres
- Description des services
- Liens

[Développer le menu]

**Actualités diverses**

En cours ou à venir (0)

Aucune actualité dans cette rubrique.

Dernièrement (10)

- **A propos de la zone "A la une"...** (Déposé le 17 Novembre 2004)  
*Cette zone correspondra à la zone d'affichage des informations sélectionnées par le webmaster comme devant apparaître sur la page d'accueil...*
- **Souscription privilégiée à Chronobiology International** (Déposé le 05 Avril 2005)
- **CHRONOBIOLOGY INTERNATIONAL : quoi de neuf ?** (Déposé le 10 Février 2006)  
*Annonce du Pr. Yvan TOUITOU, ex-Président de la SFC et co-Editeur-en-Chef de CHRONOBIOLOGY INTERNATIONAL*
- **Affiliation de la SFC à la European Biological Rhythms Society (EBRS)** (Déposé le 15 Février 2006)  
*Tout membre de la SFC devient membre de la EBRS*
- **Devenir membre de la SFC** (Déposé le 27 Mars 2006)  
*Nouveau formulaire d'adhésion*
- **Offre de bourse post-doctorale** (Déposé le 19 Octobre 2006, Strasbourg)  
*Cette bourse s'adresse à des docteurs de nationalité autre que française et n'ayant pas obtenu leur doctorat en France*
- **Prix 2007 "Jeune chercheur, Jeune chercheuse" de la SFC** (Déposé le 08 Mars 2007)  
*Déposez votre dossier de candidature si vous avez moins de 35 ans !*
- **Bourses de voyage pour participer au 39e congrès de la SFC** (Déposé le 08 Mars 2007)  
*Postulez si vous êtes en post-doc à l'étranger !*
- **Dépression saisonnière et chronothérapie** (Déposé le 19 Novembre 2007)  
*Visitez ce site professionnel...*
- **Vous êtes un chronobiologiste en post-doc ? Venez participer en tant que membre de la SFC au prochain congrès de la EBRS grâce à une bourse de voyage** (Déposé le 18 Janvier 2008)  
*Envoyez votre dossier de candidature à une bourse de voyage de la SFC*

- A propos de ce service

La SFC propose différents services sur son site. Découvrez lesquels.

**A la une**

- **Le 11e Congrès de la EBRS se tiendra à Strasbourg du 22 au 28 Août 2009**  
Venez nombreux participer au 11e congrès de la European Biological Rhythms Society (EBRS)
- **Gordon Research Conference on Chronobiology**  
Molecular Mechanisms Of Circadian Clocks

Accueil | Infos légales | Compatibilité  
Copyright © Didier Durand - 2004

### Comment actualiser ses coordonnées sur le site.

Si vous connaissez votre identifiant et votre mot de passe, aller dans **Espace membres** et entrer l'identifiant et votre mot de passe, puis suivre les instructions.

Si vous n'avez pas encore votre identifiant et votre mot de passe, vérifier d'abord que vous êtes bien enregistré dans l'annuaire **Annuaire des membres** et cliquer sur la lettre initiale du nom. Noter le mail sous lequel vous êtes enregistré.

Aller dans **Espace membres** et cliquer sur **Login/Mot de passe oublié?** ; on vous demande alors le mail sous lequel vous êtes enregistré, et vous recevrez alors votre identifiant et votre mot de passe.

# XI. Congress of the European Biological Rhythms Society

August 22-28, 2009  
Strasbourg, France

in association with  
the Japanese Society for Chronobiology

Home

What is EBRS?

What is JSC?

Program

Registration

Call for Papers

Accommodation

Location

Travel  
Information

Fellowships

Sponsors

Social Events

Important Dates

Contact

Links

## Message from the organizers

We are proud to have the opportunity to invite you to Strasbourg in France (August, 22nd –28th, 2009) to participate in the XI Congress of the European Biological Rhythms Society, organized in association with the Japanese Society for Chronobiology. (...)

[> read more](#)

## International Scientific Committee

Paul Pévet, Chairman (Strasbourg, F)  
Shizufumi Ebihara (Nagoya, J)  
Carolina Escobar (Mexico DF, M)  
Russell Foster (Oxford, UK)  
Ken-ichi Honma (Hokkaido, J)  
Andries Kalsbeek (Amsterdam, NL)  
David Kennaway (Adelaide, AU)  
Horst-Werner Korf (Frankfurt/Main, G)  
Hitoshi Okamura (Kobe, J)  
François Rouyer (Gif sur Yvette, F)  
William Schwartz (Worcester, USA)  
Shigenobu Shibata (Tokyo, J)  
Rae Silver (New York, USA)  
Debra Skene (Guildford, UK)  
Jörg H. Stehle (Frankfurt/Main, G)  
Alena Sumova (Praha, Czech Republic)

## Local Organising Committee

Paul Pévet (Chairman)  
Béatrice Bothorel  
Patrice Bourgin  
Etienne Challet  
Marie-Paule Felder-Schmittbuhl  
David Hicks  
Mireille Masson-Pévet  
Valérie Simonneaux

ebrs



Contact: [ebrs2009@neurochem.u-strasbg.fr](mailto:ebrs2009@neurochem.u-strasbg.fr)

<http://ebrs2009.u-strasbg.fr/>

EBRS 2009 • Centre de Neurochimie • 5 rue Blaise Pascal • F-67084 Strasbourg cedex • Tel.: +33(0)3 88 45 66 71



## L'apport des techniques de biologie moléculaire dans le domaine de la chronobiologie : passé, présent et futur.

Jérôme S. Menet

Rosbash lab, Department of Biology, Howard Hughes Medical Institute, National Center for Behavioral Genomics, Brandeis University, 415 South street, Waltham, MA02454, United States of America

Téléphone : 1-781-736-3161, Fax : 1-781-736-3164

Email : [menet@brandeis.edu](mailto:menet@brandeis.edu)

Les sciences de la vie ont ces dernières décennies été marquées par l'incroyable essor de la biologie moléculaire et de la génétique. Que ce soit avec l'apport de nouvelles techniques ou encore le traitement des données avec des outils informatiques de plus en plus puissants, toutes les fonctions du vivant ont été disséquées afin d'en connaître les mécanismes moléculaires. L'étude des rythmes biologiques ne fait pas défaut.

Le but de cette revue est de montrer comment le domaine de la chronobiologie a aujourd'hui changé de visage. De montrer comment en un peu plus d'une décennie les nouvelles techniques moléculaires ont métamorphosé l'étude des rythmes biologiques. Je tiendrai aussi à mettre en avant les limites actuelles et les problèmes rencontrés. Avant de terminer par ma vision (et cela n'engage que moi) des défis qui restent dans le domaine et comment l'apport de la biologie moléculaire pourra contribuer à y répondre.

### 1. L'essor de l'analyse moléculaire des rythmes biologiques

Les premières observations définissant l'existence de rythmes endogènes circadiens datent du 18<sup>ème</sup> Siècle (par Jean-Jacques d'Ortous de Mairan en 1729). Pourtant, deux siècles seront nécessaires pour démontrer chez les plantes que la période circadienne endogène est héritée génétiquement (Bunning, 1935). Ensuite et principalement à partir des années 60, de nombreux articles montrent que plusieurs aspects des rythmes circadiens sont sensibles au fond génétique (voir les références 11 à 18 dans Konopka et Benzer, 1971). Dès le début des années 70, des criblages génétiques sont effectués dans le but d'identifier des gènes dits « horloges », et ceci dans différents règnes (animal avec la drosophile, Konopka et Benzer, 1971 ; végétal chez les algues avec *Clamydomonas reinhaedtii*, Bruce, 1972 ; champignon avec *Neurospora crassa*, Feldman et Hyle,

1973).

Les résultats, et en particulier ceux de Konopka et Benzer, marqueront un premier grand changement dans le monde de la chronobiologie. Ils démontrent en effet que la mutation d'un seul gène chez une espèce animale, la drosophile, peut modifier la période circadienne (longue, courte ou arythmie). Dès lors, ce gène appelé *period* (*per*) sera au centre des recherches de plusieurs équipes lancées dans la course au clonage de ce « gène comportemental ». Plus de 10 ans seront nécessaires pour le clonage et la caractérisation du gène *per* (Jackson et al., 1986; Reddy et al., 1986; Reddy et al., 1984; Shin et al., 1985). L'isolation de mutants circadiens chez les Mammifères s'est avérée être plus longue et commence avec le hamster tau, provenant d'une mutation spontanée (Ralph et Menaker, 1988). Des screens mutagéniques avec le mutagène ENU ont ensuite permis d'identifier chez la souris le gène *Clock* (Vitaterna et al., 1994).

Rapidement, l'amélioration des techniques de clonage et de séquençage (séquençage du génome de la levure en 1996 et de *Escherichia coli* en 1997) ainsi que leurs démocratisations pour la plupart des laboratoires permirent l'identification et le clonage de nombreux gènes dits « horloges » (tableau 1). En deux ans (1997 et 1998), une grande partie des gènes horloges chez la souris et la drosophile furent identifiés et clonés (voir les références citées dans le tableau 1). À ce titre, la génétique et la biologie moléculaire ont permis à la recherche sur les rythmes biologiques d'être nommée 2 fois comme faisant partie des 10 percées scientifiques des années 1997 et 1998 par le magazine *Science* (*Science magazine's 10 breakthroughs of the year*).

L'identification des gènes horloges a rapidement contribué à métamorphoser la recherche dans le

(Suite page 38)



(Suite de la page 37)

domaine des rythmes biologiques. Ils ont tout d'abord apporté la preuve de l'origine moléculaire des rythmes circadiens et montrent l'existence d'une horloge interne. Ensuite, l'étude de leur expression et de leur régulation a abouti à la création d'un modèle expliquant comment des gènes peuvent s'auto-réguler afin de générer des rythmes biologiques de 24h. Ce modèle, basé sur des boucles de rétrocontrôle transcriptionnelles et traductionnelles, a suscité et suscite encore de nombreuses études.

Au-delà de l'étude des boucles de régulation transcriptionnelles et traductionnelles, plusieurs résultats publiés simultanément ont renforcé l'intérêt de l'étude du rôle des gènes horloges. Tout d'abord, de nombreux laboratoires ont montré que l'inactivation de ces gènes horloges provoque des phénotypes circadiens très marqués, allant d'un changement de période à l'arythmie (voir les références citées dans

ralement plusieurs gènes homologues chez les Vertébrés mais pas chez la mouche. Ensuite, les gènes horloges sont exprimés dans la majorité des organes et non pas uniquement dans les structures pacemaker tels que les noyaux suprachiasmatiques (SCN) chez les Mammifères (Balsalobre et al., 1998; Yamazaki et al., 2000; Zylka et al., 1998). Enfin, il a été démontré que la majorité des cellules possède une horloge moléculaire et génère des rythmes de manière autonome (de Jeu et al., 1998; Liu et al., 1997; Welsh et al., 1995). L'ensemble de ces résultats a ainsi facilité l'émergence au début des années 2000 d'un modèle suggérant que chaque cellule génère ses rythmes indépendamment des cellules environnantes et que la sortie de l'horloge n'est alors qu'une conséquence des rythmes intracellulaires. Un tel modèle place donc les boucles de régulation moléculaires intracellulaires comme la base de la génération des rythmes circadiens. Il est important de noter que ce modèle est maintenant quelque peu

**Tableau 1**

### Drosophile

Gène	Identification	Clonage	Inactivation génique	Références
<i>Period</i>	1971	1984	1971; Arythmie	1-3
<i>timeless</i>	1994	1995	1994; Arythmie	4, 5
<i>Clock</i>	1998	1998	1998; Arythmie	6
<i>Cycle</i>	1998	1998	1998; Arythmie	7

### Mammifères

Gène	Identification	Clonage	Inactivation génique	Références
<i>Period1</i> **	1997	1997	2001; Période plus courte	8-12
<i>Period2</i> **	1997	1997	1999, 2001; Période plus courte	13-16
<i>Cryptochrome1</i> **	1999	1996*	1999; Période plus courte	17-19
<i>Cryptochrome2</i> **	1999	1996*	1999; Période plus longue	17-19
<i>Clock</i>	1994	1997	2006; Période plus courte	20-22
<i>Bmal1</i>	1998	1997	2000; Arythmie	23-25

\* Clonage et séquençage du gène sans lien direct avec les rythmes circadiens

\*\* L'inactivation simultanée des 2 gènes *Period* (*Per1*<sup>-/-</sup> *Per2*<sup>-/-</sup>) et des 2 gènes *Cryptochrome* (*Cry1*<sup>-/-</sup> *Cry2*<sup>-/-</sup>) provoque l'arythmie.

#### Références

(1) Seymour and Benzer, 1971; (2) Reddy et al., 1984; (3) Shin et al., 1985; (4) Sehgal et al., 1994; (5) Myers et al., 1995; (6) Allada et al., 1998; (7) Rutila et al., 1998; (8) Tei et al., 1997; (9) Sun et al., 1997; (10) Bae et al., 2001; (11) Zheng et al., 2001; (12) Cermakian et al., 2001; (13) Albrecht et al., 1997; (14) Shearman et al., 1997; (15) Zheng et al., 1999; (16) Bae et al., 2001; (17) Van der Horst et al., 1999; (18) Vitaterna et al., 1999; (19) Hsu et al., 1996; (20) Vitaterna et al., 1994; (21) King et al., 1997; (22) DeBruyne et al., 2006; (23) Ikeda et Nomura, 1997; (24) Hogenesh et al., 1998; (25) Bunger et al., 2000

le tableau 1). Ceci est principalement vrai pour les drosophiles alors que chez les Mammifères, les phénotypes sont plus particulièrement marqués lorsque tous les membres d'une même famille sont invalidés (tableau 1). Ce point est lié au fait qu'il existe géné-

remis en cause (voir paragraphe 4).

Les améliorations très rapides des méthodes de séquençage ont permis l'avènement d'une autre avancée technique en biologie moléculaire : les puces à

(Suite page 39)

(Suite de la page 38)

ADN. Cette technique, qui dépend entièrement de la connaissance du génome de l'organisme étudié, permet d'identifier l'expression simultanée de tous les gènes dans l'organe ou la structure considérés. Plusieurs groupes ont utilisé ces puces à ADN afin d'identifier les gènes exprimés de manière rythmique et circadienne et aussi avec l'espoir de trouver de nouveaux gènes horloges. Les premiers résultats publiés au début des années 2000 (Harmer et al., 2000 ; Schaffer et al., 2001 ; Claridge-Chang et al., 2001 ; McDonald et Rosbash, 2001 ; Ueda et al., 2002a ; Lin et al., 2002 ; Ceriani et al., 2002 ; Grundschober et al., 2001 ; Akhtar et al., 2002 ; Kita et al., 2002 ; Panda et al., 2002 ; Storch et al., 2002 ; Ueda et al., 2002b) ont révélé un premier résultat surprenant : 3 à 10% des gènes sont exprimés de manière rythmique.

Dans cette revue, je présenterai successivement ces 2 grandes avancées moléculaires dans le domaine de la chronobiologie avec tout d'abord les boucles de rétrocontrôle puis ensuite les puces à ADN. Afin de rester succinct, je concentrerai principalement mes propos sur les animaux (drosophile/mammifère). Je m'attacherai à montrer comment ces études moléculaires ont métamorphosé les recherches sur les rythmes biologiques, en pointant aussi les problèmes qui sont souvent ignorés (sciemment ou non). Enfin, je conclurai en ouvrant sur les défis auxquels le domaine fait face et en évaluant le rôle des biologistes moléculaires dans ce contexte.

## 2. Les gènes horloges et les boucles de rétrocontrôle transcriptionnelles et traductionnelles.

La majorité des gènes horloges a été identifiée à la fin des années 90 (tableau 1). Pourtant en 1990, alors que seul le gène *per* est caractérisé, le concept de boucle de rétrocontrôle est proposé comme étant la base moléculaire des rythmes circadiens (Hardin et al., 1990). Et pour paraphraser la dernière phrase du résumé : « Les observations indiquent que [...] il y a une boucle de rétrocontrôle dans laquelle l'activité de la protéine PER induit le rythme de son propre ARNm » (*"The observations indicate that the cycling of per-encoded protein could result from per RNA cycling, and that there is*

### Boucle moléculaire chez la Drosophile - une succession de délai

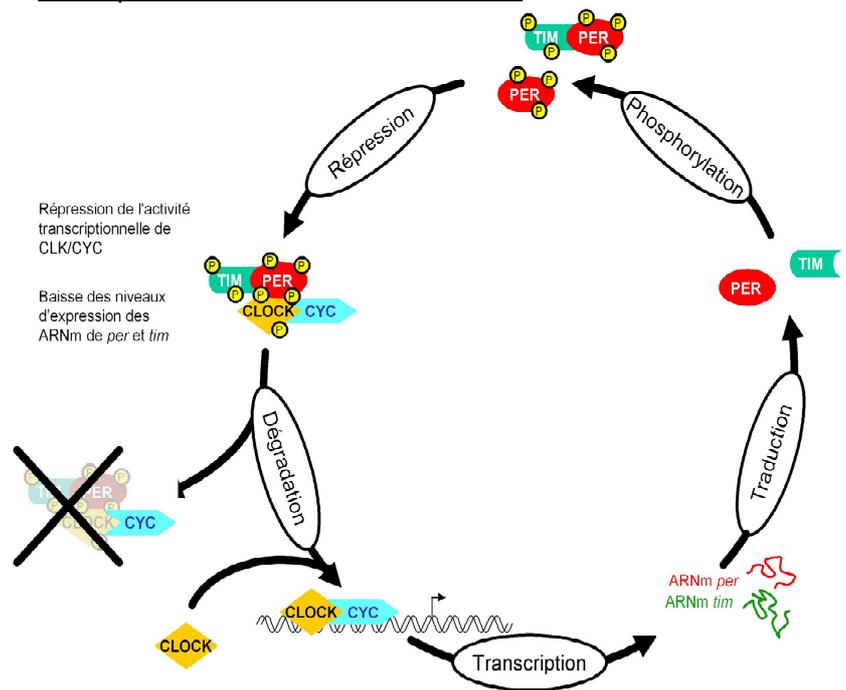


Figure 1: Boucle moléculaire chez la Drosophile – une succession de délai.

*a feedback loop through which the activity of per-encoded protein causes cycling of its own RNA.*”; Hardin et al., 1990).

Ce concept s'est révélé exact et chaque découverte de gène horloge aboutira à trouver un nouvel acteur dans la boucle de rétrocontrôle. Le but de cette revue n'est pas de faire un inventaire exhaustif de tous les mécanismes moléculaires permettant à cette boucle de tourner avec une période de 24h. De bonnes revues permettent de trouver ces informations (Dardente et Cermakian, 2007; Reppert and Weaver, 2001; Roenneberg et Merrow, 2003; Shearman et al., 2000). Par contre, je détaillerai plus particulièrement certains points bien précis :

- quels sont les gènes impliqués ?
- quels sont les mécanismes permettant à la boucle de tourner sur 24h ?

Comme dans toutes les boucles de rétrocontrôle, il faut des gènes (activateurs) qui activent l'expression de gènes répresseurs. Les répresseurs inhibent l'activité des activateurs, entraînant alors une baisse progressive de leur propre expression et aboutissant au début d'un nouveau cycle (figure 1). Dans le règne animal, les gènes activateurs sont représentés par 2 facteurs de transcription appartenant à la famille des protéines à domaines bHLH PAS (pour *basic Helix Loop Helix* et *Per ARNT Sim*) : *clock* (*clk*) et *cycle* (*cyc*) chez la drosophile et leurs homo-

(Suite page 40)

(Suite de la page 39)

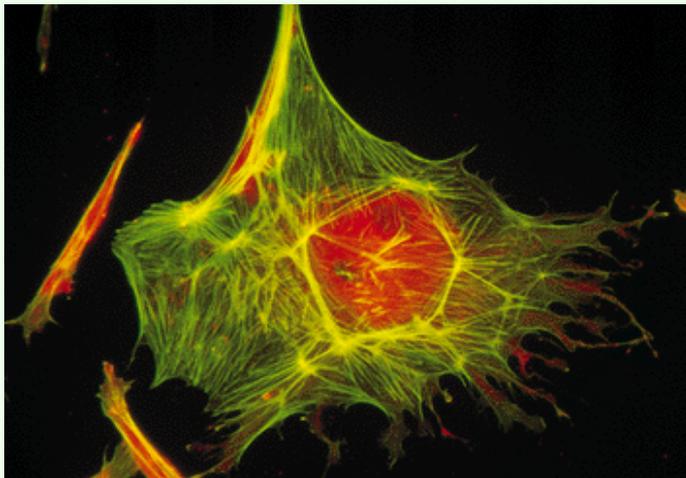
logues *Clock* (*Clk*) et *Bmal1* chez les mammifères (figure 1). Les 2 protéines CLK et CYC (ou CLK et BMAL1) activent en tant que dimère la transcription des gènes répresseurs : *per* et *timeless* (*tim*) chez la drosophile et *Cryptochrome* (*Cry*) et *Per* chez les mammifères. Plusieurs autres gènes ont été identifiés et auraient un rôle plus secondaire. Ils agiraient sur les niveaux d'expression des gènes activateurs plutôt que directement sur l'activité des dimères CLK/CYC ou CLK/BMAL1.

Les boucles de rétrocontrôle représentent un système de régulation d'expression génique omniprésent en biologie. Elles sont très largement utilisées pour contrôler de manière précise l'expression d'un gène, que ce soit pour l'inhiber (exemples lors des différenciations cellulaires avec les mécanismes d'inhibition latérale) ou simplement maintenir l'expression à un niveau physiologique adéquat. Il n'y a dans ces cas-là aucune notion de temps. Lorsqu'elles sont utilisées pour permettre l'expression rythmique de certains gènes, la période peut varier énormément et permettre la genèse de rythmes ultradiens. C'est le cas de l'horloge de la segmentation, où l'expression rythmique de nombreux gènes permet la différenciation des somites le long du tube neural toutes les 2h chez la souris ou 8h chez les humains (pour revue, Bessho et Kageyama, 2003). La particularité de la boucle de rétrocontrôle impliquée dans la genèse des rythmes circadiens est qu'elle fonctionne avec une période de 24h. Cela suppose (et impose) donc une série de nombreux délais, présents à tous les stades de la boucle (figure 1). Ainsi, la transcription, la maturation de l'ARNm, la traduction et la formation des complexes « actifs » vont être soumis à de nombreux mécanismes de régulation. Ces mécanismes de régulation sont universels et présents chez tous les Eukaryotes.

L'une des régulations considérée comme la plus importante (peut-être parce que la plus étudiée) concerne la régulation post-traductionnelle des protéines horloges par des mécanismes de phosphorylation. Un consensus semble se dégager et tend à montrer que chez la majeure partie des organismes (*Neurospora*, la drosophile, les mammifères et à un moindre égard les cyanobactéries), les protéines « répresseurs » sont sujettes à un important rythme de phosphorylation nécessaire à l'activité répressive dans la boucle moléculaire. Ceci a été particulièrement bien étudié chez la drosophile avec la protéine

PER. PER est sujet à un rythme de phosphorylation très marqué et de nombreux sites de phosphorylation ont été caractérisés (Chiu et al., 2008 ; voir aussi Vanselow et al., 2006 et Schlosser et al., 2007 pour les sites de phosphorylation de mPER2). La phosphorylation est très progressive et plus de 12 heures sont nécessaires pour observer les formes hyperphosphorylées. Cette phosphorylation progressive va réguler de nombreux événements moléculaires comme la localisation cellulaire des protéines horloges (cytoplasmique ou nucléaire), la formation de complexes protéiques ainsi que leur dégradation (pour revue, Vanselow et Kramer, 2007 ; Gallego et Virshup, 2007). L'importance des rythmes de phosphorylation dans la genèse des rythmes circadiens se reflète dans la conservation des kinases impliquées au cours de l'évolution. Ainsi, les caséines kinases  $\epsilon$  et  $\delta$  (*Ckl\epsilon* et *Ckl\delta*) régulent la phosphorylation des protéines horloges chez les plantes, les champignons et les animaux et sont généralement considérées comme faisant partie des gènes horloges (Gallego and Virshup, 2007). D'autres kinases comme la Glycogen synthase kinase 3 (*Gsk-3*) sont aussi relativement conservées.

Enfin, il est intéressant de noter que les protéines horloges chez les Cyanobactéries sont des kinases/phosphatases. Le rythme de phosphorylation/déphosphorylation est directement lié à la formation de complexes entre les protéines horloges, et le cœur même de l'horloge circadienne serait la régulation temporelle de la phosphorylation. En effet, la majorité (sinon la totalité) des mutants chez les Cyanobactéries correspondent à des mutants ayant leur activité de phosphorylation ou de déphosphorylation altérée (Kondo, 2007). Même s'il semble que les horloges moléculaires des Procaryotes et des Eucaryotes ont une origine distincte au niveau de l'évolution, une extrapolation est ici tentante. Pourrait-on considérer que le cœur de l'horloge moléculaire chez les Eucaryotes soit uniquement constitué des protéines horloges et de leurs kinases ? Le rythme de phosphorylation/déphosphorylation, régulant la formation des complexes entre les protéines horloges, formeraient la pierre angulaire des rythmes moléculaires, et les rythmes de transcription ne seraient en quelque sorte que la sortie de l'horloge. Autrement dit, peut-on envisager comme cela a été montré avec les protéines horloges des procaryotes (Nakajima et al., 2005), l'émergence de rythmes circadiens *in vitro* dans un tube à essai si on mélange



(Suite page 41)

(Suite de la page 40)

les protéines horloges et leurs kinases? Cette question est intentionnellement provocatrice, mais a le mérite (peut-être) d'ouvrir la discussion.

De telles questions ne peuvent être répondues sans l'apport de techniques de biochimie. De la même manière que les biologistes moléculaires ont fait avancer et évoluer le domaine, la biochimie permettra de répondre à de nombreuses questions qui sont encore ouvertes et importantes dans le but de comprendre comment, au niveau moléculaire, les rythmes circadiens sont générés. Ainsi, il aura par exemple fallu 10 ans pour découvrir que la protéine CLK est (aussi) une enzyme. En effet, CLK est capable d'acétyler les histones et aussi son partenaire BMAL1, permettant de modifier ainsi son activité transcriptionnelle (Doi et al., 2006 ; Hirayama et al., 2007). Par ailleurs, il est étonnant que la structure des protéines horloges ne soit pas encore à l'heure actuelle publiée. Il est vraisemblable que de nombreux laboratoires s'y sont attelés, mais sans succès jusqu'à maintenant (seule la structure d'une partie de la protéine PER a été publiée ; Yildiz et al., 2005). De plus, cela permettra de mieux comprendre comment les mécanismes moléculaires fonctionnent. En effet, très peu de choses sont à l'heure connues sur les mécanismes exacts permettant à PER et CRY de réprimer l'activité transcriptionnelle de CLK/CYC ou CLK/BMAL1, respectivement. Il semblerait que des régulations post-traductionnelles comme la phosphorylation ou l'acétylation des gènes activateurs soient impliquées, mais aucun mécanisme détaillé n'a encore été publié.

### 3. Les puces à ADN et la transcription circadienne

L'une des grandes avancées techniques de ces 10 dernières années en biologie moléculaire est l'avènement des puces à ADN (*microarray* en anglais). Ces puces consistent en des lames de microscope sur lesquelles sont disposés régulièrement tous les quelques dizaines de micromètres des brins monocaténares d'ADN correspondant à un gène. La miniaturisation de cet équipement permet d'avoir sur la même lame tous les gènes de l'organisme étudié, et permet donc en une seule expérience de connaître les niveaux d'expression de l'ensemble du génome dans l'échantillon considéré (pour revue, Sato et al., 2003). Il est important d'ajouter que le succès des puces à ADN est largement lié à une « nouvelle » technique utilisée pour la validation des résultats : la PCR quantitative (qPCR pour *quantitative Polymerase Chain Reaction*). En effet, les puces à ADN génèrent de nombreux « faux positifs » (principalement à cause de difficultés tech-

niques comme la technique d'hybridation). La qPCR, qui consiste en une PCR faite dans les conditions où la génération de produits de PCR est proportionnelle à la quantité de matériel, permet de s'affranchir de ces problèmes et a donc contribué à affiner la validité des résultats (de masse) obtenus avec les puces à ADN.

Les puces à ADN ont été largement utilisées dans le domaine des rythmes dès le début des années 2000 afin d'étudier principalement quels sont les gènes exprimés de manière rythmique/circadienne (plantes avec *Arabidopsis* : Harmer et al., 2000 ; Schaffer et al., 2001 ; Drosophile : Claridge-Chang et al., 2001 ; McDonald and Rosbash, 2001 ; Ueda et al., 2002 ; Lin et al., 2002 ; Ceriani et al., 2002 ; Mammifères : Grundschober et al., 2001 ; Akhtar et al., 2002 ; Kita et al., 2002 ; Panda et al., 2002 ; Storch et al., 2002 ; Ueda et al., 2002b). Les résultats ont apporté de nombreuses informations. Tout d'abord, les gènes horloges ne sont pas les seuls gènes à être exprimés de manière circadienne et de 3 à 10% du génome présente un rythme d'expression. Ces gènes rythmiques sont en grande partie impliqués dans les régulations métaboliques comme la glycolyse, la gluconéogenèse, la biosynthèse du cholestérol ou des acides aminés, la phosphorylation oxydative. De plus, certains de ces ARNm encodent dans le foie pour des enzymes limitantes comme la réductase HMG-CoA, la réductase delta-aminolevulinate ou le cytochrome P450 7a1. C'est ainsi toute la biosynthèse du cholestérol, de l'hème et de la bile, respectivement, qui est circadienne. Une autre caractéristique de ces résultats est qu'il n'y a pas une phase

unique d'expression et de nombreux gènes s'expriment en anti-phase. Ceci implique donc que différentes fonctions cellulaires peuvent avoir au sein d'un même tissu des rythmes avec des phases différentes. Enfin, il est apparu très rapidement que les gènes exprimés rythmiquement étaient différents en fonction de l'organe ou du tissu considéré. Ainsi, un gène X exprimé de manière circadienne dans le cœur peut être exprimé de manière constante



dans un autre organe tel le rein ou le poumon (pour revue, Sato et al., 2003). À cet égard, le nombre de gènes exprimés de manière rythmique dans tous les organes examinés jusqu'à présent est très faible et ne concerne pratiquement que les gènes horloges déjà caractérisés (différence entre les gènes horloges, i.e., gènes qui sont au cœur de l'horloge moléculaire circadienne et les gènes à expression rythmique, i.e, gènes de sortie de l'horloge). Si l'on considère que la base moléculaire des rythmes circadiens est la même dans tous les organes (ce qui est très vraisemblablement le cas), il est donc très ten-

(Suite page 42)

(Suite de la page 41)

tant de penser que le nombre de gènes horloges est très faible et que la liste est déjà connue.

La quantité des données provenant de ces analyses globales du transcriptome ont provoqué un réel élan dans la communauté scientifique. De plus en plus d'études ont commencé à inclure des données provenant des puces à ADN, laissant suggérer que cette manière d'étudier une fonction biologique allait permettre de résoudre de nombreux problèmes. Cependant, force est de constater que ce ne fut pas complètement le cas.

Ainsi, dans le domaine des rythmes, très peu de gènes ont été ensuite caractérisés. Alors que de nombreuses personnes pensaient que de nombreux nouveaux gènes horloges allaient être trouvés, il semble maintenant évident que ce ne fut pas le cas. Seule la découverte du gène horloge *cwo* chez la drosophile est issue de résultats provenant des puces à ADN (Kadener et al., 2007; Lim et al., 2007; Matsumoto et al., 2007). De même, très peu de gènes rythmiques ou plus généralement de fonction biologiques rythmiques ont fait objet d'études plus poussées. On peut cependant citer par exemple le cas du gène *Id2* (pour *Inhibitor of DNA binding 2*) dont l'étude de son implication dans les rythmes circadiens a été initiée suite aux résultats provenant des puces à ADN (Duffield et al., 2009). Ce gène code pour un facteur de transcription incapable de se lier à l'ADN et son invalidation génique diminue la rythmicité circadienne et augmente l'amplitude des décalages de phase (Duffield et al., 2009).

Doit-on de ce fait penser que ces résultats provenant des puces à ADN ne constituent que de la poudre aux yeux ? Je ne suis pas de cet avis, mais il est nécessaire, par contre, de les intégrer dans une vision plus globale des rythmes biologiques et de comprendre exactement ce à quoi l'on fait référence quand on analyse les résultats. Tout d'abord, les puces à ADN ont permis de montrer que le nombre de gènes horloges est relativement faible et que la majeure partie de ces gènes est aujourd'hui connue. Il est aussi sûrement encore trop tôt pour vraiment avoir le recul nécessaire par rapport à la quantité de résultats et il est vraisemblable que plusieurs gènes circadiens seront (de la même manière que cela a été fait avec le gène *Id2*) caractérisés dans la prochaine décennie. Enfin, il est important de rappeler que les puces à ADN ne mesurent que les niveaux d'expression des ARNm. Étant donnée l'importance des régulations post-transcriptionnelles et post-translationnelles dans la genèse des rythmes circadiens, il est fort probable que plusieurs gènes ont des niveaux d'expression de leur protéine rythmique alors que leur ARNm est exprimé de manière constante. De plus, une expression constante ne signifie pas forcément que l'activité de la protéine est constante. L'activité enzymatique ou l'association d'une protéine à un complexe peuvent être circadiennes

sans que la détection par western blot le soit ! C'est pourquoi, une fois encore, il est important d'avoir un certain recul par rapport aux données et réaliser que les puces à ADN ne mesurent que l'expression de l'ARNm d'un gène donné.

#### 4. Vers une vision plus intégrée des résultats moléculaires

Un autre problème rencontré avec les puces à ADN tient au fait que les chercheurs ne tiennent pas compte de l'hétérogénéité du tissu qu'ils étudient. Or, chaque structure ou organe est constitué de sous populations de cellules aux fonctions différentes et les « structures horloge » ne font pas exception. Cependant, les techniques utilisées jusqu'à maintenant en biologie moléculaire omettent ce facteur et les ARNm ou protéines sont isolés à partir des tissus plutôt que de populations de cellules à la fonction bien définie.

Cet aspect est particulièrement important surtout au regard des derniers résultats obtenus chez la mouche. Chez la drosophile, les cellules horloges (environ 150 neurones) sont subdivisées en 6 sous populations neuronales en fonction de leur localisation neuro-anatomique et de l'expression de neuropeptides. Longtemps considérées comme une seule entité (neurones horloges), ces sous-populations de neurones sont cependant organisées hiérarchiquement et contrôlent plus particulièrement certains aspects des rythmes circadiens. Ainsi, certains neurones contrôlent l'activité locomotrice du matin, d'autres neurones l'activité locomotrice du soir (Grima et al., 2004; Stoleru et al., 2004). Un petit groupe de neurones serait aussi plus particulièrement impliqué dans l'entraînement des rythmes suite à une stimulation lumineuse en fin de nuit (cellules photoréceptrices de l'aube, responsables des avances de phase induite par la lumière) (Shang et al., 2008). Ainsi et même si chaque cellule est une cellule pacemaker, leur organisation en un réseau de neurones cohérent est primordiale pour l'organisation temporelle des rythmes circadiens. Et il est raisonnable de penser que chaque sous-population de neurones exprime des gènes différents permettant ainsi leur spécialisation physiologique.

Chez les mammifères, les SCN sont aussi constitués de sous populations de neurones qui peuvent être différenciés en fonction de leur expression en neuropeptides (principalement AVP et VIP, pour *arginine vasopressin* et *vasoactive intestinal polypeptide*, respectivement). L'organisation fonctionnelle entre les neurones des SCN est, à l'instar des cellules horloges chez la drosophile, nécessaire pour la génération des rythmes circadiens. Ainsi, des souris ayant le gène codant pour le récepteur au VIP invalidé (*Vipr<sup>-/-</sup>*) ont un rythme comportemental d'activité locomotrice altéré et présentent une arythmie de l'expression des gènes horloges dans les SCN en

(Suite page 43)

(Suite de la page 42)

condition constante (Harmar et al., 2002). Cette arythmie n'est cependant pas due à un arrêt des boucles moléculaires dans chaque cellule des SCN, mais reflète plutôt une baisse du nombre de cellules rythmiques dans les SCN ainsi qu'une désynchronisation complète entre les neurones des SCN (Aton et al., 2005).

Un autre résultat surprenant a été publié récemment par l'équipe de Steve Kay (Liu et al., 2007). Les souris ayant le gène horloge *Per1*, *Per2* ou *Cry1* invalidé restent rythmiques et l'effet de l'invalidation du gène se reflète principalement sur la période endogène (tableau 1). De même, les SCN en culture présentent aussi un robuste rythme circadien d'activité. Pourtant, quand les neurones des SCN de ces mêmes souris sont dissociés et mis en culture, leur rythmicité est fortement altérée et beaucoup moins robuste que celle observée chez des souris sauvages. Ces résultats indiquent donc les rythmes physiologiques ne reflètent pas forcément le phénotype des horloges cellulaires autonomes. Ils démontrent aussi que le couplage intracellulaire dans les SCN est non seulement nécessaire à la synchronisation des oscillations cellulaires, mais qu'ils contribuent aussi à maintenir l'amplitude des rythmes malgré les perturbations génétiques. Dès lors, on peut se demander si chercher à déterminer comment les boucles de rétrocontrôle fonctionnent reste une question pertinente.

### **5. Vers une nouvelle utilisation des techniques de biologie moléculaire**

Si seuls certains neurones horloges contrôlent un aspect spécifique des rythmes biologiques, est-il pertinent d'en étudier la régulation dans la structure ou le tissu ? Par exemple chez la drosophile, si seuls certains neurones sont responsables de la réception d'une stimulation lumineuse, est-il logique de corrélérer les décalages de phase induit par une stimulation lumineuse à une variation d'expression d'un ARNm ou d'une protéine dans l'ensemble de la tête de la mouche ?

De même, si une mutation génique ne conduit pas forcément à un phénotype à cause du couplage intracellulaire dans les SCN, faut-il considérer que cette altération moléculaire n'est pas importante pour la genèse des rythmes circadiens ?

Ces deux questions mettent en avant les défis auxquels les biologistes moléculaires (mais pas uniquement) sont confrontés à l'heure actuelle. Quelle est la direction à prendre ? De nombreux facteurs doivent être (re-)considérés. De plus l'évolution de la connaissance du génome et des techniques de biologie moléculaire doivent être prises en compte.

#### **5.1. Chaque tissu est constitué de cellules fonctionnellement différentes**

Il est tout d'abord important de prendre en compte la diversité cellulaire du tissu ou de l'organe étudié. Ainsi, étudier les rythmes d'expression génique d'une structure dans son ensemble (tête de drosophile, SCN ou organe comme le foie) ne va pas forcément refléter un rythme dans toutes les cellules. De plus, il est important de considérer aussi le facteur « dilution ». En effet, un rythme dans certaines cellules ne représentant qu'un faible pourcentage du total des cellules peut être masqué par l'expression constitutive (ou en antiphase) dans le reste des cellules. C'est pourquoi il est important d'étudier l'expression génique dans une sous-population neuronale bien caractérisée. Certaines études menées dans cette optique dans d'autres domaines ont apporté des résultats très encourageants. Par exemple, une étude s'est concentrée sur différentes populations neuronales du prosencéphale ayant des caractéristiques morphologiques, électrophysiologiques et neuro-anatomiques bien différentes (Sugino et al., 2006). En isolant spécifiquement 12 sous-populations neuronales différentes, les auteurs ont démontré que chaque catégorie de neurones présente une expression génique qui lui est propre et que l'expression des récepteurs et canaux ioniques peut être corrélée à l'activité électrique de ces neurones (Sugino et al., 2006). Une telle étude est envisageable avec les cellules horloges, que ce soit chez les drosophiles ou les mammifères. Cela serait d'ailleurs déjà en cours chez les drosophiles (Blau, 2006 ; Rosbash, 2008). Chez les mammifères, la caractérisation de l'expression génique dans différents types de cellules au sein des SCN (AVP, VIP, GRP ou encore cellules gliales) apportera vraisemblablement de nombreuses informations concernant les différents récepteurs, canaux ioniques ou voies de signalisation exprimés spécifiquement dans chaque cellule, permettant alors de mieux comprendre comment le réseau neuronal intra-SCN est organisé.

#### **5.2. Ciblage plus précis de l'invalidation génique**

Les manipulations génétiques ont incontestablement contribué à l'évolution de la recherche en sciences de la vie ces dernières décennies. En effet, la possibilité d'altérer spécifiquement l'expression d'un gène et d'analyser le phénotype observé a permis de corrélérer directement un gène à sa fonction.

La drosophile est l'animal de référence à cet égard et les criblages génétiques ont permis très tôt d'analyser l'effet des mutations géniques sur le développement, la physiologie et le comportement de l'animal. C'est d'ailleurs de cette manière que le gène *Period* a été identifié (Konopka et Benzer, 1971 ; voir aussi la section 1 de cette revue). L'intégration dans le génome d'éléments transposables (aussi appelés éléments P) a représenté une avancée en-

(Suite page 44)

(Suite de la page 43)

core plus spectaculaire (Spradling et Rubin, 1982 ; Rubin et Spradling, 1982). Ces éléments, correspondant à des transposons modifiés, ont la caractéristique de s'intégrer (comme tous les transposons) aléatoirement dans le génome. L'intégration dans le génome de la drosophile d'un élément P contenant un gène d'intérêt aboutit à l'expression de ce gène d'intérêt directement *in vivo* et permet de corrélérer l'expression du gène d'intérêt avec un phénotype. Les évolutions et les variations autour de ces éléments transposables ont été nombreuses et ont complètement révolutionné la recherche sur la génétique des drosophiles. L'une des variations les plus notables a été apportée en 1993 lorsque Brand et Perrimon ont utilisé ces éléments P pour exprimer un gène d'intérêt dans un tissu spécifique avec le système UAS/Gal4 (Brand et Perrimon, 1993). L'application de cette technique au domaine de la chronobiologie a été importante et a contribué à la caractérisation relativement précise du rôle des différents groupes de cellules horloges dans le cerveau de la mouche (pour revue, Hall, 2003). De plus, une évolution très récente permettant de restreindre la manipulation génétique à une seule cellule a contribué à montrer le rôle important de quelques cellules horloges sur l'entraînement des rythmes circadiens (Shang et al., 2008). Cependant, d'autres évolutions sont encore nécessaires. En effet, ces techniques destinées à restreindre les modifications géniques à quelques cellules sont tributaires des promoteurs utilisés (et aussi assez souvent de la localisation de l'insertion de l'élément P dans le génome). Faute de promoteur spécifique, plusieurs groupes de neurones horloges n'ont pas pu être encore caractérisés. Le contrôle temporel de la manipulation génétique est aussi problématique. En effet, l'expression d'un transgène peut entraîner des perturbations lors du développement de la mouche (problème de connexions neuronales, létalité, etc...) et empêche donc une analyse précise de la manipulation génétique. Il est probable que de nouveaux systèmes seront élaborés dans les prochaines années et permettront de résoudre ces problèmes.

Les manipulations génétiques chez les mammifères ont aussi révolutionné les recherches en sciences de la vie. Celles-ci concernent principalement les souris et ont fait l'objet de l'attribution du prix Nobel de physiologie et de médecine en 2007 à Mario R. Capecchi, Martin J. Evans and Oliver Smithies.

La technique de l'inactivation génique (*knock-out*) a été utilisée pour invalider tous les gènes horloges (voir tableau 1). Les phénotypes observés sont cependant sujets à de nombreuses questions. En effet, l'inactivation d'un gène horloge supprime l'expression de ce gène dans tout l'organisme et il est donc impossible d'être assuré que le phénotype provient directement de l'absence d'expression de ce gène dans l'horloge centrale. De plus, le gène est invalidé

dès le stade embryonnaire, entraînant potentiellement des phénomènes de compensation génique. De nouvelles techniques ont été créées afin de pallier à ces deux problèmes majeurs. Parmi celles-ci, l'utilisation du système Cre/loxP est assurément celle qui fait preuve de la plus grande attractivité (Tsien et al., 1996). Ce système binaire repose sur l'utilisation de la recombinase Cre qui présente une activité recombinase spécifique pour les sites loxP. Chez la souris, l'utilisation d'un promoteur spécifique permettant une expression ciblée de Cre, couplée à un gène d'intérêt dont la séquence codante est flanquée de 2 sites loxP permet ainsi la recombinaison (et donc la disparition) de la séquence codante du gène d'intérêt uniquement là où Cre est exprimée. La première application de cette technique en chronobiologie est venue du groupe de Charles Weitz. Les auteurs ont réalisé une ablation spécifique de l'horloge moléculaire dans la rétine afin de montrer que l'horloge circadienne intrinsèque à la rétine régule le traitement de l'information visuelle intrarétinien (Storch et al., 2007). Il est très vraisemblable que ce système sera de plus en plus utilisé dans les prochaines années. Ce système repose cependant sur l'utilisation de promoteurs spécifiques permettant une expression ciblée de la recombinase. Étant donnée la diversité neuronale dans les SCN, il est donc encore difficile d'envisager pouvoir réaliser une invalidation génique spécifique des SCN.

Une possibilité permettant d'outrepasser ce problème serait l'utilisation ciblée de lentivirus ou adénovirus. Cette technique émergente consiste en l'encapsulation de gènes d'intérêt dans des virus puis en l'injection (stéréotaxique pour les structures cérébrales) de ces virus dans l'organisme (pour revue, Washbourne et McAllister, 2002 ; Kuhlman et Huang, 2008). L'injection stéréotaxique dans les SCN de la recombinase Cre ou inversement d'un gène d'intérêt flanqué de séquences loxP permettrait d'aboutir à une manipulation génique restreinte aux SCN. De telles techniques, amenées à évoluer, permettront de résoudre des questions essentielles sur le rôle des différentes sous-populations de neurones dans les SCN.

Une application importante des techniques de manipulations géniques dans le domaine des rythmes circadiens a consisté en l'intégration dans le génome de transgènes exprimant un gène rapporteur (protéine fluorescente ou bioluminescence) sous contrôle du promoteur d'un gène horloge (pour revue, Welsh et Kay, 2005). L'expression du gène rapporteur est alors directement corrélée à la transcription du gène horloge et oscille avec une période proche de 24h. Cette technique a permis de montrer, entre autres, que de très nombreux tissus périphériques ont une activité rythmique circadienne avec une phase qui leur est propre (Yamazaki et al., 2000). L'utilisation de caméras CCD très sensibles

(Suite page 45)

(Suite de la page 44)

et permettant une résolution cellulaire du signal rapporteur a permis de montrer que l'expression du gène rapporteur n'est pas uniforme dans les SCN (Yamaguchi et al., 2003). En effet, le signal apparaît d'abord dans la partie dorsale et se propage progressivement à la partie ventrale (Yamaguchi et al., 2003). L'utilisation de ce système rapporteur, couplée à la génération de souris transgéniques exprimant un autre gène rapporteur pour identifier un sous-type cellulaire, constituerait une autre grande avancée technique et permettrait de caractériser plus précisément comment les neurones des SCN se synchronisent entre eux pour générer de robustes rythmes circadiens.

### 5.3. Quelles seront les conséquences de l'amélioration de la connaissance du génome ?

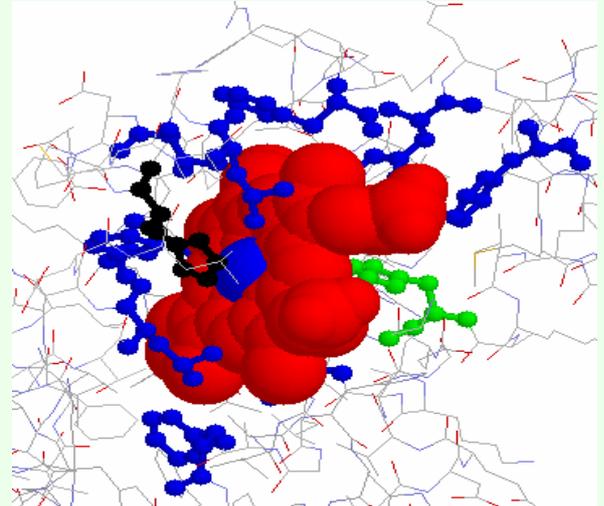
Les études en biologie moléculaire se sont principalement concentrées sur « l'ADN codant », c'est à dire l'ADN dont la séquence est codée en ARNm puis protéine. Cet ADN codant ne représente cependant que 5% du génome. Les 95% restants de l'ADN, appelé « ADN non-codant » et correspondant aux séquences intergéniques, introns, transposons, ARN non codant et hétérochromatine, ont longtemps été ignorés car considérés comme peu important. Pourtant, l'amélioration des puces à ADN (avec des oligonucléotides couvrant tout le génome et non plus juste les séquences codantes) et l'apparition des séquenceurs haut débit ont montré que cet ADN non codant n'est pas si inerte que cela avait été suggéré (pour revue, Gerstein et al., 2007 ; Gingeras et al., 2007). Pour ne citer qu'un exemple, cet ADN peut coder pour de nombreuses nouvelles catégories d'ARN non codant (miARN, piARN, siRNA, etc). Même si le rôle de cet ADN est encore obscur à l'heure actuelle, il est vraisemblable que de nouvelles fonctions seront découvertes, y compris dans le domaine des rythmes circadiens.

De plus, le développement des séquenceurs à haut-débit (454, Illumina ou Solexa) va aussi amener de nombreux nouveaux résultats (et remplacera probablement les expériences d'hybridation sur puce). Ces séquenceurs ont la capacité de séquencer plusieurs millions de nucléotides provenant d'un échantillon. L'analyse du transcriptome par cette technique a révélé de nombreux nouveaux aspects dans la régulation génique (pour revue, Wang et al., 2009). En effet, cette technique permet tout d'abord de mesurer de manière beaucoup plus précise les niveaux des transcrits. De plus, elle permet de révéler l'étendue et l'importance de l'épissage alternatif. Son utilisation dans le domaine de la chronobiologie s'annonce prometteuse et réservera sûrement de nombreuses surprises.

## 6. Conclusion

Le domaine de la biologie moléculaire a radicalement évolué ces 20 dernières années grâce à l'é-

mergence de nombreuses nouvelles techniques. Comme tous les domaines en sciences de la vie, le domaine de la chronobiologie en a largement bénéficié. L'arrivée de nouvelles technologies comme les séquenceurs à haut-débit vont amener dans les prochaines années une meilleure compréhension du génome. Il sera intéressant de mesurer à quel point



ces avancées techniques auront un impact dans le domaine de la chronobiologie.

## Références

- Akhtar, R.A., Reddy, A.B., Maywood, E.S., Clayton, J.D., King, V.M., Smith, A.G., Gant, T.W., Hastings, M.H., and Kyriacou, C.P. (2002). Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Curr Biol* 12, 540-550.
- Albrecht, U., Sun, Z.S., Eichele, G., and Lee, C.C. (1997). A differential response of two putative mammalian circadian regulators, *mper1* and *mper2*, to light. *Cell* 91, 1055-1064.
- Allada, R., White, N., So, W., Hall, J., and Rosbash, M. (1998). A mutant *Drosophila* homolog of mammalian *Clock* disrupts circadian rhythms and transcription of *period* and *timeless*. *Cell* 93, 791-804.
- Aton, S.J., Colwell, C.S., Harmar, A.J., Waschek, J., and Herzog, E.D. (2005). Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nat Neurosci* 8, 476-483.
- Bae, K., Jin, X., Maywood, E.S., Hastings, M.H., Reppert, S.M., and Weaver, D.R. (2001). Differential Functions of *mPer1*, *mPer2*, and *mPer3* in the SCN Circadian Clock. *Neuron* 30, 525-536.
- Balsalobre, A., Damiola, F., and Schibler, U. (1998). A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* 93, 929-937.
- Bessho, Y., and Kageyama, R. (2003). Oscillations, clocks and segmentation. *Curr Opin Genet Dev* 13, 379-384.
- Blau, J. (2006) How Do *Drosophila* Pacemaker Neurons Process Light Signals? SRBR meeting, May 21-25, 2006 Sandestin FL USA.
- Brand, A.H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.
- Bruce, V.G. (1972). Mutants of the biological clock in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* 70, 537-548.
- Bunger, M.K., Wilsbacher, L.D., Moran, S.M., Clendenen, C., Radcliffe, L.A., Hogenesch, J.B., Simon, M.C., Takahashi, J.S., and Bradfield, C.A. (2000). *Mop3* is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell* 103, 1009-1017.
- Bunning, E. (1935) Zur Kenntnis der erblichen Tagesperiodizität bei den Primarblätter von *Phaseolus multiflorus*. *Jahrb. Wiss. Bot.*

(Suite page 46)

(Suite de la page 45)

- 81, 411-418.
- Ceriani, M.F., Hogenesch, J.B., Yanovsky, M., Panda, S., Straume, M., and Kay, S.A. (2002). Genome-wide expression analysis in *Drosophila* reveals genes controlling circadian behavior. *J Neurosci* 22, 9305-9319.
- Cermakian, N., Monaco, L., Pando, M.P., Dierich, A., and Sassone-Corsi, P. (2001). Altered behavioral rhythms and clock gene expression in mice with a targeted mutation in the *Period1* gene. *EMBO J* 20, 3967-3974.
- Chiu, J.C., Vanselow, J.T., Kramer, A., and Edery, I. (2008). The phospho-occupancy of an atypical SLIMB-binding site on *PERIOD* that is phosphorylated by *DOUBLETIME* controls the pace of the clock. *Genes Dev* 22, 1758-1772.
- Claridge-Chang, A., Wijnen, H., Naef, F., Boothroyd, C., Rajewsky, N., and Young, M.W. (2001). Circadian regulation of gene expression systems in the *Drosophila* head. *Neuron* 32, 657-671.
- Dardente, H., and Cermakian, N. (2007). Molecular circadian rhythms in central and peripheral clocks in mammals. *Chronobiol Int* 24, 195-213.
- de Mairan, J. (1729) Observation botanique. *Hist. Acad. Roy. Sci.* 35-36.
- de Jeu, M., Hermes, M., and Pennartz, C. (1998). Circadian modulation of membrane properties in slices of rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroreport* 9, 3725-3729.
- Doi, M., Hirayama, J., and Sassone-Corsi, P. (2006). Circadian regulator *CLOCK* is a histone acetyltransferase. *Cell* 125, 497-508.
- Duffield, G.E., Watson, N.P., Mantani, A., Peirson, S.N., Robles-Murguía, M., Loros, J.J., Israel, M.A., and Dunlap, J.C. (2009). A role for *Id2* in regulating photic entrainment of the mammalian circadian system. *Curr Biol* 19, 297-304.
- Feldman, J.F., and Hoyle, M. (1973). Isoalation of circadian clock mutants of *Neurospora crassa*. *Genetics* 75, 605-613.
- Gallego, M., and Virshup, D.M. (2007). Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 139-148.
- Gerstein, M.B., Bruce, C., Rozowsky, J.S., Zheng, D., Du, J., Korbel, J.O., Emanuelsson, O., Zhang, Z.D., Weissman, S., and Snyder, M. (2007). What is a gene, post-ENCODE? History and updated definition. *Genome Res* 17, 669-681.
- Gingeras, T.R. (2007). Origin of phenotypes: genes and transcripts. *Genome Res* 17, 682-690.
- Grima, B., Chelot, E., Xia, R., and Rouyer, F. (2004). Morning and evening peaks of activity rely on different clock neurons of the *Drosophila* brain. *Nature* 431, 869-873.
- Grundschober, C., Delaunay, F., Puhlhofer, A., Triqueneaux, G., Laudet, V., Bartfai, T., and Nef, P. (2001). Circadian regulation of diverse gene products revealed by mRNA expression profiling of synchronized fibroblasts. *J Biol Chem* 276, 46751-46758.
- Hall, J. (2003). Genetics and molecular biology of rhythms in *Drosophila* and other insects. *Advances in Genetics* 48, 1-280.
- Hardin, P.E., Hall, J.C., and Rosbash, M. (1990). Feedback of the *Drosophila period* gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature* 343, 536-540.
- Harmar, A., Marston, H., Shen, S., Spratt, C., West, K., Sheward, W., Morrison, C., Dorin, J., Piggins, H., Reubi, J., et al. (2002). The *VPAC(2)* receptor is essential for circadian function in the mouse suprachiasmatic nuclei. *Cell* 109, 497-508.
- Harmer, S.L., Hogenesch, J.B., Straume, M., Chang, H.S., Han, B., Zhu, T., Wang, X., Kreps, J.A., and Kay, S.A. (2000). Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science* 290, 2110-2113.
- Hirayama, J., Sahar, S., Grimaldi, B., Tamaru, T., Takamatsu, K., Nakahata, Y., and Sassone-Corsi, P. (2007). *CLOCK*-mediated acetylation of *BMAL1* controls circadian function. *Nature* 450, 1086-1090.
- Hogenesch, J.B., Gu, Y.-Z., Jain, S., and Bradfield, C.A. (1998). The basic-helix-loop-helix-PAS orphan *MOP3* forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 5474-5479.
- Hsu, D.S., Zhao, X., Zhao, S., Kazantsev, A., Wang, R.P., Todo, T., Wei, Y.F., and Sancar, A. (1996). Putative human blue-light photoreceptors *hCRY1* and *hCRY2* are flavoproteins. *Biochemistry* 35, 13871-13877.
- Ikeda, M., and Nomura, M. (1997). cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS protein (*BMAL1*) and identification of alternatively spliced variants with alternative translation initiation site usage. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 233, 258-264.
- Jackson, R.F., Bargiello, T.A., Yun, S.-H., and Young, M.W. (1986). Product of the *per* locus of *Drosophila* shares homology with proteoglycans. *Nature* 320, 185-188.
- Kadener, S., Stoleru, D., McDonald, M., Nawathean, P., and Rosbash, M. (2007). *Clockwork Orange* is a transcriptional repressor and a new *Drosophila* circadian pacemaker component. *Genes Dev* 21, 1675-1686.
- King, D.P., Zhao, Y., Sangoram, A.M., Wilsbacher, L.D., Tanaka, M., Antoch, M.P., Steeves, T.D.L., Vitaterna, M.H., Kornhauser, J.M., Lowrey, P.L., et al. (1997). Positional Cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell* 89, 641-653.
- Kita, Y., Shiozawa, M., Jin, W., Majewski, R.R., Besharse, J.C., Greene, A.S., and Jacob, H.J. (2002). Implications of circadian gene expression in kidney, liver and the effects of fasting on pharmacogenomic studies. *Pharmacogenetics* 12, 55-65.
- Kondo, T. (2007). A cyanobacterial circadian clock based on the Kai oscillator. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 72, 47-55.
- Konopka, R.J., and Benzer, S. (1971). Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 68, 2112-2116.
- Kuhlman, S.J., and Huang, Z.J. (2008). High-resolution labeling and functional manipulation of specific neuron types in mouse brain by Cre-activated viral gene expression. *PLoS ONE* 3, e2005.
- Lim, C., Chung, B.Y., Pitman, J.L., McGill, J.J., Pradhan, S., Lee, J., Keegan, K.P., Choe, J., and Allada, R. (2007). *Clockwork orange* encodes a transcriptional repressor important for circadian clock amplitude in *Drosophila*. *Curr Biol* 17, 1082-1089.
- Lin, Y., Han, M., Shimada, B., Wang, L., Gibler, T.M., Amarakone, A., Awad, T.A., Stormo, G.D., Van Gelder, R.N., and Taghert, P.H. (2002). Influence of the period-dependent circadian clock on diurnal, circadian, and aperiodic gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9562-9567.
- Liu, A.C., Lewis, W.G., and Kay, S.A. (2007). Mammalian circadian signaling networks and therapeutic targets. *Nat Chem Biol* 3, 630-639.
- Liu, C., Weaver, D.R., Strogatz, S.H., and Reppert, S.M. (1997). Cellular construction of a circadian clock: period determination in the suprachiasmatic nuclei. *Cell* 91, 855-860.
- Matsumoto, A., Ukai-Tadenuma, M., Yamada, R.G., Houl, J., Uno, K.D., Kasukawa, T., Dauwalder, B., Itoh, T.Q., Takahashi, K., Ueda, R., et al. (2007). A functional genomics strategy reveals *clockwork orange* as a transcriptional regulator in the *Drosophila* circadian clock. *Genes Dev* 21, 1687-1700.
- McDonald, M.J., and Rosbash, M. (2001). Microarray analysis and organization of circadian gene expression in *Drosophila*. *Cell* 107, 567-578.
- Myers, M.P., Wager-Smith, K., Wesley, C.S., Young, M.W., and Sehgal, A. (1995). Positional cloning and sequence analysis of the *Drosophila* clock gene *timeless*. *Science* 270, 805-808.
- Nakajima, M., Imai, K., Ito, H., Nishiwaki, T., Murayama, Y., Iwasaki, H., Oyama, T., and Kondo, T. (2005). Reconstitution of circadian oscillation of cyanobacterial KaiC phosphorylation in vitro. *Science* 308, 414-415.
- Panda, S., Antoch, M.P., Miller, B.H., Su, A.I., Schook, A.B., Straume, M., Schultz, P.G., Kay, S.A., Takahashi, J.S., and Hogenesch, J.B. (2002). Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* 109, 307-320.
- Ralph, M.R., and Menaker, M. (1988). A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science* 241, 1225-1227.
- Reddy, P., Jacquier, A.C., Abovich, N., Petersen, G., and Rosbash, M. (1986). The *period* clock locus of *D. melanogaster* codes for a proteoglycan. *Cell* 46, 53-61.
- Reddy, P., Zehring, W.A., Wheeler, D.A., Pirrotta, V., Hadfield, C., Hall, J.C., and Rosbash, M. (1984). Molecular analysis of the period locus in *Drosophila melanogaster* and identification of a transcript involved in biological rhythms. *Cell* 38, 701-710.
- Reppert, S.M., and Weaver, D.R. (2001). Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol* 63, 647-676.
- Roenneberg, T., and Merrow, M. (2003). The network of time: understanding the molecular circadian system. *Curr Biol* 13, R198-207.

(Suite page 47)

(Suite de la page 46)

- Robsash, M. (2008) The transcription-translation loop in *Drosophila*. SRBR meeting, May 17-21, 2008, Sandestin FL USA.
- Rubin, G.M., and Spradling, A.C. (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* 218, 348-353.
- Rutila, J.E., Suri, V., Le, M., So, W.V., Rosbash, M., and Hall, J.C. (1998). CYCLE Is a Second bHLH-PAS Clock Protein Essential for Circadian Rhythmicity and Transcription of *Drosophila* period and timeless. *Cell* 93, 805-814.
- Sato, T.K., Panda, S., Kay, S.A., and Hogenesch, J.B. (2003). DNA arrays: applications and implications for circadian biology. *J Biol Rhythms* 18, 96-105.
- Schaffer, R., Landgraf, J., Accerbi, M., Simon, V.V., Larson, M., and Wisman, E. (2001). Microarray Analysis of Diurnal and Circadian-Regulated Genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13, 113-123.
- Schlosser, A., Vanselow, J.T., and Kramer, A. (2005). Mapping of phosphorylation sites by a multi-protease approach with specific phosphopeptide enrichment and NanoLC-MS/MS analysis. *Anal Chem* 77, 5243-5250.
- Sehgal, A., Price, J., Man, B., and Young, M. (1994). Loss of circadian behavioral rhythms and per RNA oscillations in the *Drosophila* mutant timeless. *Science* 263, 1603-1606.
- Shang, Y., Griffith, L.C., and Rosbash, M. (2008). Light-arousal and circadian photoreception circuits intersect at the large PDF cells of the *Drosophila* brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 19587-19594.
- Shearman, L.P., Sriram, S., Weaver, D.R., Maywood, E.S., Chaves, I., Zheng, B., Kume, K., Lee, C.C., van der horst, G.T., Hastings, M.H., *et al.* (2000). Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* 288, 1013-1019.
- Shearman, L.P., Zylka, M.J., Weaver, D.R., Kolakowski, L.F.J., and Reppert, S.M. (1997). Two *period* homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron* 19, 1261-1269.
- Shin, H.-S., Bargiello, T.A., Clark, B.T., Jackson, F.R., and Young, M.W. (1985). An unusual coding sequence from a *Drosophila* clock gene is conserved in vertebrates. *Nature* 317, 445-448.
- Spradling, A.C., and Rubin, G.M. (1982). Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* 218, 341-347.
- Stoleru, D., Peng, Y., Agosto, J., and Rosbash, M. (2004). Coupled oscillators control morning and evening locomotor behaviour of *Drosophila*. *Nature* 431, 862-868.
- Storch, K.F., Lipan, O., Leykin, I., Viswanathan, N., Davis, F.C., Wong, W.H., and Weitz, C.J. (2002). Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature* 417, 78-83.
- Storch, K.F., Paz, C., Signorovitch, J., Raviola, E., Pawlyk, B., Li, T., and Weitz, C.J. (2007). Intrinsic circadian clock of the mammalian retina: importance for retinal processing of visual information. *Cell* 130, 730-741.
- Sugino, K., Hempel, C.M., Miller, M.N., Hattox, A.M., Shapiro, P., Wu, C., Huang, Z.J., and Nelson, S.B. (2006). Molecular taxonomy of major neuronal classes in the adult mouse forebrain. *Nat Neurosci* 9, 99-107.
- Sun, Z.S., Albrecht, U., Zhuchenko, O., Bailey, J., Eichele, G., and Lee, C.C. (1997). *RIGUI*, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila period* gene. *Cell* 90, 1003-1011.
- Tei, H., Okamura, H., Shigeyoshi, Y., Fukuhara, C., Ozawa, R., Hirose, M., and Sakaki, Y. (1997). Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila period* gene. *Nature* 389, 512-516.
- Tsien, J.Z., Chen, D.F., Gerber, D., Tom, C., Mercer, E.H., Anderson, D.J., Mayford, M., Kandel, E.R., and Tonegawa, S. (1996). Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain. *Cell* 87, 1317-1326.
- Ueda, H.R., Chen, W., Adachi, A., Wakamatsu, H., Hayashi, S., Takasugi, T., Nagano, M., Nakahama, K., Suzuki, Y., Sugano, S., *et al.* (2002a). A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature* 418, 534-539.
- Ueda, H.R., Matsumoto, A., Kawamura, M., Iino, M., Tanimura, T., and Hashimoto, S. (2002b). Genome-wide transcriptional orchestration of circadian rhythms in *Drosophila*. *J Biol Chem* 277, 14048-14052.
- van der Horst, G.T., Muijtjens, M., Kobayashi, K., Takano, R., Kanno, S., Takao, M., de Wit, J., Verkerk, A., Eker, A.P., van Leenen, D., *et al.* (1999). Mammalian *Cry1* and *Cry2* are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* 398, 627-630.
- Vanselow, K., and Kramer, A. (2007). Role of phosphorylation in the mammalian circadian clock. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 72, 167-176.
- Vanselow, K., Vanselow, J.T., Westermarck, P.O., Reischl, S., Maier, B., Korte, T., Herrmann, A., Herzel, H., Schlosser, A., and Kramer, A. (2006). Differential effects of PER2 phosphorylation: molecular basis for the human familial advanced sleep phase syndrome (FASPS). *Genes Dev* 20, 2660-2672.
- Vitaterna, M.H., King, D.P., Chang, A.-M., Kornhauser, J.M., Lowrey, P.L., McDonald, J.D., Dove, W.F., Pinto, L.H., Turek, F.W., and Takahashi, J.S. (1994). Mutagenesis and mapping of a mouse gene, *Clock*, essential for circadian behavior. *Science* 264, 719-725.
- Vitaterna, M.H., Selby, C.P., Todo, T., Niwa, H., Thompson, C., Fruechte, E.M., Hitomi, K., Thresher, R.J., Ishikawa, T., Miyazaki, J., *et al.* (1999). Differential regulation of mammalian period genes and circadian rhythmicity by *cryptochromes 1* and *2*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 12114-12119.
- Wang, Z., Gerstein, M., and Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 10, 57-63.
- Washbourne, P., and McAllister, A.K. (2002). Techniques for gene transfer into neurons. *Curr Opin Neurobiol* 12, 566-573.
- Welsh, D.K., and Kay, S.A. (2005). Bioluminescence imaging in living organisms. *Curr Opin Biotechnol* 16, 73-78.
- Welsh, D.K., Logothetis, D.E., Meister, M., and Reppert, S.M. (1995). Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 14, 697-706.
- Yamaguchi, S., Isejima, H., Matsuo, T., Okura, R., Yagita, K., Kobayashi, M., and Okamura, H. (2003). Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science* 302, 1408-1412.
- Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., Block, G.D., Sakaki, Y., Menaker, M., and Tei, H. (2000). Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 288, 682-685.
- Yildiz, O., Doi, M., Yujnovsky, I., Cardone, L., Berndt, A., Hennig, S., Schulze, S., Urbanke, C., Sassone-Corsi, P., and Wolf, E. (2005). Crystal structure and interactions of the PAS repeat region of the *Drosophila* clock protein PERIOD. *Mol Cell* 17, 69-82.
- Zheng, B., Albrecht, U., Kaasik, K., Sage, M., Lu, W., Vaishnav, S., Li, Q., Sun, Z.S., Eichele, G., Bradley, A., *et al.* (2001). Non-redundant Roles of the mPer1 and mPer2 Genes in the Mammalian Circadian Clock. *Cell* 105, 683-694.
- Zheng, B., Larkin, D.W., U., A., Sun, Z.S., Sage, M., Eichele, G., Lee, C.C., and Bradley, A. (1999). The mPer2 gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock. *Nature* 400, 169-173.
- Zylka, M.J., Shearman, L.P., Weaver, D.R., and Reppert, S.M. (1998). Three *period* homologs in mammals: Differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron* 20, 1103-1110.

July 3-7, 2010



7<sup>th</sup>  
FENS  
FORUM OF  
EUROPEAN  
NEUROSCIENCE

# Séminaire de chronobiologie médicale.

Centre Paul Langevin, Aussois (Savoie, France) 19 - 22 mars 2009

## Résumés des communications

### *Mise en évidence de classes distinctes de chronotoxicité de l'irinotécan chez la Souris*

Constance Ahowesso<sup>1</sup>, Xiao Mei Li, Francis Lévi

<sup>1</sup>INSERM U776 "Rythmes Biologiques et cancers" et Université Paris-Sud

Hôpital Paul Brousse 14-16 Avenue PV Couturier 94800 - Villejuif (France)

La tolérance et l'efficacité des traitements anticancéreux, peuvent varier selon l'heure et la modalité d'administration, mais aussi selon les caractéristiques de l'individu et son mode de vie. L'irinotécan (CPT11) qui est indiqué contre les cancers gastro-intestinaux, est un inhibiteur spécifique de la topoisomérase I. Le CPT11, mais surtout son principal métabolite, le SN38, sont toxiques pour les cellules néoplasiques, mais aussi pour les cellules saines qui prolifèrent dans la moelle osseuse et la muqueuse intestinale.

Selon un essai clinique récent, les doses recommandées et le schéma optimal d'administration diffèrent selon le sexe chez les patients cancéreux (Giacchetti et al. JCO 2006). L'horloge circadienne qui contrôle les processus de détoxification et de prolifération cellulaire semble jouer un rôle important dans ces différences d'activité thérapeutique liées au sexe. Le but de cette étude est d'explorer dans le modèle animal les principales hypothèses biologiques qui rendent compte de ces différences.

Dans une première étape, en prenant comme critère principal de toxicité la perte de poids corporel, nous avons identifié 3 classes de chronotoxicité à partir de profils circadiens de toxicité qui diffèrent en fonction de la lignée et du sexe des souris. Ensuite, nous caractérisons ces 3 classes au plan des organes cibles de toxicité (iléon, côlon, moelle osseuse, hématologie). Nous identifions ensuite les effets de l'irinotécan sur le système circadien, en prenant comme biomarqueurs les rythmes d'activité locomotrice et de température corporelle mesurés par télé-métrie.

Les variations circadiennes de la sévérité de la toxicité hématologique (leucopénie/neutropénie) et des lésions de la muqueuse intestinale sont statistiquement validées et coïncident avec celles de la perte de poids maximales, tout en révélant des différences d'organes cibles prédominants en fonction de la lignée et du sexe. Ces 3 classes présentent des différences marquées de physiologie circadienne, d'a-

près les enregistrements d'activité locomotrice et de température corporelle.

Ces résultats valident l'hypothèse de différentes classes de chronotoxicité chez la Souris. Cette étape nous conduit à rechercher les caractéristiques génomiques et phénotypiques qui déterminent le schéma optimal d'administration du CPT11, dans une perspective de personnalisation de la chronothérapie.

Travail soutenu par la Région Ile de France, et l'Union Européenne dans le cadre du STREP TEMPO (Temporal genomics for tailored chronotherapeutics, LSHG-CT-2006-037543)

Constance.AHOWESSO. bénéficie d'une bourse de l'Association pour la Recherche sur le cancer (ARC, villejuif, France).

### *A Combined Biological and Mathematical Approach for Modelling the PK-PD of the anti-cancer drug Irinotecan at a cell population level Focus on Drug Transport and Circadian Rhythms*

Annabelle Ballesta, Sandrine Dulong, Alper Okyar, Francis Levi, Jean Clairambault

Irinotecan is an anticancer drug which is currently in use for chemotherapy against colorectal cancer. Here we are interested in the molecular mechanisms occurring within a cell population after Irinotecan exposure. We attempt to mechanistically model Irinotecan Pharmacokinetics(PK), which is what the cells

do to the drug (e.g. metabolization, transport), and Pharmacodynamics(PD), which is what the drug does to the cells (e.g. DNA damage, apoptosis).

Experiments on Caco-2 cells (human epithelial colorectal adenocarcinoma cells) have been performed in order to study the drug transport and the influence of circadian rhythms on its Pharmacokinetics-Pharmacodynamics. At the same time, we have built a deterministic ODE-based mathematical model which parameters are fitted to the experimental data obtained on Caco-2 cells.

The experiments have shown evidence for a decrease in the intracellular accumulation of Irinotecan over time: the intracellular concentration increases until 12 hours of exposure and then decreases until 48 hours of exposure. Several hypothesis are currently under study to explain this phenomenon, including the possible involvement of the equilibrium between the lactone and carboxylate forms of Irinotecan, and also the hypothetic induction of ATP-

(Suite page 49)

(Suite de la page 48)

Binding-Cassette(ABC) transporters which are responsible for the drug efflux.

The PK-PD of Irinotecan is also largely influenced by the circadian rhythms of proteins (in particular those of the drug target Topoisomerase I and of the deactivation enzyme UGT1A1), whose mRNA level (and probably protein amount and activity) vary over a 24-hour period both in vivo and in cultured cells.

Taking into account Irinotecan transport kinetics and the circadian control of relevant pharmacologic pathways, we use the mathematical modelling to define theoretically optimal schedule of cell exposure to Irinotecan which will be validated by further experiments on Caco-2 cells.

This study at the cell population scale will be integrated into a whole-body approach aiming at improving the scheme of administration of Irinotecan to patients.

### ***Fatigue versus somnolence en rapport avec les rythmes circadiens***

**Michel Billiard**

Département de Neurologie, Hôpital Gui de Chauliac,  
34295, Montpellier cedex 05

La fatigue et la somnolence sont deux phénomènes distincts et indépendants, mais fréquemment confondus. Ils dépendent étroitement l'un et l'autre de rythmes circadiens et la prédiction de leur survenue est l'objet de nombreuses recherches

La somnolence diurne excessive se définit comme une tendance anormale à s'endormir à une heure et en un lieu inappropriés. Elle résulte d'un manque de sommeil, de la prise de certains médicaments, de troubles du sommeil ou de maladies organiques ou psychiatriques. Sa prévalence est estimée entre 5% et 15%, selon qu'elle est quotidienne, sévère, ou occasionnelle, modérée. Elle peut être quantifiée à l'aide d'échelles subjectives, « échelle de somnolence d'Epworth » et « échelle de somnolence du Karolinska », et de tests objectifs, « test itératif de latence d'endormissement » et « test de maintien de l'éveil ».

La fatigue peut être centrale ou physique. La première se définit comme une lassitude mentale en rapport avec une activité intellectuelle intense. Elle perturbe les fonctions cognitives. La seconde est une lassitude physique dépendant d'un effort physique prolongé. La fatigue est une plainte plus fréquente (20-25%) que celle de somnolence diurne excessive. Plusieurs échelles subjectives de fatigue sont utilisées, « l'inventaire multidimensionnel de fatigue », « l'échelle de fatigue » et « l'échelle de sévérité de la fatigue ».

Si les spécialistes du sommeil distinguent formellement les deux concepts, il faut savoir que les spé-



cialistes du trafic automobile tendent à confondre fatigue et somnolence, ce qui n'est pas pour faciliter la communication entre ces spécialistes.

Différents modèles ont été conçus dans le but de prédire la survenue de fatigue et/ou de somnolence diurne excessive dans des situations de perturbation des rythmes circadiens, telles que le travail posté ou le franchissement rapide de fuseaux horaires.

Le modèle de régulation du sommeil à deux processus (Borbély, 1982) a servi d'inspiration à la plupart de ces modèles. D'après ce modèle la capacité à demeurer éveillé ou à s'endormir résulte de l'action combinée de la dette homéostatique (d'autant plus élevée que le sujet est demeuré plus longtemps sans dormir) et de la phase du rythme circadien. Le processus homéostatique (S) est un processus physiologique à deux seuils, H pour le haut et B pour le bas, et le processus circadien (C) module de façon périodique ces deux seuils. Le processus S augmente exponentiellement pendant la veille jusqu'à ce qu'il atteigne le seuil haut, déterminant l'installation du sommeil. Le processus S décroît ensuite pendant le sommeil jusqu'à atteindre le seuil bas, moment où le sujet se réveille. Une privation de sommeil a pour effet d'augmenter le seuil haut ; à l'inverse la mise en situation de « bed rest » a pour effet d'abaisser ce même seuil et d'induire un sommeil polyphasique.

Parmi les différents modèles proposés aujourd'hui, le modèle à trois processus (Folkard et Akerstedt 1987, 1989) est le seul à avoir été largement validé. Il fait appel à la combinaison de trois processus :

- une composante sinusoïdale endogène (processus C) très faible le matin, atteignant son maximum en fin d'après-midi pour s'abaisser ensuite jusqu'au matin suivant.
- une composante homéostatique (processus S) décroissant exponentiellement pendant toute la durée de la veille et s'inversant en une croissance exponentielle pendant le sommeil

(Suite page 50)

(Suite de la page 49)

- une déviation transitoire du processus S qui suit un réveil forcé (processus W) ou inertie du sommeil

Le modèle permet de prédire le niveau d'éveil et de performance aux différents moments du nyctémère, en situation d'alignement des horaires de veille et de sommeil par rapport aux heures conventionnelles de veille et de sommeil comme en celle de déplacement des heures de veille et de sommeil par rapport aux heures conventionnelles de veille et de sommeil.

### **Horloges circadiennes, prise alimentaire et métabolisme**

**Etienne Challet**

*UPR3212, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, CNRS, Université de Strasbourg*

Les mammifères présentent une alternance quotidienne d'activité et de repos en étroite relation avec le cycle lumière/obscurité. Cette organisation temporelle journalière est sous le contrôle direct d'une horloge principale localisée dans les noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus. Les oscillations circadiennes de cette horloge neuronale résultent de boucles d'autorégulation impliquant plusieurs gènes spécifiques dont *Per1*, *Per2*, *Bmal1*, *Clock*, *Rora* et *Rev-erba*. Le principal synchroniseur de l'horloge suprachiasmatique est la lumière ambiante. De nombreuses horloges secondaires sont présentes dans des régions cérébrales hors noyaux suprachiasmatiques, ainsi que dans la majorité des tissus périphériques, dont le foie, le tissu adipeux et le cœur. Les mécanismes d'oscillations circadiennes font globalement appel aux mêmes acteurs moléculaires. Plusieurs réseaux transcriptionnels font intervenir des gènes/protéines d'horloge (*Bmal1*, *Clock*, *Rora* et *Rev-erba*) dans diverses voies métaboliques, tant glucidiques que lipidiques

La régulation de la prise alimentaire est coordonnée par l'hypothalamus médiobasal, qui perçoit et intègre la majorité des signaux métaboliques provenant de la périphérie par voie sanguine. A cette régulation homéostatique de la prise alimentaire vient s'ajouter une régulation circadienne qui contrôle la rythmicité journalière des repas. Même si ce n'est pas la seule entité oscillante impliquée, l'horloge suprachiasmatique joue un rôle important dans le rythme circadien de prise alimentaire, ne serait-ce que de manière indirecte par le contrôle du cycle veille-sommeil. Une autre entité fonctionnelle, appelée « horloge alimentaire » mais dont la localisation cérébrale reste mal définie, est régulièrement évoquée dans le contrôle circadien de la prise alimentaire.

Les situations de déséquilibres métaboliques chroniques sont associées à des anomalies circadiennes et modifient la synchronisation photique des noyaux suprachiasmatiques, confortant ainsi l'existence

d'une modulation métabolique de la synchronisation photique. L'excès d'apport énergétique lors d'un régime hyperlipidique provoque plusieurs anomalies circadiennes. Notamment, la période endogène de l'horloge suprachiasmatique est allongée par rapport à celle des souris témoins nourries avec un régime standard. Ensuite, l'alternance journalière de prise alimentaire/jeûne est altérée en raison surtout d'une augmentation de l'ingestion de nourriture pendant la période habituelle de repos (le jour chez la souris). Par ailleurs, l'environnement photopériodique (durée relative de la période d'éclairage par 24 h) peut aussi moduler les réponses métaboliques et notamment stimuler l'ingestion spontanée de sucrose et favoriser l'adiposité nutritionnelle induite par le régime gras.

Enfin, la désynchronisation chronique a des effets délétères sur le métabolisme, en favorisant la surcharge lipidique. Or la synchronisation à la lumière de l'horloge suprachiasmatique est diminuée lors d'une obésité nutritionnelle, ce qui se traduit notamment par une resynchronisation plus lente après un décalage du cycle lumière/obscurité.

En conclusion, l'on peut donc postuler qu'une situation de changements récurrents du cycle lumière/obscurité (comme dans le cas du travail posté), qui serait associée à un régime riche en calories et/ou hyperlipidique, pourrait ainsi accélérer la désynchronisation induite, voire augmenter l'ampleur des perturbations métaboliques.

### **Intérêt potentiel d'une préparation de mélatonine à libération contrôlée en chronothérapie du cancer**

**Bruno Claustrat, Jocelyne Brun**

*Service d'Endocrinologie, Centre de Médecine Nucléaire, Hospices Civils de Lyon*

Des dysfonctionnements circadiens sont associés au cancer, par exemple une diminution de l'amplitude du rythme activité-repos dans le cancer colorectal métastatique. Les patients présentent en outre une hétérogénéité inter-individus des rythmes qui peut contribuer à une diminution de l'efficacité de la chronothérapie qui n'est pas adaptée au chronotype de chaque individu.

La mélatonine est une neurohormone qui joue le rôle d'un synchroniseur endogène, capable de renforcer certains rythmes ou de maintenir leur relation de phase. Son point d'impact se situe en particulier sur l'horloge circadienne. Son administration simultanée pourrait contribuer à renforcer l'efficacité de la chronothérapie.

Cette hypothèse n'a pas été vérifiée jusqu'alors, en raison de l'absence d'une préparation de mélatonine à cinétique optimisée. En effet, la mélatonine présente un turn-over très rapide, avec un effet de pre-

(Suite page 51)

(Suite de la page 50)

mier passage hépatique important, conduisant à une demi-vie métabolique de l'ordre de 20 à 40 minutes, lors d'une administration d'une préparation orale à libération immédiate. Une telle préparation qui génère un pic sanguin important et précoce ne simule pas le profil de la sécrétion endogène (qui peut être assimilée à une perfusion prolongée sur environ 8h) et peut même se révéler néfaste en raison d'un effet avance de phase consécutif à une administration vespérale. Par ailleurs, la mélatonine présente des propriétés anti-oxydantes à concentration physiologique (valeur d'un pic nocturne, 30 à 100 pg/ml).

Le développement de préparations à libération contrôlée s'est révélé intéressant dans des situations où une perturbation des rythmes est présente (exemple du patch transmuqueux oral dans la migraine chez la femme).

L'utilisation d'une préparation orale à libération immédiate et prolongée (Circadin®) peut être envisagée pour l'optimisation des traitements chronomodulés pour renforcer la fonction circadienne chez les cancéreux. Cette préparation dosée à 2 mg génère des concentrations maximum plasmatiques supra-physiologiques (environ 1000 pg/ml). Elle s'est révélée efficace dans l'insomnie primaire (diminution des éveils nocturnes et amélioration de la vigilance diurne), chez lesquels elle n'exerce pas d'effet chronobiotique.

Les conditions d'administration dans le cadre de la chronopharmacologie du cancer doivent être définies en tenant compte des interactions médicamenteuses potentielles : la mélatonine est métabolisée essentiellement par Cyp1A2 et Cyp2C19 à un degré moindre. Par ailleurs son effet anti-radicaux libres pourrait contribuer à diminuer l'activité de certains anticancéreux ou au contraire à diminuer leur toxicité.

### ***Transforming the non-visual photopigment melanopsin into a visual photoreceptor***

**Howard M Cooper, Ludovic Mure, Claude Gronfier, Ouria Dkhissi-Benyahya**

*INSERM U846 Stem Cell and Brain Research Institute, Department of Chronobiology, Bron France*

Within the last few years, significant advances have been made concerning the non-visual effects of light on the brain and behaviour. Non-visual light perception includes synchronization of the circadian clock, regulation of the sleep wake-cycle, hormone secretion, metabolism, pupillary reflex, masking effects of light and effects of light on arousal and attention.

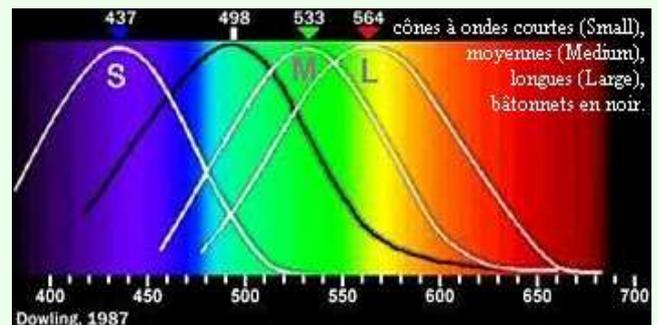
It is now generally accepted that both inner retinal melanopsin ganglion cells and outer retinal cones are involved in non-visual photoresponses. The contribution of rods still remains obscure, although most researchers consider that rods may contribute at low

(scotopic) light levels. Three ideas have gained increasing acceptance in the field. The first is that outer retinal photoreceptors (cones and/or rods) provide phasic responses at the onset and offset of light stimulation, but that their contribution is limited during sustained light exposure. In contrast, the inner retinal melanopsin ganglion cells mainly provide sustained responses to continuous light exposure. Second, the contributions of the different photoreceptor classes depend on their response domains in terms of spectra, irradiance, and duration<sup>7</sup>. Finally, melanopsin ganglion cells are considered to constitute the unique conduit for transmitting non-visual responses to brain centers<sup>10</sup>.

Other key information has also been reported. The expression of outer retinal photoreceptors may regulate the sensitivity and expression of inner retinal photoreceptors, and vice-versa, implying interactions between visual and non-visual networks in the retina. Melanopsin has recently been found to exhibit a photon capture efficiency greater than that of rods. Yet, the overall luminous sensitivity of the melanopsin system is low due to the small amount of the photopigment in the retina. Finally, it has recently been shown that the presence of melanopsin ganglion cells is required not only for circadian synchronization, but also for regulation of the sleep-wake cycle. Previously, it was thought that photic information from rods and cones attained brain sleep centers via melanopsin and non-melanopsin ganglion cells.

Due to its bistable nature and ability to function autonomously in the absence of the retinal pigment epithelium, melanopsin has recently been proposed in cell therapy approaches aimed to restore defective vision in the blind.

Support: FP6-EUCLOCK, Rhône Alpes Cible, Emergence



### ***Désordres métaboliques et système circadien***

**Franck Delaunay, Fabienne Guillaumond, Aline Gréchez-Cassiau et Michèle Teboul**

*Laboratoire de Biologie et Physiopathologie des Systèmes Intégrés, Université de Nice-Sophia-Antipolis, CNRS FRE3094, Nice F-06108, France*

L'incidence de l'obésité et des désordres métaboliques associés tels que le diabète de type II et les maladies cardiovasculaires atteint des proportions

(Suite page 52)

(Suite de la page 51)

épidémiques à l'échelle de la population mondiale. Les projections récentes de l'organisation mondiale de la santé prévoient qu'en 2015, plus de 2 milliards de personnes seront en surpoids, 700 millions seront obèses et que la mortalité due au diabète augmentera de 80 % d'ici là. La progression ininterrompue de ces chiffres alarmants malgré des progrès considérables réalisés ces dernières années dans la compréhension des mécanismes régulant l'homéostasie métabolique suggère que certains facteurs restent à identifier. Depuis quelques années, un faisceau de résultats épidémiologiques et expérimentaux suggère qu'il existe des liens étroits entre le système circadien et le métabolisme. Ainsi par exemple le travail de nuit qui perturbe le système circadien a été associé à des altérations de différents paramètres du syndrome métabolique. Chez la souris, la destruction génétique de l'horloge se traduit par des altérations métaboliques et un phénotype ressemblant au syndrome métabolique chez l'homme. A l'inverse l'alimentation de souris avec un régime hyperlipidique perturbe leur physiologie circadienne. A l'heure actuelle les mécanismes précis qui relient les gènes horloge au métabolisme restent à élucider. Nous avons récemment identifié un régulateur transcriptionnel de la famille Krüppel Like Factors, KLF10 dont le rôle serait de réaliser un lien moléculaire entre les gènes de l'horloge et certaines voies métaboliques dans le foie. Une revue de ces différents travaux sera présentée.

**Organisation circadienne des mécanismes de la chronopharmacologie de l'irinotécan, un inhibiteur de TOP1, dans des cultures cellulaires de cancer colique synchronisées.**

**Dulong Sandrine<sup>1,2</sup>, Ballesta Annabelle<sup>1-3</sup>, Cohen Boris<sup>1,2</sup>, Clairambault Jean<sup>1-3</sup>, Levi Francis<sup>1,2,4</sup>.**

<sup>1</sup> INSERM, U776 « Rythmes biologiques et Cancers », Hôpital Paul Brousse, Villejuif

<sup>2</sup> Université Paris Sud X1, Orsay

<sup>3</sup> INRIA-Rocquencourt

<sup>4</sup> AP-HP, Hôpital Paul Brousse, Villejuif

Les traitements anticancéreux présentent une toxicité et une efficacité qui varient selon l'heure d'administration et de la dose du médicament (Levi F. et Schibler U., 2007, Claudel T. et al., 2007). L'une des cibles principales de toxicité de la chimiothérapie est la muqueuse digestive, dont l'atteinte provoque des nausées, des vomissements et/ou de la diarrhée.

La régulation circadienne de l'expression génique et protéique a été montrée au niveau des cellules épithéliales du tube digestif et plus particulièrement du colon (Sladek M. et al., 2007). L'irinotécan est un médicament anticancéreux qui inhibe la topoisomérase I (TOP1) et est actif chez les patients atteints de cancer colorectal. Il

est cependant toxique pour la muqueuse intestinale. La chronopharmacologie de ce médicament a été démontrée chez la Souris (Ohdo et al., 1997; Filipinski E et al., 2004).

Dans le but de préciser les relations entre chronopharmacocinétique et chronopharmacodynamie de l'irinotécan au niveau cellulaire, nous synchronisons pendant > 48 h par choc sérique des cultures de cellules épithéliales de cancer colique Caco-2. Ce modèle nous conduit à étudier l'organisation circadienne des mécanismes d'action de l'irinotécan à l'échelle cellulaire. Les rythmes d'expression des gènes et/ou des protéines intervenant dans le métabolisme de l'irinotécan ou dans sa cytotoxicité sont mis en évidence pour le gène horloge Rev-erba, les gènes du métabolisme CES, UGT1A1 et le gène de l'enzyme cible TOP1.

L'exposition des cellules synchronisées à l'irinotécan et la mesure des variations du médicament et de son métabolite actif, le SN-38 préciseront la fonctionnalité de ces rythmes d'expression et leurs modifications éventuelles par le traitement. D'autre part, les paramètres PK-PD et leurs contrôles par l'horloge circadienne conduiront à la modélisation des schémas chronothérapeutiques, étape initiale vers une personnalisation de la chronothérapie par irinotécan.

Travail soutenu par une convention INSERM-INRIA et par l'Union Européenne dans le cadre du STREP TEMPO (LSHG-CT-2006-037543-Temporal Genomics for Tailored Chronotherapeutics)

Bibliographie :

Claudel T. et al., FEBS Letters 2007, 581 : 3626-33

Filipinski E. et al., 2004, Chronobiol Int. 2004 Jul;21(4-5):613-30.

Levi F., Schibler U., Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2007, 47 : 593-628

Ohdo et al., J Pharmacol Exp Ther. 1997 Dec;283(3):1383-8.

Sladek M. et al., Gastroenterology 2007, 133 : 1240-9

**Effet du seliciclib, un inhibiteur de kinases cycline-dépendantes, sur l'horloge circadienne**



(Suite page 53)

(Suite de la page 52)

**Elisabeth Filipksi<sup>1,2</sup>, Ida Iurisci<sup>1,2</sup>, Jacques Beau<sup>1,2</sup>, Claire Delehouzé<sup>4</sup>, Laurent Meijer<sup>4</sup>, Francis Lévi<sup>1,2,3</sup>**

<sup>1</sup>INSERM, U776, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, F-94807

<sup>2</sup>Univ. Paris-Sud, UMR S0776, Orsay, F-91405

<sup>3</sup>AP-HP, Unité de Chronothérapie, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, F-94807

<sup>4</sup>C.N.R.S., USR3151, Station Biologique, 29680 Roscoff, France

**Introduction.** Le seliciclib (R-roscovitine) inhibe les kinases cycline-dépendantes (CDKs), par compétition avec l'ATP. Le blocage des CDKs conduit à un arrêt du cycle cellulaire et à l'induction de l'apoptose. L'efficacité anticancéreuse du seliciclib est en cours d'investigation clinique. Chez la souris, le seliciclib inhibe la croissance de l'ostéosarcome de Glasgow, tumeur sans expression circadienne des gènes de l'horloge circadienne *Rev-erba*, *Per2* et *Bmal1*. Administré à ZT3, heure de meilleure efficacité antitumorale, le seliciclib induit l'horloge circadienne tumorale, ce qui n'est pas le cas à ZT19, heure de moindre efficacité (1). Il existe une synergie anticancéreuse entre inhibition du cycle cellulaire et induction de l'horloge tumorale par le seliciclib.

**Objectif.** Dans une perspective chronothérapeutique, nous étudions les effets du seliciclib, selon l'heure d'administration, sur deux composants du système circadien de l'hôte : les rythmes d'activité et de température, biomarqueurs des noyaux suprachiasmatiques (Etude I) et l'horloge moléculaire du foie (Etude II). Dans l'Etude I, nous examinons aussi les effets du seliciclib en fonction de la souche de souris et du sexe des animaux.

**Méthodes.** Etude I : un capteur télémétrique de température et d'activité est implanté dans la cavité péritonéale de 96 souris ♂ et ♀ B6D2F1 et B6CBAF1, synchronisés par LD 12:12, puis mis en obscurité continue (DD). Après 1 semaine en DD, les souris reçoivent une dose unique équitoxique de 600 mg/kg (B6D2F1) ou 900 mg/kg (B6CBAF1) p.o. à l'un de 6 stades circadiens (CT3, 7, 11, 15, 19 ou 23). Les analyses spectrales définissent la période endogène  $\tau$  (h) et l'acrophase du rythme thermique de chaque souris pendant la semaine (S0) qui précède l'administration de seliciclib et pendant la semaine (S1) débutant 2 j après celle-ci. Les paramètres individuels (variations de période et d'acrophase, en rd) sont comparés par ANOVA. Etude II : 64 souris ♂ B6D2F1 porteuses d'OSG et synchronisées par LD 12:12 sont traitées par seliciclib (300 mg/kg po x 5 j) à ZT3 ou ZT19. Après 1 j en DD, le foie est prélevé chaque 6 h pour préciser les profils circadiens d'expression des ARNm de *Rev-erba*, *Per2* et *Bmal1* et *Wee1* par RT-qPCR.

**Résultats. Etude I.** Avant seliciclib, la  $\tau$  endogène de la température varie de 23.2 h chez ♂B6D2F1 à 23.5 h chez ♀B6CBAF1 ( $p = 0.016$ ). Le seliciclib al-

longe  $\tau$  de 0.35 h chez ♂B6D2F1 et raccourcit  $\tau$  de 0.08 h chez ♀ B6D2F1 (souche\*sexe,  $p = 0.002$ ), indépendamment de l'heure d'administration ( $p = 0.076$ ). Le seliciclib provoque un retard de phase moindre à ZT3 (0.73 rd) qu'à ZT7 (1.5 rd) ou ZT23 (1.68) ( $p = 0.05$ ). Le retard de phase moyen est plus prononcé chez ♂B6D2F1 ( $1.2 \pm 0.1$  rd) que chez ♂B6CBAF1 ( $0.5 \pm 0.07$  rd) (souche\*sexe,  $p = 0.001$ ). **Etude II.** Le seliciclib abolit les rythmes des ARNm de *Rev-erba*, *Per2* et *Bmal1* dans le foie des souris traités à ZT3. Ces rythmes sont amortis après traitement à ZT19.

**Conclusions:** Le seliciclib modifie la période et/ou la phase de la coordination circadienne et des horloges moléculaires des tissus périphériques. Cet effet pourrait provenir soit de l'interaction directe du seliciclib avec la caséine kinase I $\delta$  (1) et d'autres cibles enzymatiques, en cours d'identification ou de l'inhibition transitoire de la traduction liée à l'inhibition de CDK7 et CDK9. Le système circadien constitue une cible thérapeutique du seliciclib.

Iurisci et al. *Cancer Res* 2006, 66 :10720-8; *Chronobiology Int*, révision soumise.

Projet financé par l'Union Européenne (STREP TEMPO, contrat LSHG-CT-2006-037543) et par l'ARTBC Internationale, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France. Le seliciclib a été gracieusement fourni par Cyclacel Pharmaceuticals (Dundee, UK).

**Phase I - II study to assess the feasibility and activity of the triple combination of 5-FU/IV - Carboplatin - CPT-11 administered by chronomodulated infusion for the treatment of advanced colorectal cancer - CPT-BE1-603, Final report of an investigator sponsored study**

**C. Focan, F. Kreutz, MP.Graas, L. Longrée, G. Demolin, D. Focan-Henrard, N. Moeneclaeys,**

CHC - Clinique Saint-Joseph, Rue de Hesbaye 75 - 4000 LIEGE

We report the final results of a phase I-II study assessing the feasibility of chemotherapy associating 5 FU, folinic acid, carboplatin, chronotherapy given 4 days every 2 weeks with CPT11 of 1<sup>st</sup> or second line therapy of metastatic colorectal cancer.

## MATERIAL & METHODS

Patients aged over 18 years suffering from an histologically confirmed and measurable colorectal adenocarcinoma, metastatic or in locoregional relapse, were eligible for the study.

This was a first or second line treatment for advanced disease; patients having finished their adjuvant treatment less than 6 months ago could also be eligible. On the contrary, no previous CPT 11 administration was accepted.

After having given their informed consent, patients received every 2 weeks the following treatment :

At day 1 : CPT 11 in chronomodulated infusion from 2 to 8 am (peak at 5 am).

(Suite page 54)

(Suite de la page 53)

At days 2-5 : an associative infusional chronotherapy with 5 FU (700 mg/m<sup>2</sup> per day) and FOL (300 mg/m<sup>2</sup>/day – racemic form or 150 mg/m<sup>2</sup>/day – L-form) infused from 10 pm to 10 am (peak at 4 am) and carboplatin (40 mg/m<sup>2</sup>/day) infused from 10 am to 10 pm (peak at 4 pm).

In the phase I part of the study, 3 cohorts of patients, based on CPT11 doses, were foreseen (cohort 1 : 120 mg/m<sup>2</sup>; cohort 2 : 160 mg/m<sup>2</sup> and cohort 3 : 180 mg/m<sup>2</sup>). According to recommendations for phase I studies, a minimum of 3 to 4 cases per cohort was required. In case of absence of significant DLT (dose limiting toxicity) event (grade 4 haematological or any grade  $\frac{3}{4}$  non haematological toxicity) during the first 2 courses, the next patients could be treated at the superior level. If the 3<sup>rd</sup> level could be obtained with significant tumoral activity ( $\geq 50$  % response rate) , then the study could be pursued as a phase II trial up to 25 evaluable cases.

## RESULTS

### Patients characteristics :

Thirty-six patients were entered in the trial, 11 cases were treated in the phase I (4 in cohort 1 and 2; 3 in cohort 3) and the others in the phase II.

We must point out that 6 patients had previously been operated for their metastatic relapse. Also 19 patients had already received a first line palliative chemotherapy (18 chronotherapy) while 25 cases had received a platinum based chemotherapy (either LOHP : 18; carbo : 6 or cisplatin : 1).

### Phase I :

Cohort 1 : Four patients were treated in cohort 1. No DLT was observed. Patients received respectively 7 and 3 times 12 courses; 3 partial and 1 complete response were recorded.

Cohort 2 : Four patients received 9, 4, 8 and 4 courses and experienced 3 partial responses and 1 no change. A punctual grade 4 granulocyte toxicity was observed; it was not complicated and super-vened in a patient previously treated with carboplatin; 8 courses could be finally delivered to this patient.

Cohort 3 : Three patients received 2, 24 and 16 courses with no DLT; also here 2 PR and 1 no change were recorded. These 3 patients were included in the general analysis at the CPT11 180 mg/m<sup>2</sup> level (thus 3 patients in phase 1 and 25 cases in phase II).

### Phase II :

Twenty-five cases could be treated in this part of the trial.

### Toxicity :

The overall toxicity was remarkably low leading to

only 11-13 % dose-reductions; dose delay were more common (40 % ) related to grade 2 toxicity, compliance of patients, asthenia,...

A gender effect was searched for according to recent data in some chronotherapy trials : effectively, some more skin toxicity and diarrhoea were observed in women ( $p < 0.001$ ). However, these events didn't lead, at the group level, to significant adaptations of chemotherapy.

### Tumoral outcome :

#### Responses :

Two CR , 18 PR, and 3 NC were recorded. Thus, for the whole trial (phases I and II) 3 CR , 26 PR, and 5 NC were observed leading to a 81 % overall response rate and to a 94 % disease control. Response rate was a little bit higher in men (25 cases) than in women (11 cases) (CR/PR/NC : men 2/19/31 versus women 1/7/2).

#### Survivals :

Median progression free (PFS) and overall (OAS) survival for the whole group were respectively 8.8 and 15.6 months.

Patients treated in first line treatment had higher chances of survival than those treated in second line (PFS 1<sup>st</sup> line 9.5 m vs 7.5 m for 2<sup>nd</sup> line –  $p$  ; 0.02, OAS : 40.4 m versus 13.8 m;  $p$  : 0.10). Fifty-three % of patients treated in 1<sup>st</sup> line had a prolonged survival over 2-3 years. Survivals seemed also to be influenced by the number of metastatic site (1 vs > 1) and the sex of patients (trend to longer PFS & OAS in men). Seven patients (19 %) could be reoperated from their residual lesions after the current protocol (5 times hepatectomy; 1 pulmonary metastasectomy; 1 abdominal surgery).

## DISCUSSION – COMMENTS

We confirm in this end-report preliminary data on the feasibility of a quadri-chronotherapy association with 5 FU-FOL carbo and CPT11 for 1<sup>st</sup> or 2<sup>nd</sup> line treatment of metastatic colorectal cancer.

Not only we confirm our previously results but we reinforce our conclusions concerning :

1- The exceptional tolerance of the quadrichronotherapy; also the observed toxicity is far less inferior to that observed either with a traditional FOLFOX, a chronomodulated FOLFOX or with a quadritherapy FOLFOXIRI. In fact, patients didn't suffer from mucitis, GI tract disturbances or peripheral neuropathy.

2- An excellent tumoral activity with over 70 % response rate and prolonged survivals, peculiarly in patients treated in first-line ( $> 50$  % of them are alive at 2+ years).

(Suite page 55)

(Suite de la page 54)

Of course, all those results would merit prospective evaluation versus :

1- More traditional "called" standard therapies (ie FOLFOX, FOLFIRI or even FFCarbo).

2- The addition of biological therapies against EGFR (cetuximab, panitumumab; others,...) or angiogenesis (bevacizumab; others,...).

***Chrono FOLFOX administré en 2 jours toutes les 2 semaines pour le traitement des cancers colorectaux. L'expérience du CHC - Liège (Belgium)***

**C. Focan, G. Demolin, M.P. Graas, L. Longrée, G. Matus, F. Kreutz, N. Moeneclaey, I. Mancini, D. Focan-Henrard**

CHC – Clinique Saint-Joseph-Liège – Belgium

**Introduction :**

La chimiothérapie infusienne « standard » (FOLFOX associant 5 FU, acide folinique et oxaliplatine) proposée pour le traitement du cancer colorectal est habituellement administrée en 48 heures au rythme d'une cure toutes les 2 semaines. Les protocoles équivalents étudiés en chrono-thérapie administrent la même chimiothérapie à la même fréquence mais en 4 jours (chrono-FLO 4), et ce au prix de toxicités différentes : plus de toxicité hématologique pour le FOLFOX standard et plus de toxicité de type diarrhée, mucite et cutanée pour le chrono-FLO 4 (référence : Giacchetti et al, JCO 2006, vol 24, 3562-9).

Dès lors, nous avons proposé à nos patients de recevoir une chrono-thérapie de type FOLFOX mais donnée en 2 jours toutes les 2 semaines.

**Matériel et méthodes :**

110 patients consécutifs et non sélectionnés ont reçu le protocole à titre post-opératoire (adjuvant : 60 cas) ou à titre palliatif (50 cas).

Les caractéristiques des sujets étaient les suivantes : age median : 63,7 (46,6-82,7) ; sex- ratio M/F : 65/55 ; colon/rectum : 82/27 ; Dukes C/D : 51/50 ; N1/2 : 46/29 ; métastases synchrones : 45). Respectivement 13 et 11 cas avaient déjà reçu une chimiothérapie adjuvante ou palliative ; 5 cas avaient reçu du CPT11 et 12 cas un dérivé de platine (dont 10 fois de l'oxaliplatine). Une médiane de 10 cures (adjuvant ; 12 ; palliatif : 8 - range : 2-14) a été administrée .

Le protocole comportait du 5 FU à la dose de 2800-3000 mg/m<sup>2</sup> réparti en 2 jours par infusion chronomodulée de 22 h à 10 h du matin ; de l'acide folinique (300 mg/m<sup>2</sup> - forme levogyre ou 600 mg/m<sup>2</sup> - forme racémique ou sodique) administré au même moment et de l'oxaliplatine 85 mg/m<sup>2</sup> (traitement adjuvant) ou 100 mg/m<sup>2</sup> (traitement palliatif) réparti en 2 jours et infusé en mode chronomodulé de 10 h

à 22 h.

**Résultats :**

**1- Toxicité :**

L'analyse a pu être menée sur 597 cures adjuvantes et 384 cures palliatives. La tolérance s'est avérée excellente, se soldant par des adaptations thérapeutiques dans seulement <= 3 % des cures. L'administration chronomodulée s'est avérée moins toxique que le même programme thérapeutique non chronomodulé au niveau des globules blancs et des granulocytes (p < 0,001), de la mucite (p 0,022), de la diarrhée (p 0,057) et de la neurotoxicité (p < 0,0001).

Les mêmes toxicités ont aussi été plus marquées chez les femmes (p < 0,001) qui présentaient aussi davantage d'anémie (gr 1-2 ; p < 0,001). Par contre, la dose d'oxaliplatine n'a pas influé sur la toxicité !

Les reports de cures furent plus fréquents chez les patients plus âgés (< 70 : 8,2 % versus >= 70 : 14,4 ; p = 0,006), qui ont aussi présenté plus régulièrement de l'anémie (Hb grade 1+2 : < 70 : 24,3 % vs >= 70 : 38,6 % - p < 0,001).

La toxicité maximale (grade 3+4) par patient fut rencontrée dans moins de 17,1 % des cas (granuleux : 17,1 % ; leucocytes 11,3 ; plaquettes 9,4 %, diarrhée 0,8 %, mucite 1,9 %, neurotoxicité 7,5 % ) ; néanmoins, les adaptations thérapeutiques furent effectuées dans 50 % des cas en raison le plus souvent de toxicités mineures, ou d'asthénie...

**2- Evolution tumorale :**

- Traitement adjuvant : la survie sans récurrence s'est établie à 76 % jusqu'à 40+ mois ; la survie globale pour la même période fut de 88 %. Aucune différence significative n'est apparue en fonction de l'âge des patients (< 70 ; >= 70).

- Traitement palliatif : un taux de 52 % de réponses majeures (3 CR, 23 PR) a été objectivé avec un taux de contrôle tumoral de 68 %. Quinze patients (30 %) ont pu bénéficier d'une résection à visée curative de leurs lésions résiduelles après la chimiothérapie d'induction. La survie sans progression fut de 7 mois, tandis que 50 % des patients survivaient entre 31 et 42 mois. Aucune différence ne fut notée selon le sexe. Ici, les patients âgés ont eu une survie plus courte (< 70 : 65 % en vie de 29,7 à 39,5 + mois ; >= 70 : médiane 13,9 % m ; p < 0,01).

**Discussion-Conclusions :**

Notre protocole chrono FOLFOX donné en 2 jours toutes les 2 semaines s'est avéré non seulement mieux toléré que le même schéma délivré en 4 jours (chrono-FFL4) mais aussi beaucoup mieux toléré que le standard de référence (FOLFOX non chrono).

Par ailleurs, les résultats en terme d'évolution tumorale sont excellents et ce, sans ajout de thérapie

(Suite page 56)

(Suite de la page 55)  
ciblée.

Nous concluons donc que vu son index thérapeutique amélioré, le chrono FOLFOX-2-12 peut être proposé comme un standard de référence.

***Evaluation des rythmes biologiques chez les patients cancéreux âgés. Une recherche translationnelle complémentaire dans le cadre du projet pilote trans-hospitalier d'onco-gériatrie développé au CHC - Liège.***

**C. Focan, Th. Guillaume**

CHC – Clinique Saint-Joseph-Liège – Belgium

Soutenus par le plan Cancer Belge, nous développons un projet pilote trans-hospitalier d'oncogériatrie impliquant les acteurs médicaux (staff d'oncologie, de gériatrie et des sous spécialités) et paramédicaux (infirmières, kinésithérapeutes, ergothérapeutes, diététiciens, travailleurs sociaux, psychologues,...) concernés.

300 patients consécutifs, âgés de plus de 70 ans se présentant avec un cancer, seront recrutés et bénéficieront d'une évaluation détaillée gériatrique (CGA : comprehensive geriatric assessment) et oncologique (COA : comprehensive oncological assessment). Le rôle pivot d'une infirmière de coordination apparaît évident. Elle coordonnera aussi la concertation multidisciplinaire qui définira pour chaque patient un plan de traitement individualisé tenant compte des CGA et COA, des co-morbidités, des index prédictifs de toxicité (MAX 2) et veillera à l'encodage précis des données en collaboration avec l'équipe du data-management.

Une recherche translationnelle complémentaire inclura pour ces patients une évaluation simple de leur rythmicité circadienne par la titration du cortisol à 8 h et 16 h et un enregistrement du rythme d'activité-repos durant 3 à 7 jours par actimétrie.



D'autres étapes du programme prévoient d'étudier l'influence sur ces rythmes de programme de revalidation (exercices physiques ; tai-chi ; yoga) et de resynchronisation (mélatonine, bright light,...).

***Sensibilité du système circadien et des fonc-***

***tions non-visuelles à la lumière***

**Claude Gronfier**

INSERM U846, Stem Cell and Brain Research Institute,  
Department of Chronobiology, Bron, France

On sait depuis les années 80 que la lumière permet la synchronisation du système circadien chez l'Homme, pourtant, les voies anatomiques et les mécanismes impliqués sont encore l'objet d'études.

Il est bien établi que des conditions lumineuses adaptées sont nécessaires à la bonne synchronisation de l'horloge circadienne aux 24h. Dans des conditions inappropriées, pathologiques (neurodégénérescences rétinienne, etc.) ou non-pathologiques (travail posté, jet-lag), on observe un déficit de la synchronisation de l'horloge, qui se traduit par une altération de nombreuses fonctions physiologiques (hormones, température centrale, système cardiovasculaire, système immunologique), la dégradation de processus neurocognitifs (performances cognitives, mémoire) et la perturbation du sommeil et de la vigilance.

Les données récentes montrent que, outre le système circadien, un grand nombre de fonctions physiologiques peuvent être stimulées par la lumière et que ses effets dépendent de plusieurs paramètres quantitatifs et qualitatifs (intensité lumineuse, durée, heure d'exposition, spectre lumineux). Il était admis jusqu'au début des années 2000 que les cônes et bâtonnets de la rétine externe étaient les seuls photorécepteurs responsables de la transduction de l'information lumineuse vers. On sait depuis peu qu'un photorécepteur d'un type très différent est impliqué et qu'il projette vers un ensemble de structures cérébrales engagées dans des fonctions non-visuelles (horloge, sommeil, vigilance, cognition, température, reflexe pupillaire, etc.). Ces fonctions sont directement stimulées ou inhibées par la lumière.

L'objectif de la présentation sera de faire un état des connaissances sur la régulation photique du système circadien et des autres voies non-visuelles, les utilisations actuelles de la lumière en clinique et les pistes envisagées.

***Valeur prédictive du rythme d'activité-repos pour la toxicité et l'efficacité de la chronothérapie chez des patients cancéreux non inclus dans un essai clinique***

**A. Karaboue<sup>1,2</sup>, A. Parganiha<sup>1,2,3</sup>, P. Innominato<sup>1,2,4</sup>, I. Iurisci<sup>1,2</sup>, A. Poncet<sup>1,2</sup>, T. Moreau<sup>5</sup>, S. Giacchetti<sup>1,2,4</sup>, M. Bouchahda<sup>1,2,4</sup>, R. Adam<sup>1,2,4</sup> and F. Lévi<sup>1,2,4</sup> pour le Groupe de Chronothérapie de l'ARTBC.**

<sup>1</sup>INSERM, U776 « Rythmes biologiques et Cancers »,  
Hôpital Paul Brousse, 14-16 avenue Paul Vaillant Couturier, 94804-Villejuif (France)

(Suite page 57)

(Suite de la page 56)

<sup>2</sup>Université Paris Sud, SO776, Orsay (France)

<sup>3</sup>School of Life Sciences, Pt. Ravishankar Shukla University, Raipur- 492010, India

<sup>4</sup>Assistance Publique-hôpitaux de Paris, Département de Cancérologie et Centre Hépato-biliaire, Hôpital Paul Brousse, 14-16 avenue Paul Vaillant Couturier, 94804-Villejuif (France)

<sup>5</sup>INSERM U780, Recherche en Epidémiologie et Biostatistique, Villejuif F 94807, France

**Introduction** : Le système circadien contrôle les rythmes d'activité-repos, de veille- sommeil, de prise alimentaire, et de sécrétion du cortisol. L'étude des perturbations du système circadien a mis en évidence son rôle dans plusieurs maladies, en particulier dans le cancer. Dans deux études précédentes, nous avons montré que le rythme d'activité-repos était un facteur pronostique de survie, indépendant des facteurs cliniques connus, chez des patients atteints de cancer colorectal métastatique enregistrés dans un essai clinique (Mormont et al., 2000 ; Innominato et al. soumis). Ces deux bases de données ont été vérifiées, actualisées et fusionnées, en vue d'une méta-analyse. L'objectif de cette étude est de valider les relations établies entre rythme d'activité-repos et survie dans une troisième série de patients non inclus dans un essai clinique et traités par chronothérapie. Nous examinons aussi la valeur prédictive de ce rythme pour la toxicité et la réponse tumorale.

**Patients et méthode** : Nous avons collecté les données de tous les patients traités par chronothérapie à l'Hôpital Paul Brousse et non inclus dans un essai clinique, pour lesquels le rythme d'activité-repos a été enregistré à l'aide d'un actomètre (Mini-Motionlogger, Actigraph, Ambulatory Monitoring Inc., Ardsley, New York, Etats-Unis). Deux paramètres actigraphiques (I<O et r24) précédemment validés ont été calculés pour exprimer le modèle circadien individuel de chaque patient : r24, évaluant la reproductibilité du profil d'activité de 24 heures, et I<O, mesurant la différence relative d'activité entre le jour et la nuit. Des analyses uni et multivariées ont été effectuées pour déterminer le rapport entre les paramètres du rythme circadien d'activité-repos et les caractéristiques et résultats cliniques enregistrés.

**Résultats** : Les données d'actimétrie concernent 117 patients atteints de cancer (colon n=54 ; rectum n=33 ; foie n=3 ; pancréas n=7 ; poumon n= 6 ; ovaire n= 2 ; sein n= 3 ; estomac n = 3 ; prostate n =1 ; œsophage n= 2 ; intestin grêle n= 1, inconnu n=2), d'âge médian = 56 ans [20-83], dont 78 hommes et 39 femmes. 34% avaient plus de 2 sites métastatiques. Une relation statistiquement significative est mise en évidence entre I<O et la toxicité du premier cycle de chronothérapie pour l'anorexie (p=0.0001), la fatigue (p=0.007) et l'anémie (p=0.003). Il existe une relation significative avec la

réponse tumorale (p= 0.014), ainsi que la survie sans progression et la survie globale (p <0.0001). **Conclusion** : L'évaluation du rythme d'activité-repos des patients cancéreux permet de prévoir la toxicité du traitement, son efficacité antitumorale ainsi que la survie sans progression et la survie globale, chez des patients chez qui a été posée une indication de chronothérapie. La fusion des bases de données et leur méta-analyse permettra la consolidation des résultats obtenus séparément dans chaque série, dans la perspective d'une personnalisation de la chronothérapie fondée sur un bilan du système circadien de chaque patient.

Travail soutenu par l'Association pour la Recherche sur le Temps Biologique et la Chronothérapie (ARTBC Internationale, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France)

### *Sleep and Thermoregulation regulation. How interact the two systems ?*

**Kurt Kräuchi**

*thermophysiological Chronobiology, Centre for Chronobiology, Psychiatric University Clinics, CH-4025 Basel, Switzerland*

Sleep is typically initiated on the declining portion of the circadian rhythm of core body temperature (CBT) when its rate of change, and body heat loss, is maximal. The circadian regulation of heat loss in the evening, via distal skin regions, is intimately associated with sleepiness and the ease to fall asleep, whereas the homeostatic increase in sleep pressure does not influence the thermoregulatory system. The rise in heat loss and reduction in heat production during lying down and relaxing behavior before sleep is hypothesized to be part of the role of sleep as a mechanism for energy conservation and may be a remnant of our evolutionary past.

Thermoregulatory changes before and after lights off show clearly that they start before stage 2 sleep begins. After sleep initiation non-rapid-eye-movement-sleep (NREMS) to REMS cycle fluctuations seem to



have minor thermoregulatory functions, especially in humans. In contrast, accumulation of sleep pressure

(Suite page 58)

(Suite de la page 57)

with increasing time awake, increases subjective sleepiness and SWA during the succeeding recovery night, but does not influence the thermoregulatory system. Taken together, the circadian modulation of sleepiness and sleep induction is clearly associated with thermoregulatory changes, but the thermoregulatory system seems to be independent of the sleepiness/sleep regulatory system.

A simplified model is presented which attempts to explain the relationship between these two systems. It is based on the main hypothesis that all thermoregulatory effects which lead to an increase of the thermophysiological shell with respect to the core lead to increased sleepiness and, as a consequence, to increased sleep propensity. However, the sleepiness/sleep regulatory system feeds back onto the thermoregulatory system only indirectly via sleep-related behaviors (e.g. relaxation, lying down).

This conceptual frame represents the background of our actual work. For example, women with vascular dysregulation (main symptom: cold hands and feet) exhibit a phase delay of the thermoregulatory system with respect to their habitual sleep-wake cycle leading to cold extremities in the evening before lights off and prolonged sleep onset latency.

### ***Chrono-pharmacocinétique du CPT-11 dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques : intérêt de l'analyse des quantités résiduelles***

**Fabrice Kwiatkowski**

Unité de recherche clinique, Centre Jean Perrin, 58 rue Montalembert, 63011 Clermont-Ferrand Cedex, France

**Problématique :** Dans le cadre d'une étude sur le 5-FU chez les MCC, nous avons mis au point grâce à l'analyse des cinétiques des concentrations sanguines, un indicateur de réponse métabolique prédictif de la réponse au traitement et des toxicités. Le mode de calcul d'un tel indicateur est-il reproductible dans le cas d'un médicament à 3 compartiments comme le CPT-11 ? Si oui, conserve-t-il son intérêt ?

**Méthodologie et résultats :** Entre 1998 et 2000, dans le cadre d'un essai prospectif testant l'efficacité de l'Irinotecan (CPT-11) selon deux modes de perfusion (chronomodulé (chrono) à 21 heures pendant 6 heures versus continu (flat) entre 8 et 9 heures pendant une heure), 36 patients atteints d'un cancer colorectal métastatique en seconde ligne ou plus sont randomisés. Treize prélèvements sanguins entre h0 et h0+40 sont effectués par patient pour suivre la cinétique du CPT-11 et de son métabolite le SN-38. Vingt-cinq cinétiques sont correctement documentées (13 en chrono et 12 en flat).

Les quantités théoriques de CPT-11 circulant dans le sang sont estimées comme indiqué dans l'article

de 1999, à l'aide d'itérations par minute de perfusion. Quelques difficultés de calculs se rajoutent du fait de la présence de 3 compartiments théoriques (12mn, 2h30 et 14h00 (AFSSAPS, 2006)) lors de la métabolisation du CPT-11. En particulier, à l'analyse, on constate que la totalité de chaque compartiment semble ne pas passer dans le compartiment suivant. Une régression linéaire multiple est utilisée pour calculer des « coefficients de passage » d'un compartiment à un autre.

Les simulations montrent que l'adjonction de ces « coefficients de passage » n'est pas assimilable à une diminution de la demi-vie. Une réduction de demi-vie décale vers la gauche (l'axe des Y) les courbes des concentrations attendues tandis que l'application d'un coefficient de passage abaisse simplement la courbe.

Une différence importante distingue les coefficients de passage vers le 2ème compartiment. Tandis qu'en chrono, 43 % à 46 % passent dans le compartiment 2, seulement 28 % à 30 % passent en flat. On peut émettre l'hypothèse que la chronomodulation du CPT-11 altère son métabolisme. Cela est sans doute une des explications à la moindre toxicité observée dans le bras chrono. Il est envisageable aussi, au vu de la figure 1-bis, que la chronomodulation favorise la transformation du CPT-11 en SN-38 alors que la perfusion en flat favoriserait un autre type de métabolisation, et cela simplement en changeant les caractéristiques des compartiments.

Le 3ème compartiment semble pouvoir être ignoré dans notre analyse car il n'induit pas une meilleure estimation des concentrations mesurées dans le sang. En outre le coefficient de passage dans le 3ème compartiment était négatif dans le bras flat.

L'approximation en flat est moins performante qu'en chrono : le coefficient de corrélation (respectivement 0.76 et 0.93) est inférieur mais aussi l'ordonnée à l'origine est très supérieure à 0 en flat ( $b \approx 880$ ).

### **Estimations des paramètres pharmacocinétiques du SN-38 :**

L'élimination du SN-38 est censée être bi-phasique avec une demi-vie moyenne terminale de 12 heures. Avec cette hypothèse bi-phasique et les données récoltées, il est possible de préciser les demi-vies par approximations. On obtient alors une élimination du SN-38 dont les demi-vies sont 60 minutes et 14 heures dans le bras chronomodulé mais seulement 20 minutes et 14 heures dans le bras flat (coefficient de passage identique à 10%). Ceci résulte peut-être des grandes variabilités inter-individuelles décrites à propos du SN-38. Toutefois, cela pourrait être imputé au schéma de perfusion peut-être capable d'altérer le métabolisme du SN-38 comme on l'a suggéré ci-dessus.

(Suite page 59)

(Suite de la page 58)

Une autre modélisation, plus simple, est possible : c'est celle des concentrations moyennes dans chaque bras en fonction du temps grâce à une régression polynomiale. Ceci permet de comparer les patients qui éliminent et/ou métabolisent le SN-38 différemment relativement à la moyenne de leur groupe. L'aspect pronostique variable de cet indice quant à la survie et aux toxicités pose problème.

**Conclusion :** L'intérêt de l'indicateur « rapport des concentrations mesurées sur estimées » du CPT-11 n'apparaît pas de façon indiscutable. Son calcul est plus difficile que celui du 5-FU, et il pose des problèmes théoriques. Il permet partiellement de distinguer dans le bras chrono les patients qui vont progresser et ceux qui risquent plus les toxicités. L'élimination du CPT-11 apparaît plus rapide chez ces patients, ce qui induit probablement une biodisponibilité plus rapide et importante de son métabolite, le SN-38, cent fois plus actif. Au vu des résultats, on ne peut garantir que la dégradation du CPT-11 en SN-38 soit le responsable principal des toxicités. Il semble en effet que les toxicités ne sont pas proportionnelles dans cette étude à ces concentrations : peut-être que d'autres produits résultant de la métabolisation du CPT-11 sont-ils aussi à l'origine de toxicités.

La métabolisation du CPT-11 en SN-38 (principalement par les voies hépatique et biliaire) reste le principal point d'achoppement de cette approche sachant que c'est ce métabolite qui est le principe actif majeur. A priori, c'est donc la cinétique du SN-38 qu'il faudrait préférentiellement modéliser, afin de voir si les variations des concentrations mesurées avec celles prédites sont un facteur pronostique. Nos calculs préliminaires n'ont pas produit de résultats probants qui soient meilleurs que l'utilisation directe des simples cinétiques des concentrations sanguines.

**Meta-analysis of gender effect for 1st line chronomodulated 5-fluorouracil-leucovorin-oxaliplatin (ChronoFLO) vs FOLFOX or constant infusion (conventional delivery, CONV) against metastatic colorectal cancer (MCC) in 3 international controlled Phase III randomized trials (RT).**

**Francis Lévi, Pasquale Innominato, Antoine Poncet, Thierry Moreau, Stefano Iacobelli, Christian Focan, Carlo Garufi, Georg Bjarnason, René Adam, Sylvie Giacchetti for the ARTBC Chrono-therapy Group**

**Background:** Gender predicted for the most effective schedule in a RT of ChronoFLO vs CONV against MCC: overall survival (OS) was significantly increased in men on chronoFLO vs FOLFOX, whereas the reverse was found in women (Giacchetti et al. JCO 2006).

**Methods:** To further assess the relevance of gender

for patient (pt) outcome, meta-analysis was performed on individual pt data (IPD) from 3 RT in 845 MCC pts treated with chronoFLO vs CONV (Lévi et al. JNCI 1994; Lancet 1997). From 1990 to 2002, 346 F and 499 M (median age: 61y) were registered at 36 centers. Data bases were merged with updating at 9 years after inclusion of the 1<sup>st</sup> pt. Figures of the main prognostic factors were comparable in each RT according to gender and treatment arm (PS=0, 46% pts; liver M, 85% pts; liver involvement >25%, 41% pts; lung M, 37% pts; CEA>10, 56% pts).

**Results:** No significant difference was found as a function of delivery schedule or gender in the whole population for Response Rate (RR), Progression-Free Survival (PFS) and OS. However, men on chronoFLO had highest RR, longest PFS and longest survival. PFS and survival were lowest in women on chronoFLO and intermediate in men or women on CONV. The rate of complete macroscopic resections of liver metastases (R0+R1) was 12.5% in men on chronoFLO vs 7.8-8.5% in men on CONV or in women on either schedule. A complete histologic response of liver metastases was documented in 2.1% of the men on chronoFLO vs 0-1.1% in the other groups. The relative risk of an earlier death in men vs women was 0.76 [95% CL, 0.91 to 0.94] on chronoFLO and 1.24 [0.99 to 1.56] on CONV.

**Conclusion:** This IPD meta-analysis of 3 RT in MCC with a minimum follow up of 5 years confirms that men benefit from chronoFLO as compared to CONV delivery, with regard to long term outcome and medico-surgical strategy. ChronoFLO should be preferred to conventional oxaliplatin-5-FU-LV schedules in men with MCC.

**Support:** ARTBC Internationale, P. Brousse Hospital, Villejuif, France

**Control of cancer progression through rhythmic induction of tumor stress genes with circadian meal timing**

**XiaoMei Li<sup>1,2</sup>, Franck Delaunay<sup>3</sup>, Sandrine Du-long<sup>1,2</sup>, Bruno Claustrat<sup>4</sup>, Sinisa Zampera<sup>5</sup>, Yoshihiro Fujii<sup>1,2</sup>, Michèle Teboul<sup>3</sup>, Jacques Beau<sup>1,2</sup>, Francis Lévi<sup>1,2,6</sup>**

<sup>1</sup>INSERM U776 « Rythmes biologiques et cancers », 94800 Villejuif, France

<sup>2</sup>Université Paris-Sud, UMR-S0776, 91405 Orsay, France

<sup>3</sup>FRE 3094, Université de Nice, Nice, France

<sup>4</sup>Centre de Médecine Nucléaire, Hôpital Neurocardiologique, Lyon, France

<sup>5</sup>Biosciences, Créteil, France

<sup>6</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Unité de Chronothérapie, Département d'Oncologie Médicale, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France

**Background:** The disruption of circadian clocks was associated with tumor progression. Meal timing is able to reset the circadian oscillations of clock genes

(Suite page 60)

(Suite de la page 59)

in peripheral organs, as well as slow down malignant growth. **Objectives:** To slow down cancer progression through the reinforcement of host and tumor circadian clocks or rhythmic signaling pathways with meal timing. **Methods:** Pancreatic adenocarcinoma-bearing mice were synchronized with 12 hours (h) of light/darkness. Mice were fed ad libitum or with meal timing from Zeitgeber Time (ZT) 2 to ZT6, with normal or fat diet. Tumor weight was measured daily. The host circadian timing system was assessed through 1/ circadian biomarkers: telemetered rest-activity and body temperature, plasma corticosterone and insulin-like growth factor-I and 2/ liver and tumor molecular clock, with qPCR for rhythmic mRNA expression of clock genes *Rev-erba*, *Per2* and *Bmal1* and clock-controlled stress genes *Hspa8* and *Cirbp*. Tumor gene expression profiling was determined with DNA microarrays at endogenous Circadian Time (CT) 4 and at CT16. Analyses of variance, power spectrum and cosinor validated the results.



**Results:** Tumor growth was nearly halved in mice on meal timing as compared to ad libitum (ANOVA,  $p=0.011$ ), without any influence of diet ( $p=0.533$ ) or body weight. MT significantly modified the 24-h expression pattern of 423 genes in tumor transcriptome, mostly in stress, cell cycle and metabolism domains. Meal timing advanced the phases of host circadian biomarkers and liver molecular clock by 8 to 12 h and increased rhythm amplitudes. Meal timing nearly doubled the circadian amplitude of host body temperature ( $p<0.001$ ) and induced strong rhythmic transcription of temperature-sensitive stress genes *Hspa8* and *Cirbp*, two regulators of cell cycle and apoptosis, in tumor ( $p<0.01$ ). **Conclusions:** MT inhibited tumor progression through enhanced host circadian coordination. Meal timing bypassed tumor defective clocks and induced rhythmic stress and cell cycle genes transcription in tumor.

Acknowledgements

This work was supported by the European Union through the Network of Excellence BioSim [LSHB-CT-2004-005137] and the

Strep Project TEMPO [LSHC-CT-2006-037543]; by Action Thématique Concertée Nutrition [4NU12G], INSERM, France; and by Association International pour la Recherche sur le Temps Biologiques et la Chronothérapie, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France

### *Mammalian circadian in vitro systems*

Ripperger, J. A.

Dep. of Medicine, Unit of Biochemistry, University of Fribourg; 5, rue du Musée, 1700 Fribourg, Switzerland

For a long time, researchers considered the SCN as the only real clock generating robust circadian rhythms. The circadian clocks in the periphery were regarded as "slave oscillators" that were incapable of maintaining rhythms without a permanent input from the SCN. This picture changed with the advances of organ cultures from transgenic rats and mice and with the upcoming mammalian in vitro models. The peripheral oscillators are as robust as the oscillator in the SCN. However, the input to both types of oscillators may be different. A considerable progress of our understanding of the input pathways to the peripheral oscillators derived from mammalian circadian in vitro systems. In 1998, Aurelio Balsalobre in Geneva realized that the expression of the *Dbp* gene, an output transcription factor, transiently decreased after a serum shock in Rat-1 fibroblasts. About 24 hrs after the shock, the expression levels were up again but continued to decrease thereafter. A careful analysis revealed that this rhythmic behavior proceeded for multiple days and that this was not specific for this gene but that many circadian markers followed the same pattern. The phase differences between all the circadian markers faithfully reflected what was known about the phase differences found in the SCN and peripheral oscillators. In addition, immediately after the serum shock, an induction of *Per1* and *Per2* occurred. Therefore, it was concluded that a serum shock induced free-running circadian rhythms with a period length of 22 hrs in Rat-1 fibroblasts, which have not been in contact with the SCN for at least twenty years. Subsequent experiments demonstrated that free-running circadian rhythms could also be induced in mouse embryonic fibroblasts (MEF) derived from different genetic backgrounds. Under these experimental conditions the period of the MEFs in vitro resembled the period of the different mutant mouse strains. For that reason, the mammalian in vitro systems closely reflect the animal models. One major question remained. Are the circadian rhythms in the tissue culture cells newly induced, or are the circadian oscillations of each single cell synchronized? This question was answered by the inspection of individual cells in culture using rhythmically expressed, short-lived fluorescent protein. Under normal culture conditions, the individual cells display circadian rhythms in different phases. After a serum shock, all the different cells become synchronized. This is possible because tissue culture cells show a typical type-0

(Suite page 61)

(Suite de la page 60)

phase response. Independent of the position of the oscillator within the circadian cycle a strong signal resets the oscillator always to the same point. Therefore, the oscillators in a culture start cycling from the same point after a serum shock. Using a similar culturing system expressing rhythmically luciferase protein and computer derived simulations, it was proven that the oscillators in cultured fibroblasts were capable of generating robust circadian rhythms similar to the SCN neurons. The signaling pathways that were associated with the synchronization of circadian oscillators in vitro were manifold. In addition to glucocorticoids, researchers found an impact of cAMP/CREB signaling, protein kinase A and C signaling, Ca<sup>2+</sup> signaling, IL-6 signaling, and of MAP kinase signaling, and of PPARα agonists (fenofibrate) on Per1 induction and subsequent synchronization of the circadian oscillators in various tissue culture cell models. A further breakthrough was the coupling of the mammalian in vitro systems with real-time bioluminescence monitoring. In these systems, a luciferase reporter gene is driven by a circadian regulatory element. Different systems exploit the regulatory region of the Per1, Per2, Bmal1, Dbp or Rev-Erba gene. After the synchronization of the circadian oscillators, it is possible to measure the effect of a given treatment on the magnitude, amplitude or phase of a given reporter gene over the course of multiple circadian cycles. It is possible to exploit these techniques for the high-throughput screening of compounds. The experiments can easily be converted into cotransfection assays to reveal the function of a certain protein on the oscillator, or coupled to RNA interference to monitor the effect of the lack of a certain protein on the oscillator. A recent variation of this technique is the transfer of circadian reporter genes by lentiviral-mediated infection. This allows the stable integration of circadian reporter genes even in cells that are normally not easy to transfect. In this manner it was possible to measure the period length of human fibroblasts derived from skin biopsies indicating that the human fibroblasts behave similarly as mouse and rat fibroblasts. Are the input pathways to the SCN fundamentally different from the ones immigrating into the peripheral oscillators? Surprisingly, the answer is no. In an elegant series of experiments, fibroblasts were stably transfected with an expression vector for the photoreceptor melanopsin. These fibroblasts displayed a type-1 phase shift behavior in response to low light intensities and a type-0 phase shift behavior in response to higher light intensities. The phase shift behavior could be blocked by inhibitors of Ca<sup>2+</sup> signaling or phospholipase C. This indicates that the signaling pathways leading to the circadian oscillators of the SCN or of the periphery are very similar but some essential components are missing. Nevertheless, it is tempting to speculate that the process of phase shifting in both types of

oscillators is essentially the same. Both kinds of oscillators use the induction of specific components to affect the phase of the oscillator for the next circadian cycle. Overall, the mammalian in vitro systems have greatly enhanced our knowledge on the molecular make up of the circadian oscillator.

**Gènes du rythme et analyse de données transcriptomiques : comment réduire les taux de faux positifs/négatifs ?**

**Vuillaume ML, Kwiatkowski F, Uhrhammer N, Bidet Y, Bignon YJ**

Laboratoire d'oncologie médicale, Centre Jean Perrin, 58 rue Montalembert, 63011 Clermont-Ferrand Cedex, France

**Problématique** : La grande majorité des études relatives aux données transcriptomiques sur plusieurs milliers de gènes avec un nombre d'échantillons réduit pose des problèmes statistiques majeurs, en particulier un risque de 1<sup>ère</sup> espèce souvent réductrice, et donc un très grand nombre de faux positifs/négatifs. Les corrélations présentes dans les données d'expression peuvent contribuer à augmenter ce taux de faux positifs/négatifs. Ces corrélations peuvent être introduites par le rythme circadien. En effet, il a été montré que l'expression de 2 à 10% des gènes selon les tissus était régulée de façon circadienne par les gènes du rythme (une douzaine chez l'homme). Ces gènes s'expriment de façon rythmique avec des variations journalières et inter-individuelles notamment dans les lymphocytes. Par exemple, selon le moment de la journée, certains gènes comme les gènes PER et BMAL sont plus ou moins exprimés dans le sang, faisant varier en proportion l'expression des gènes en aval dans les voies de signalisation. L'étude des corrélations entre une fonction biologique et les données d'expression repose alors sur un « signal brouillé » du fait des régulations circadiennes partiellement individu-dépendantes. Nous proposons une méthode simple qui vise à limiter l'impact des gènes du rythme dans l'analyse de ce type de données.

**Matériels** : Deux groupes de 15 personnes (mutées/non mutées BRCA1) ont été incluses dans une étude prospective testant une possible différence d'expression transcriptomique liée à une mutation de BRCA1, ce dans les lymphocytes du sang périphérique. Les prélèvements ont été réalisés à différents moments de la journée (entre 8h30 et 13h30). Sur 41 000 transcrits analysés, 18 546 présentaient une expression supérieure au bruit de fond. Une première analyse supervisée a permis de montrer entre les 2 groupes une différence d'expression pour 133 gènes mais aucun, au vu de la littérature, n'avait un lien avéré avec BRCA1. Ce nombre correspondait peu ou prou à ce que l'on pouvait attendre simplement du fait du hasard, c'est à dire que ces gènes étaient probablement des faux positifs.

(Suite page 62)

(Suite de la page 61)

**Méthode** : Une expression significative dans les lymphocytes a été retrouvée pour les gènes du rythme suivants : BMAL1-2, CKI $\epsilon$ , CRY1-2, PER1-2 et TIM. Une étude de corrélation a fait apparaître un lien significatif entre ces gènes et environ 23% des autres gènes dont la moitié pour le gène PER1 :

Pour retirer l'influence de la périodicité induite par les gènes du rythme, deux transformations ont ensuite été effectuées sur les expressions des gènes corrélés, selon le type de corrélation :

Positive : l'expression des gènes a été divisée par l'expression du gène du rythme associé

Négative : l'expression a été multipliée par l'expression du gène du rythme associé.

#### Résultats :

A l'aide des expressions corrigées, une nouvelle analyse supervisée a été effectuée au sein de ces 4343 gènes.

Conformément à nos attentes, le nombre de disparitions et d'apparitions de corrélations a été proportionnel au niveau de corrélation des gènes du rythme au statut mutationnel (annulation du biais de confusion). En première analyse, on peut penser qu'en cas de corrélation significative du gène du rythme au statut mutationnel, ce sont principalement

des faux positifs qui ont disparu tandis que quelques faux négatifs ont été mis en évidence. Dans le cas contraire (absence de corrélation entre le gène du rythme et le statut), ce sont surtout des faux négatifs qui apparaissent.

Au total 297 gènes ont été retenus après correction. Parmi ces 297 gènes, 160 ont une fonction bien déterminée et certains codent pour des partenaires physiologiques de BRCA1 (E2F4, BAP1, AKT1, CHEK2). La plupart de ces gènes sont impliqués dans des voies de signalisation liées au gène BRCA1.

**Conclusion** : Cette méthode simple semble à même de réduire le nombre de faux négatifs/positifs. En dépit de l'intérêt de certains des gènes retenus, on ne peut cependant en garantir sa validité du fait de la faiblesse de notre échantillon de travail. D'autres méthodes ont été décrites pour pallier le même problème, comme l'utilisation des corrélations partielles. Une modélisation de type Monte-Carlo est prévue afin de comparer les diverses méthodes.

Enfin, une des limites à notre approche concerne les cascades de gènes qui induiraient des expressions largement décalées dans le temps par rapport à celle du gène du rythme promoteur. Dans un tel cas de figure, la correction proposée peut être inopportune.

LE CONGRÈS  
DU  
SOMMEIL

LE CONGRÈS  
SOMMEIL

Marseille 2009  
19 AU 21 novembre  
Parc Chanot

SFRMS

www.lecongresdusommeil.fr

36<sup>e</sup> COLLOQUE  
DE LA  
SOCIÉTÉ DE NEUROENDOCRINOLOGIE

1<sup>er</sup> COLLOQUE FRANCO-ITALIEN

Nice

15-18 SEPTEMBRE 2009

SENE

Comité d'organisation  
France : Jean-Louis Habon (Président du Comité d'Organisation),  
Mélina Chaus, Grégory Condoulet, Thierry Coppola, Alice Gayton,  
Emmanuel Lippman, Françoise Pesse et Corinne Rouvine  
Italie : Elio Ghini (Vice-présidente du Comité d'organisation)

Contact : <http://ne2009.org>

Université  
de la Méditerranée

CPT



## Rythmicité comportementale et vie sociale chez la caille japonaise

Laureline FORMANEK

### Résumé

Cette thèse décrit les liens qui peuvent exister entre la rythmicité

arythmiques. Nous avons ensuite montré que la rythmicité comportementale d'un individu pouvait prédire la qualité de son intégration dans un groupe stable de cailles. Les cailles présentant une rythmicité circadienne nette

comportementale et les éléments de la vie sociale chez la caille japonaise (*Coturnix c. japonica*). Deux lignées d'oiseaux ont été produites au cours de ce travail : des cailles présentant une rythmicité circadienne d'activité alimentaire nette et des cailles présentant une arythmie circadienne d'activité alimentaire. Nous avons d'abord mis en évidence un lien entre rythmicité comportementale et certaines

caractéristiques individuelles telles que la motivation sociale, paramètre à l'origine de toute relation sociale. Les cailles présentant une rythmicité circadienne nette sont également plus motivées socialement que les cailles

s'intègrent mieux au sein d'un groupe que les cailles arythmiques. Nous avons enfin montré que le développement ontogénétique de la rythmicité comportementale des jeunes cailles pouvait être modifié, après la naissance, par influence sociale et plus particulièrement par influence maternelle. La mère structure les systèmes circadien et ultradien de ses cailleteaux. De plus, les effets

maternels postnataux sur la rythmicité comportementale du jeune sont liés au phénotype rythmique de la mère. Ainsi, ce travail démontre l'importance et la diversité des liens entre vie sociale et rythmicité comportementale chez un

N° Ordre de la thèse : 3919

#### THESE

présentée

DEVANT L'UNIVERSITE DE RENNES 1

pour obtenir

le grade de : DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE RENNES 1

Mention : BIOLOGIE

par

**Laureline FORMANEK**

Equipe d'accueil : UMR 6552 Ethologie animale et humaine, Université - CNRS  
Ecole doctorale : Vie - Agro - Santé  
Composante universitaire : UFR SVE

### Rythmicité comportementale et vie sociale chez la caille japonaise

Soutenue le 25 juin 2009 devant la commission d'examen :

#### Composition du jury :

Mr Etienne CHALLET (D.R. CNRS Strasbourg)  
Mme Cécile ARNOULD (I. T. A INRA Nouzilly)  
Mr Raymond NOWAK (D.R. INRA Nouzilly)  
Mme Martine HAUSBERGER (D.R. CNRS Rennes)  
Mme Marie-Annick RICHARD-YRIS (Pr. Université de Rennes 1)  
Mme Sophie LUMINEAU (M.C. Université de Rennes 1)

Rapporteur  
Rapporteur  
Examinateur  
Examinatrice  
Directrice  
Co-directrice

## *Chronobiologistes...*

*encore un effort pour vos contributions à Rythmes.*

Vous devez participer à la vie de la Société Francophone de Chronobiologie en envoyant vos contributions à Fabienne Aujard, rédactrice en chef de 

Seules sont acceptées les contributions sous forme informatique, textes et figures, noir et blanc et couleurs. Cela assure la qualité de ce qui est produit, d'autant plus appréciable si vous optez pour la lecture électronique, qui, elle, est en couleurs !

Vous devez envoyer vos contributions en document attaché. Les fichiers seront préférentiellement sauvegardés au format \*.doc, \*.rtf, ou \*.txt après avoir été produits par un traitement de texte standard. Pour tout autre format que ces formats répandus, nous consulter.

Il est impératif de nous faire parvenir un fichier texte sans retours à la ligne multiples, tout en conservant l'accentuation. De même, ne mettez pas de lignes blanches pour marquer les paragraphes ni mises en page complexes, que nous devons de toutes façons changer pour rester dans le style du journal.

Les images pourront être en tiff, bmp, gif, jpeg, jpg ou png. Rythmes est mis en page sur un PC, donc les formats PC sont préférés, car cela évite des manipulations.

Enfin, vous enverrez vos contributions par courrier électronique à [fabienne.aujard@wanadoo.fr](mailto:fabienne.aujard@wanadoo.fr) avec copie à [jean-francois.vibert@upmc.fr](mailto:jean-francois.vibert@upmc.fr) et [jacques.beau@inserm.fr](mailto:jacques.beau@inserm.fr).

**Fabienne Aujard**  
**Jacques Beau**  
**Jean-François Vibert**

### *Société Francophone de Chronobiologie*

<b>Président</b>	Bruno Claustrat <a href="mailto:bruno.claustrat@chu-lyon.fr">bruno.claustrat@chu-lyon.fr</a>
<b>Vice président</b>	Howard Cooper <a href="mailto:howard.cooper@inserm.fr">howard.cooper@inserm.fr</a>
<b>Secrétaire général</b>	Etienne Challet <a href="mailto:challet@neurochem.u-strasbg.fr">challet@neurochem.u-strasbg.fr</a>
<b>Secrétaire adjointe</b>	Sophie Lumineau <a href="mailto:Sophie.Lumineau@univ-rennes1.fr">Sophie.Lumineau@univ-rennes1.fr</a>
<b>Trésorière</b>	Fabienne Aujard <a href="mailto:fabienne.aujard@wanadoo.fr">fabienne.aujard@wanadoo.fr</a>
<b>Trésorière adjointe</b>	Berthe Vivien-Roels <a href="mailto:vivien@neurochem.u-strasbg.fr">vivien@neurochem.u-strasbg.fr</a>

### *Ont contribué à ce numéro*

**Fabienne Aujard**  
**Jacques Beau**  
**Etienne Challet**  
**Bruno Claustrat**  
**Laureline Formanek**  
**Sophie Lumineau**  
**Jérôme Menet**  
**Jean-François Vibert**

Les articles publiés dans ce bulletin reflètent l'opinion de leurs auteurs, et en aucun cas celle de la Société Francophone de Chronobiologie.

Rythmes est édité par la Société Francophone de Chronobiologie, Siège Social : Faculté des Sciences et Techniques. Laboratoire de Biologie Animale et Appliquée, 23 rue du Dr Paul Michelon, 42023 Saint-Étienne Cedex 2. Directeur de la publication : Bruno Claustrat. Rédactrice en chef : Fabienne Aujard. Comité de rédaction : Fabienne Aujard, Jacques Beau, Jean-François Vibert. Réalisation : Jacques Beau et Jean-François Vibert. Impression : Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris.

**Site Web :** <http://www.sf-chronobiologie.org> **Numéro ISSN 0154-0238.**