

Une horloge cérébrale multi-oscillateurs chez la drosophile

François ROUYER

*Institut des Neurosciences Paris-Saclay (NeuroPSI)
Université Paris-Saclay / CNRS, Saclay.*

Des mécanismes conservés au cours de l'évolution

Les organismes vivants sont soumis aux cycles jour-nuit de 24 h imposés par la rotation de la Terre. Ils ont développé une horloge circadienne qui permet d'anticiper les changements environnementaux de façon à adapter la physiologie et le comportement à cet environnement cyclique. Ces horloges sont présentes dans l'ensemble du monde vivant, et montrent une étonnante similitude des mécanismes qui permettent de générer une oscillation moléculaire. Dans le monde animal, ces mécanismes reposent sur des protéines largement conservées au cours de l'évolution, y compris entre insectes et mammifères, même si l'organisation cellulaire de l'horloge cérébrale qui contrôle les rythmes veille-sommeil est très différente.

La découverte des premiers mutants de l'horloge au début des années 70 et l'attribution du prix Nobel de médecine et physiologie en 2017 à trois chercheurs américains (Jeffrey Hall, Michael Rosbash, Michael Young) ayant défini les bases moléculaires de l'oscillateur chez la drosophile, montrent l'importance de cet

organisme comme modèle d'étude des rythmes circadiens. Les gènes impliqués ainsi que le mécanisme de boucle de rétroaction transcriptionnelle négative (Figure 1) sont très conservés, ce qui a permis l'identification de gènes mammifères à partir de ceux de la drosophile (1). Une différence notable par rapport aux mammifères, réside dans la fonction de la protéine Cryptochrome (Cry), qui chez ces derniers, s'associe à Period (Per) pour réprimer l'activité des facteurs de transcription Clock et Bmal1. Chez la drosophile, Per s'associe avec Timeless (Tim) pour inhiber Clock et Cycle (orthologue de Bmal1), tandis que Cry est, comme chez les plantes, un photorécepteur sensible à la lumière bleue. En présence de lumière, Cry se lie à Tim, et le recrutement subséquent de la protéine Jetlag permet l'ubiquitylation puis la dégradation de Tim par le protéasome, induisant ainsi un changement rapide de phase de l'oscillation moléculaire. L'analyse des gènes *cry* chez différents insectes indique que certains d'entre eux, telle l'abeille, possèdent un gène *cry* proche des gènes *cry* de mammifères mais pas de gène *tim*, tandis que d'autres (moustique, ver à soie) possèdent à la fois

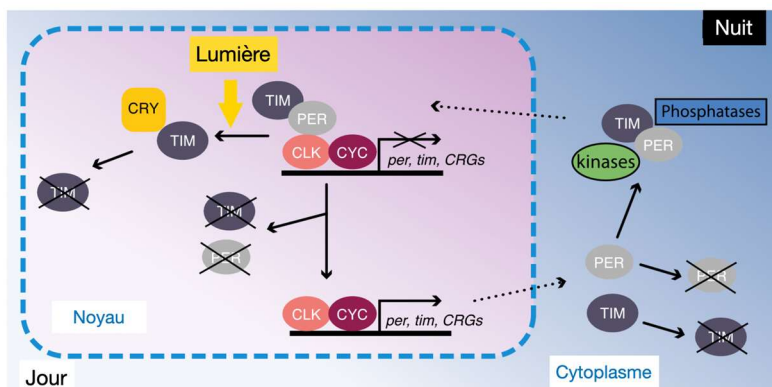


Figure 1 : La boucle de rétroaction transcriptionnelle négative.

Le soir, CLK et CYC activent la transcription des gènes *per* et *tim*, ainsi que des gènes régulés par l'horloge (clock-regulated genes ou CRG). Les protéines PER et TIM inhibent CLK et CYC puis sont dégradées. Par ailleurs, la lumière induit la formation d'un complexe CRY-TIM et la dégradation de TIM.

un gène *cry* de type drosophile et un gène *cry* de type mammifère. L'organisation moléculaire de ces horloges d'insectes, différentes de celle de la drosophile, reste très mal connue. La présence de Cry dans les horloges cérébrales et périphériques (hors cerveau) de la mouche confère aux cellules d'horloge une capacité photoréceptrice intrinsèque, rendue possible par le caractère translucide de la cuticule entourant les tissus. Les horloges périphériques ne dépendent donc pas du cerveau pour leur synchronisation par la lumière, définissant une organisation décentralisée du système circadien. Chez la drosophile, une majorité des neurones de l'horloge cérébrale expriment Cry qui les rend directement sensibles à la lumière bleue, et ils reçoivent de plus des informations lumineuses *via* les différentes rhodopsines du système visuel (sept sont présentes chez la drosophile) dont les spectres d'absorption vont de l'ultra-violet au rouge proche (2). En conséquence, seule la perte concomitante des deux systèmes photorécepteurs conduit à une incapacité d'entraînement par la lumière. Les cellules photoréceptrices exprimant les rhodopsines sont présentes dans les ommatidies des yeux composés, dans les ocelles situés sur le dessus de la tête, et dans un petit organe intra-rétinien appelé eyelet de Hofbauer-Buchner issu de l'organe visuel larvaire (Figure 2). Bien que le rôle précis des différents organes et des différentes rhodopsines soit encore mal compris, des contributions multiples sont utilisées par les neurones d'horloge pour synchroniser les rythmes veille-sommeil.

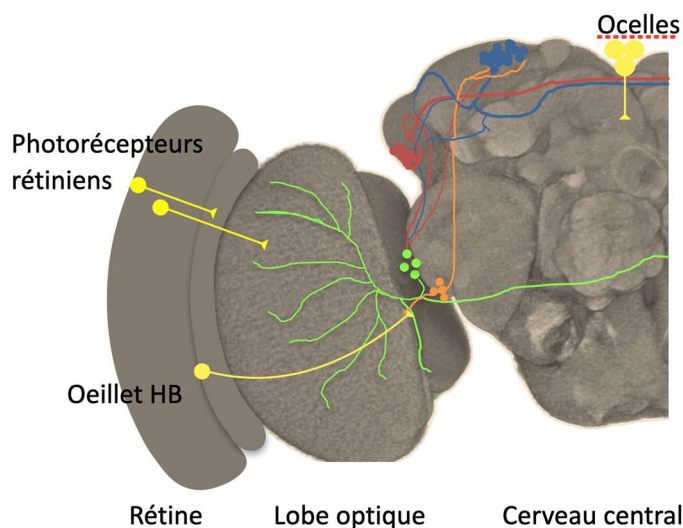


Figure 2 : Oscillateurs cérébraux et organes photorécepteurs.
 En plus du Cryptochrome exprimé dans les neurones d'horloge (orange: s-LNv, vert: l-LNv, rouge: LNd, bleu: DN1), ceux-ci reçoivent les informations lumineuses de trois organes photorécepteurs (jaune: rétine, oeillet H-B, ocelles) qui expriment différents types de rhodopsines.

Des oscillateurs interconnectés

Le cerveau de la drosophile contient environ 100 000 neurones, dont environ 240 neurones seulement possèdent une horloge circadienne. L'horloge cérébrale joue non seulement un rôle clé dans le rythme veille-sommeil mais participe aussi au contrôle de la rythmicité de processus tels que l'émergence des adultes après la métamorphose, l'accouplement et la ponte, la prise de nourriture ou la préférence de température qui remplace la variation circadienne de la température corporelle observée chez les mammifères. Les neurones d'horloge sont répartis en différents groupes définis par la localisation des corps cellulaires dans le cerveau (Figure 2). Le groupe des neurones latéraux est organisé en sous-groupes ventraux (LNv), dorsaux (LNd) et postérieurs (LPN). Les LNv sécrètent le neuropeptide Pigment-Dispersing Factor (PDF) et comprennent des petites cellules (s-LNv) avec une arborisation dendritique locale et des axones projetant vers la partie dorsale du cerveau, et des grosses cellules (l-LNv) arborisant dans le lobe optique et projetant vers l'autre hémisphère. Le groupe des neurones dorsaux inclut trois sous-groupes nommés DN1 (antérieurs et postérieurs), DN2 et DN3. L'ablation des neurones à PDF, de même que l'absence du neuropeptide PDF ou de son récepteur (appartenant à la famille des récepteurs couplés à une protéine G) induit une perte rapide de la rythmicité comportementale en conditions d'obscurité constante (DD ou libre cours) (3,4). Le récepteur du PDF est présent essentiellement dans les neurones d'horloge et semble donc jouer un rôle de synchronisation interne du réseau, qui n'est pas sans rappeler celui du neuropeptide VIP dans les noyaux suprachiasmatiques des mammifères. Des mouches transgéniques ne possédant une horloge fonctionnelle que dans cette vingtaine de neurones à PDF montrent des rythmes veille-sommeil de 24h en conditions d'obscurité constante comme les mouches sauvages (3). Les autres neurones (LNd et DN1) contribuent à la stabilité du rythme et peuvent modifier la période définie par les neurones à PDF... en l'absence de PDF. L'influence des autres oscillateurs pourrait donc varier en fonction des niveaux de PDF. En lumière constante (LL), les mouches sauvages sont arythmiques car la protéine Tim est dégradée, mais l'absence de Cry ou l'exposition à une faible intensité lumineuse préserve la rythmicité, qui dépend alors principalement des neurones LNd et DN. Il apparaît donc que les neurones à PDF (en particulier s-LNv) sont responsables du contrôle du rythme en obscurité constante, tandis que les neurones PDF-négatifs (en particulier LNd) semblent prendre le relais en lumière constante.

Des voies photoréceptrices multiples

En cycles lumière-obscurité standards (LD 12h:12h), les drosophiles présentent un profil d'activité bimodal dont les pics coïncident avec les transitions nuit-jour et jour-nuit (Figure 2). Les pics d'activité sont sous le contrôle principal des deux sous-ensembles distincts de neurones d'horloge responsables des rythmes en libre cours, s-LNV pour le matin et LNd Cry-positifs pour le soir (3,4). Les oscillateurs du matin et du soir sont-ils indépendants ? La présence de Cry dans les neurones d'horloge leur confère la capacité autonome de se synchroniser avec les cycles jour-nuit. De plus, une connexion directe des deux groupes de neurones avec le système visuel est établie dans une partie du lobe optique appelée médulla accessoire. Néanmoins, les neurones du matin ont une forte influence sur ceux du soir. Ainsi, le pic d'activité vespéral est avancé de quelques heures en l'absence de PDF, tandis que la perte de PDF et de Cry fait disparaître l'activité du soir et inverse la phase des oscillations moléculaires dans les LNd. La synchronisation de l'oscillateur du soir par l'oscillateur du matin *via* le PDF est donc plus importante en absence de Cry. Le Cryptochrome étant sensible à la lumière bleue, son rôle en conditions naturelles est plus faible le matin et le soir lorsque la position basse du soleil déplace le spectre vers le rouge, ce qui prédit une action plus forte du couplage PDF à ces moments du cycle. Plusieurs mécanismes sont impliqués dans la flexibilité de ce couplage, permettant d'adapter le comportement à la photopériode. Cry limite la capacité du pic vespéral à être retardé en jours longs, tandis que le système visuel favorise ce retard. PDF est également requis pour l'adaptation à la photopériode. En conditions de lumière faible, les jours longs induisent une baisse des niveaux de PDF qui modifie les contributions de plusieurs groupes de neurones impliqués dans l'activité du soir, ce qui a pour conséquence une extension du pic d'activité (5). Le rôle clé du neuropeptide est illustré par la comparaison entre espèces cosmopolites exposées à une photopériode qui varie avec la saison, et espèces équatoriales. Chez ces dernières, on observe une incapacité à s'adapter aux jours longs, associée à une modification de la dynamique d'expression de PDF.

Les fonctions des groupes de neurones d'horloge autres que les neurones latéraux sont moins connues, mais le rôle des neurones DN1 dans l'adaptation aux conditions environnementales semble prépondérant. Une horloge fonctionnelle uniquement dans une fraction des DN1 suffit à générer des activités matinales et vespérales, mais d'une façon très dépendante des conditions de lumière et de température. Ainsi, une forte intensité lumineuse perçue par le système visuel induit, dans les LNV, une augmentation de l'expression de PDF, qui vient inhiber l'activité du soir contrôlée par les DN1. Les DN1 jouent

également un rôle important dans la régulation de la sieste, en promouvant le sommeil de jour (sieste) de façon plus prononcée chez les mâles que chez les femelles (6). Chez ces dernières, l'activité locomotrice en milieu de journée est augmentée après accouplement, en réponse au sex-peptide qui est transmis avec le sperme, possiblement pour favoriser la ponte des œufs. Enfin, les DN1 sont impliqués dans les effets des interactions sociales et/ou sexuelles sur la phase du rythme veille-sommeil. Ainsi ce petit groupe de neurones d'horloge (une quinzaine de cellules par hémisphère) intègre de nombreux stimuli sensoriels pour moduler le comportement, avec des fonctions de promotion ou d'inhibition du sommeil qui pourraient reposer sur des sous-groupes très restreints de DN1. Les expériences de transcriptomique sur cellule unique révèlent d'ailleurs une diversité insoupçonnée des neurones d'horloge (7). La mouche semble donc capable d'un grand répertoire comportemental au prix de fonctions portées par des ensembles de quelques cellules seulement. L'établissement du connectome complet du cerveau adulte met en évidence une faible connectivité entre les cellules à PDF et les autres neurones d'horloge, et l'existence de nombreuses connexions directes ou indirectes entre les autres groupes de neurones (8). La sécrétion du PDF permet une action à distance qui explique vraisemblablement la faible connectivité synaptique des axones des LNV. Les données soulignent l'importance des connexions impliquant les neurones dorsaux DN1 et DN3, tous deux fortement impliqués dans la régulation du sommeil et suggèrent l'existence de différents circuits neuronaux tant sur le plan des entrées sensorielles que des sorties comportementales, circuits dont la fonction devra être analysée.

La construction du rythme veille-sommeil

Le modèle de Borbély propose que le rythme veille-sommeil résulte de l'interaction entre le processus circadien et le processus homéostatique ou pression de sommeil. Un processus homéostatique met en jeu différents circuits neuronaux chez la mouche, tant pour détecter la « fatigue » que pour induire du sommeil (9). La réponse à la privation de sommeil semble néanmoins plus faible que chez les mammifères, suggérant une contribution relative plus importante de l'horloge circadienne (10). La mise en évidence de fonctions promotrices ou inhibitrices de sommeil parmi les neurones d'horloge suggère l'idée que différents groupes de neurones agissent à différents moments du cycle pour promouvoir ou inhiber le sommeil. Si la phase des oscillations moléculaires dans les différents groupes neuronaux est très similaire, des expériences d'imagerie calcique ont montré que les neurones s-LNV (oscillateur

du matin) ont un pic de calcium en fin de nuit, tandis que les neurones LNd (oscillateur du soir) ont un pic de calcium en fin de journée (11). Ainsi, un rapport temporel différent entre oscillation moléculaire et activité calcique permet de générer des activités locomotrices du matin et du soir (Figure 3). Cette situation n'est pas sans rappeler celle des rongeurs où les oscillations moléculaires dans les noyaux suprachiasmatiques ne sont pas en antiphase chez les espèces diurnes et nocturnes. Par ailleurs, la lumière influence fortement le comportement des mouches, indépendamment de l'horloge. Ainsi, l'activité typiquement crépusculaire deviendra nocturne en présence de lumière faible pendant la nuit et sera essentiellement diurne lorsque la lumière du jour est faible. Les mouches fuient également les UV pendant la nuit, indépendamment de l'horloge, tandis que celle-ci contrôle une préférence matin et soir pour le vert, et en milieu de journée pour le rouge. Les effets liés à l'intensité et au

spectre de la lumière ont une importance majeure sur le rythme veille-sommeil, car des mouches sans horloge fonctionnelle montrent un profil crépusculaire proche des mouches sauvages dans des conditions qui reproduisent l'environnement lumineux naturel, contrastant avec le profil en conditions standard (12h :12h) de laboratoire (12). Ces expériences questionnent les fonctions de l'horloge dans la genèse du rythme veille-sommeil, et suggèrent que l'horloge cérébrale a peut-être pour rôle principal de coordonner la physiologie et le rythme veille-sommeil, ainsi que d'assurer la nature rythmique du comportement et de la physiologie quelles que soient les conditions environnementales.

L'intégration de différents signaux environnementaux par le réseau des neurones d'horloge et l'oscillateur moléculaire qu'ils contiennent est encore mal comprise, de même que les voies de sortie par lesquelles l'horloge cérébrale contrôle le rythme veille-sommeil. Comme chez les mammifères, l'horloge de la drosophile semble contrôler environ 10% du génome, et les quelques comportements cycliques déjà identifiés ne représentent sans doute qu'une petite fraction des fonctions sous contrôle circadien. Enfin, les mécanismes d'intégration des informations circadiennes avec celles issues des circuits homéostatiques du sommeil restent largement inconnus. Les avancées récentes des techniques d'imagerie cérébrale, en particulier chez l'animal en comportement, et la possibilité de tester fonctionnellement les circuits neuronaux prédits par le connectome laissent entrevoir des perspectives prometteuses pour la compréhension de l'horloge cérébrale. L'utilisation de modèles animaux, y compris invertébrés, est donc plus que jamais indispensable pour poser ces questions dans les paradigmes expérimentaux les plus variés et éclairer sous différents angles les données de la chronobiologie humaine.

francois.rouyer@universite-paris-saclay.fr

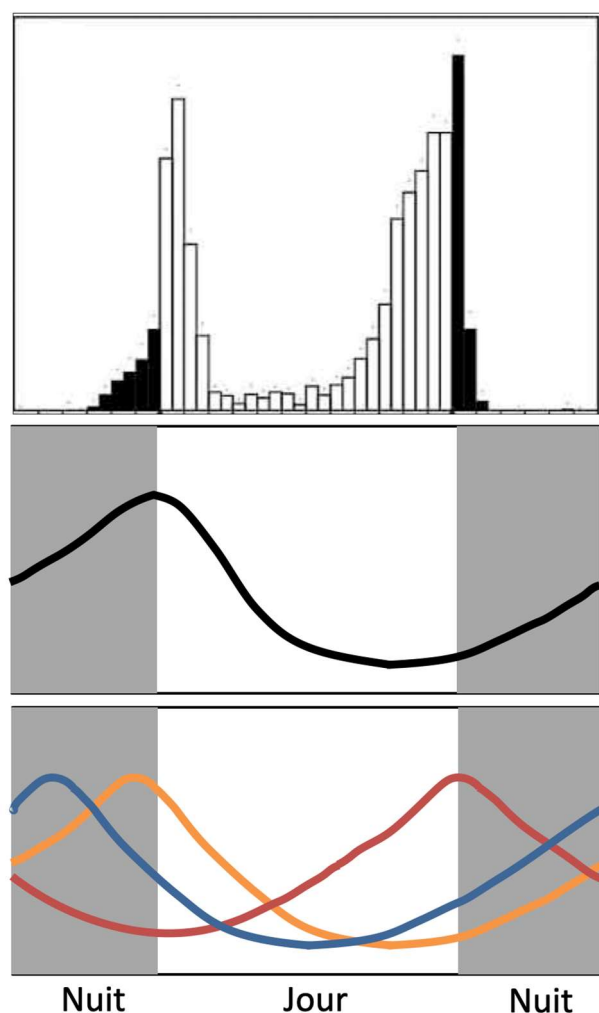


Figure 3 : Oscillations moléculaires et rythme d'activité locomotrice.

Haut : Distribution de l'activité locomotrice en fonction du temps en conditions standards (LD 12h:12h). **Centre :** oscillations des niveaux de protéine PER dans les neurones d'horloge en fonction du temps, avec une phase identique dans tous les neurones. **Bas :** oscillations des niveaux de calcium dans les différents neurones de l'horloge en fonction du temps, avec une phase propre à chaque groupe neuronal (bleu: DN1, orange: LNV, rouge: LND)

Références

- (1) Patke A. et al. (2020) Nat Rev Mol Cell Biol. 21, 67-84
- (2) Helfrich-Förster C. (2020) J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol. 206, 259-72
- (3) Grima B. et al. (2004) Nature 431, 869-73
- (4) Stoleru D. et al. (2004) Nature 431, 862-8
- (5) Chatterjee A. et al. (2025) Sci Adv. 11, eadt7168
- (6) Guo F. et al. (2016) Nature 536, 292-7
- (7) Ma D. et al. (2021) Elife 10:e63056
- (8) Reinhard N. et al. (2024) Nat Commun 15, 10392
- (9) Zhao Y. et al. (2026) Front Neurosci 20, 1750211
- (10) Geissmann Q. et al. (2019) Sci Adv. 5, eaau9253
- (11) Liang X. et al. (2016) Science 351, 976-81
- (12) Vanin S. et al. (2012) Nature 484, 371-5