

## Robustesse des horloges circadiennes aux fluctuations : le cas du picoeucaryote *Ostreococcus*

Quentin Thommen<sup>1,2,3</sup>, Pierre-Emmanuel Morant<sup>1,2,3</sup>, Benjamin Pfeuty<sup>2,3</sup>, Florence Corellou<sup>4,5</sup>, & François-Yves Bouget<sup>4,5</sup> & Marc Lefranc<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Université Lille 1, Laboratoire de Physique des Lasers, Atomes, et Molécules, UFR de Physique, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France

<sup>2</sup> Université Lille 1, Institut de Recherche Interdisciplinaire, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France

<sup>3</sup> CNRS, UMR 8523, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

<sup>4</sup> Université Pierre and Marie Curie Paris 06, Laboratoire d'Océanographie Microbienne, Observatoire Océanologique, F-66651 Banyuls/Mer, France

<sup>5</sup> Centre National de la Recherche Scientifique, Laboratoire d'Océanographie Microbienne, Observatoire Océanologique, F-66651 Banyuls/Mer, France

quentin.thommen@univ-lille1.fr

**Résumé.** La modélisation de l'horloge circadienne de l'algue verte unicellulaire *Ostreococcus tauri* permet de reproduire presque parfaitement les profils temporels expérimentaux de deux acteurs centraux par un modèle minimal, non couplé au cycle jour/nuit. Ce résultat contre-intuitif et surprenant indique que la trajectoire dans l'espace des phases de l'oscillateur couplé au cycle jour/nuit est très proche de celle d'un oscillateur libre et nous conduit à la recherche d'un couplage indirect, *via* un médiateur présent de façon temporaire, entraînant une faible déviation de la trajectoire dans l'espace des phases. L'accent est mis sur les couplages localisés induisant un accrochage de phase relativement indépendant de l'intensité du couplage, suggérant que les oscillations de l'horloge circadienne sont indépendantes de l'intensité lumineuse reçue. Cette propriété nouvelle permet à l'horloge d'être robuste vis à vis des fluctuations d'éclairement.

### 1 Introduction

Les horloges circadiennes, présentes chez la plupart des organismes vivants, leurs permettent d'anticiper les changements de leur environnement liés au cycle jour/nuit, et d'adapter leur comportement en conséquence. Cela implique un couplage indispensable entre l'horloge et l'alternance jour/nuit, permettant de recalibrer l'horloge rapidement lors d'un brusque décalage temporel, ainsi que l'adaptation saisonnière de l'horloge. Les rouages de ces horloges se trouvent dans des réseaux biochimiques où interagissent gènes et protéines; les principaux composants des horloges circadiennes de plusieurs organismes (*Arabidopsis*, *Neurospora*, *Drosophila* ...) ont pu être identifiés ainsi que leurs interactions [1,2].

Nous présentons les premiers résultats de modélisation de l'horloge circadienne de l'algue verte unicellulaire *Ostreococcus tauri*, dont deux acteurs centraux, les gènes *TOC1* et *CCA1*, ont été récemment identifiés [3]. En particulier, nous montrons qu'un modèle minimal permet de reproduire, au delà de toute espérance, les données expérimentales de l'horloge entraînée par un cycle jour/nuit artificiel. Fait remarquable, le meilleur ajustement du modèle aux données est obtenu quand on suppose un forçage nul, soit l'absence de couplage entre l'oscillateur circadien et le cycle d'éclairement [4]. Ceci suggère que le couplage à la lumière est confiné dans des intervalles de temps spécifiques et qu'il n'a aucun effet lorsque l'oscillateur est entraîné par le cycle diurne en régime permanent. Nous montrons qu'il est effectivement possible de créer des profils de modulation paramétrique ne laissant aucune signature sur les profils temporels des acteurs de l'horloge lorsque celle-ci est en phase avec le cycle jour/nuit — l'horloge « à l'heure » —, mais permettant néanmoins une synchronisation efficace de l'horloge [4]. Cette propriété intrigante reflète probablement une stratégie visant à minimiser l'impact des fluctuations d'intensité lumineuse sur l'oscillateur circadien, un type de perturbation qui a rarement été pris en compte pour évaluer la robustesse des horloges circadiennes.

## 2 Modélisation de l'horloge

### 2.1 Les données et le modèle utilisé

Pour caractériser les profils temporels de l'expression de TOC1 et CCA1 chez *Ostreococcus*, nous utilisons les données ARN acquises avec un cycle jour/nuit comportant 12h de lumière constante et 12h d'obscurité. La technique de mesure par micro-puce permet une sensibilité logarithmique ce qui est particulièrement utile ici. Notons que Corellou *et al* [3] ont mené un travail exhaustif de transformation génétique chez *Ostreococcus* pour mesurer en temps réel l'activité transcriptionnelle et les niveaux de protéine par bioluminescence. Cependant la cinétique de la luciférase est encore mal connue chez *Ostreococcus*, si bien que la recherche d'un accord quantitatif avec ces données est prématurée ; nous présentons néanmoins également ces données pour une vérification qualitative de l'accord.

Notre démarche est de chercher à reproduire au mieux les données ARN à l'aide d'un modèle minimale de quatre équations différentielles décrivant la cinétique chimique d'une boucle transcriptionnelle : les protéines CCA1 répriment la synthèse de l'ARN de TOC1 alors que les protéines TOC1 activent la synthèse de l'ARN de CCA1,

$$\dot{M}_T = \mu_T + \frac{\lambda_T}{1 + (P_C/P_{C0})^{n_C}} - \delta_{M_T} \frac{K_{M_T} M_T}{K_{M_T} + M_T}, \quad (1a)$$

$$\dot{P}_T = \beta_T M_T - \delta_{P_T} \frac{K_{P_T} P_T}{K_{P_T} + P_T}, \quad (1b)$$

$$\dot{M}_C = \mu_C + \frac{\lambda_C (P_T/P_{T0})^{n_T}}{1 + (P_T/P_{T0})^{n_T}} - \delta_{M_C} \frac{K_{M_C} M_C}{K_{M_C} + M_C}, \quad (1c)$$

$$\dot{P}_C = \beta_C M_C - \delta_{P_C} \frac{K_{P_C} P_C}{K_{P_C} + P_C}. \quad (1d)$$

La boucle de rétroaction négative permet d'engendrer des oscillations autonomes des variables du système. Pour augmenter la variété des profils temporels accessibles, des dégradations enzymatiques de type Michaelis–Menten ont été utilisées pour chacun des acteurs. Il faut interpréter ces termes de dégradation comme des mécanismes effectifs permettant éventuellement de prendre en compte des interactions plus complexes et non encore identifiées.

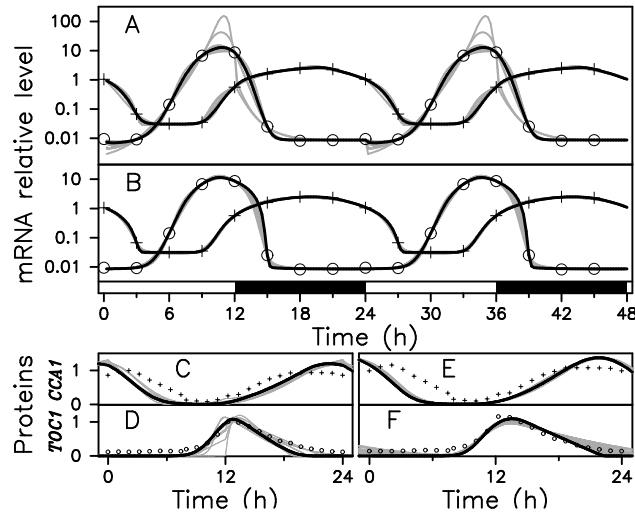
En l'absence d'éléments probant concernant les voix d'entrée de la lumière sur l'horloge d'*Ostreococcus* permettant la synchronisation, le couplage éclairement–horloge est modélisé par un nombre variable de couplages paramétriques (certains paramètres ont deux valeurs différentes à la lumière et à l'obscurité).

### 2.2 Stratégies d'optimisation des paramètres

La recherche des paramètres du modèle reproduisant au mieux les données expérimentales a été conduite en imposant l'oscillation avec une période de 24 heures des solutions en condition d'éclairage constant. La figure 1 présente les résultats de deux stratégies extrêmes : la première stratégie (Fig. 1A) utilise une modulation de tous les paramètres alors que la seconde (Fig. 1B) n'utilise aucune modulation (pas de couplage entre l'horloge et l'éclairage).

De manière surprenante, les deux stratégies permettent de décrire les données expérimentale avec une erreur quadratique moyenne de quelques pour-cent. Cependant l'accord se dégrade nettement lorsque le nombre de paramètres modulés est réduit.

Ce résultat est inconfortable : la modélisation reproduit presque parfaitement les données expérimentales dans deux cas limites inacceptables : dans l'un tous les paramètres sont modulés ce qui est irréaliste et dans l'autre, aucun couplage n'est présent ce qui exclut toute synchronisation de l'horloge sur l'éclairage alors que celle-ci est effective. Cependant, l'accord quantitatif est trop parfait pour être fortuit.



**Fig. 1.** Ajustement des données expérimentales. Les profils des ARN sont ajustés par le modèle (1) pour une période libre de 24 h. En (A) et (B), les croix (respectivement les cercles) sont les mesures de l'ARN de *Cca1* (respectivement *Toc1*) utilisées comme cible; les meilleurs ajustements sont représentés en gris tandis que le meilleur est en noir (échelle log.) lorsque le modèle est (A) couplé à travers tous ces paramètres; (B) sans couplage. (C) (resp. (E)) Prédiction du profil temporel de CCA1 (échelle linéaire) correspondant à (A) (resp. (B)) avec le même code de couleur; les croix correspondent au signal de luminescence. (D) et (F) sont similaires à (C) et (E) pour la protéine TOC1.

### 2.3 Couplages localisés

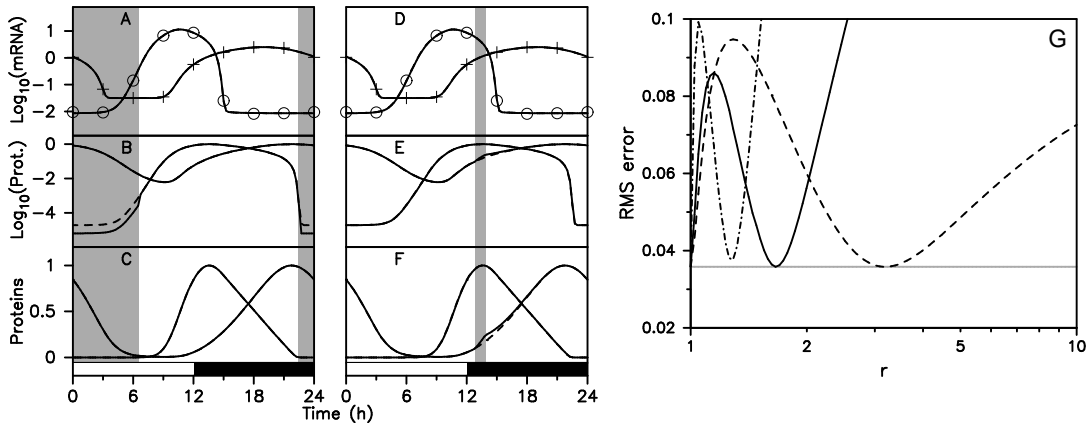
Puisque les données peuvent être décrites par un modèle d'oscillateur libre, cela suggère que le couplage de l'horloge à l'éclairement n'induit pas de signature sur les données ARN, ou encore que ce couplage est suffisamment ponctuel pour passer entre les mailles de l'échantillonnage. Une hypothèse séduisante est que l'horloge est couplée à la lumière *via* un médiateur présent durant une courte fenêtre temporelle, ce médiateur hypothétique pouvant soit être lié à la voie d'entrée du signal lumineux, soit être un photorecepteur dont l'expression est régulée par l'horloge.

La recherche de telles fenêtres de couplage a été menée en utilisant les jeux de paramètres conduisant au meilleur accord avec les données expérimentales en l'absence de couplage, et en supposant que le taux de dégradation d'une des protéines change durant un intervalle de temps donné. La recherche systématique montre l'existence de familles de fenêtres pour lesquelles l'accord aux données expérimentales est excellent (inférieur à 10%) pour toute une large gamme de modulation du taux de dégradation, induisant ainsi une grande souplesse dans le choix des fenêtres de couplage.

Par exemple, toute modulation de la dégradation de la protéine TOC1 intervenant entre 22,5 h et 6,5 h est indécélable sur les profils ARN et donc n'induit aucune variation de l'accord (Fig 2), quel que soit le taux de modulation (Fig 3). Ce cas est aisément compréhensible, car dans ce laps de temps la protéine est à son niveau minimum, attendant la décroissance du répresseur CCA1 pour augmenter à nouveau. Varier son taux de dégradation ne change donc pas l'état du système.

Plus surprenant est le cas des fenêtres portant sur le taux de dégradation de CCA1. Les fenêtres centrées autour de 13,33 h génèrent un accord inférieur à 10% en RMS dans une gamme de taux de modulation, d'autant plus vaste que leur durée est courte (Fig 3). Ce moment particulier du cycle de l'horloge (13,33 h) est déterminé en étudiant le déphasage induit sur l'horloge par une perturbation ponctuelle sur la variable protéine CCA1. On montre en effet qu'une telle perturbation placée à 13,33h n'induit aucun déphasage sur l'horloge.

Ainsi, un couplage localisé permet de décrire les données expérimentales à l'aide d'une solution proche de celle d'un oscillateur libre, sans que le taux de modulation n'ait d'influence notable.



**Fig. 2.** Ajustement par un couplage localisé. Solutions numérique du modèle (1) sans couplage (trait tirés, même paramètres que pour Fig. 1(B)) et avec couplage (trait plein). Les zones grisées matérialise les fenêtres de couplage. A gauche (resp. droite), le taux de dégradation de TOC1 (respectivement CCA1) est multiplié par 3 (respectivement divisé par 2) de 22,5 h à 6,5 h (respectivement de 12,8 à 13,95). (A), (D) profile temporel de l'ARN; les profils de protéines sont représentés en échelle logarithmique (B) et (E) ainsi qu'en échelle linéaire (C) et (F). (G) Variation de l'erreur quadratique moyenne en fonction de l'amplitude de couplage pour différente fenêtres. En gris,  $\delta_{P_T}$  est multiplié par  $r$  de 22,5 h à 6,5 h; en noir  $\delta_{P_c}$  est divisé par  $r$  de 12,8 h à 13,95 h (trait plein), de 13 h à 13,65 h (trait tiré), et de 12 h à 12,47 h (trait mixte).

## 2.4 Synchronisation à l'aide de couplages localisés

La question se pose maintenant sur les propriétés de synchronisation de ces fenêtres : puisqu'elles n'ont aucun effet en phase, sont-elles suffisantes pour réaliser une synchronisation rapide lorsque l'horloge est déphasée par rapport au cycle d'éclairement. Pour tester les propriétés de recalage, nous faisons l'hypothèse simplificatrice que les fenêtres de modulation sont positionnées par rapport au cycle d'éclairement.

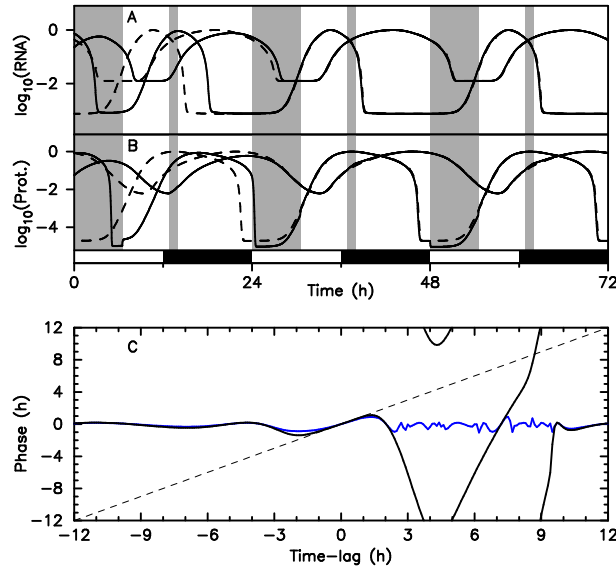
Puisque les fenêtres de couplage n'ont qu'une influence ponctuelle sur les variables dynamiques, il est possible d'en combiner plusieurs pour améliorer leurs propriétés de recalage de l'horloge sur l'éclairement. De plus, comme le taux de modulation est peu important lorsque l'horloge est en phase, il est possible de les optimiser dans chacune des fenêtres afin d'obtenir un déphasage résiduel minimal au bout de 5 cycles de modulation. La combinaison optimale permet ainsi d'abaisser le déphasage résiduel à 25 min quelque soit la phase initiale de l'horloge avec une erreur maximum d'une heure; ce qui, compte tenu des hypothèses très réductrices sur les profils de modulation ainsi que leurs comportement vis à vis du cycle d'éclairement constitue un recalage satisfaisant. La figure 4 présente un exemple d'un déphasage initiale de 12h (Fig. 4A et 4B) ainsi que le déphasage résiduel en fonction du déphasage initiale.

## 3 Robustesse de l'horloge aux fluctuations d'éclairement

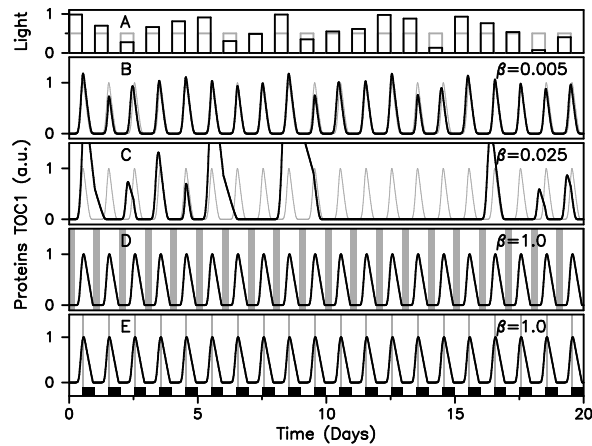
En supposant que les fenêtres de modulation identifiées reflètent un couplage de l'horloge à l'éclairement et que le taux de modulation soit le reflet de l'éclairement reçu, le résultat précédent implique l'hypothèse forte et non étudiée jusqu'à présent que l'horloge est insensible à l'éclairement reçu tout en étant capable de se recalibrer rapidement sur le cycle d'éclairement.

Cela suggère en particulier qu'un tel couplage permet à l'horloge d'être insensible aux fluctuations d'éclairement présentes en conditions réelles, tout en étant sensible aux fluctuations de phase. Le modèle présentant des couplages sur tous les paramètres serait quant à lui beaucoup plus sensible à de telles fluctuations. Cependant il n'est pas exclu que l'information sur l'éclairement puisse être transmise à l'horloge au travers d'une cascade ultra sensible de sorte qu'un signal d'entrée fluctuant se rapproche en sortie d'un signal créneau.

Pour tester leurs comportements, les deux modèles (couplage localisé sur un paramètre, et couplage de tous les paramètres) ont été soumis à une séquence d'éclairements d'amplitude variable d'un cycle



**Fig. 3.** Recalage d'un modèle à fenêtres. Le taux de dégradation de TOC1 (resp. CCA1) est multiplié par 2,1 (respectivement par 0,6) de 0 h à 6,5 h (respectivement de 12,8 h à 13,95 h). La condition initiale correspond à un déphasage de 12 h ; la solution numérique converge rapidement vers le profil normal (traits tirés). Les profils temporels d'ARN (A) et de protéines (B) sont représentés en échelle logarithmique. (C) Le déphasage résiduel après un jour (en noir) et après cinq jour (bleue) pour une phase initiale entre -12 h et 12 h permet de juger de l'uniformité de la synchronisation.



**Fig. 4.** Réponse des modèles d'horloge aux fluctuations d'éclairage. (A) Intensité lumineuse variant aléatoirement d'un jour sur l'autre. (B) et (C) L'évolution temporelle de la concentration de TOC1 est représentée pour le modèle avec tous les paramètres couplés à différents niveaux de fluctuation caractérisés par le paramètre  $\beta$ . (D) Le modèle utilisé pour Fig. 2(A)-(C) ; (E) le modèle utilisé pour Fig. 2(D)-(F). La robustesse se déduit de la comparaison du profil temporel pour un éclairage aléatoire (en noir) à celui pour un éclairage standard (en gris).

à l'autre. Pour le modèle fortement couplé, il a été tenu compte d'un amortissement des fluctuations d'éclairage.

Le résultat montre que le modèle fortement couplé présente un comportement erratique pour des fluctuations d'éclairage de quelques pour cent tandis que le modèle avec un couplage localisé est parfaitement robuste.

Une question naturelle est de savoir si l'indépendance par rapport à l'éclairement des couplages localisés ne dépend pas du fait que nous ayons choisi un oscillateur ayant une période libre égale à celle de la modulation. En effet, lorsque la période de l'oscillateur libre est de 25h par exemple, le couplage est nécessaire, même lorsque l'horloge est en phase.

Pour tester cette hypothèse, nous avons renormalisé le temps du modèle non couplé afin d'obtenir un oscillateur libre de période variable. La recherche de fenêtres de modulation permettant de reproduire les profils ARN expérimentaux tout en synchronisant l'horloge montre que celles-ci sont à même de réaliser une compression ou dilatation temporelle homogène permettant de restaurer le bon accord tout en étant robuste aux fluctuations d'intensités.

## 4 Conclusion

Les profils temporels des acteurs principaux de l'horloge d'*Ostreococcus* sont compatibles avec un modèle élémentaire comportant une boucle de rétroaction négative. Le couplage de l'horloge au cycle d'éclairement peut être réalisé de manière optimale, pour la robustesse comme pour la synchronisation, en le supposant localisé dans des fenêtres temporelles.

Dans ce travail, le positionnement des fenêtres a été défini avec une totale liberté, car aucune certitude biologique n'existe sur les acteurs impliqués dans les voies d'entrée du signal lumineux chez *Ostreococcus*. L'objectif à court terme est d'identifier ces acteurs en mettant en correspondance leurs niveaux d'expression et les fenêtres possibles de modulation.

## Références

1. J. C. DUNLAP, Molecular bases for circadian clocks, *Cell*, **96**, 271 (1999).
2. M. W. YOUNG & S. KAY, Time zones : a comparative genetics of circadian clocks, *Nature Genetics*, **2**, 702 (2001).
3. F. CORELLOU, C. SCHWARTZ, J. P. MOTTA, E. B. DJOUANI-TAHRI, F. SANCHEZ, *et al.*, Clocks in the green lineage : comparative functional analysis of the circadian architecture in the picoeukaryote *ostreococcus*, *Plant Cell*, **21**, 3436 (2009).
4. Q. THOMMEN, P.-E. MORANT, F. CORELLOU, F.-Y. BOUGET & M. LEFRANC, Robustness of circadian clocks to daylight fluctuations : hints from the picoeukaryote *Ostreococcus tauri*, *PLoS Computational Biology*, soumis.