

## **Modélisation de l'horloge biologique du poisson zèbre et de sa régulation par la lumière**

Les rythmes circadiens permettent la régulation physiologique et comportementale des organismes. Ils s'effectuent sur une période de 24 heures. Le poisson-zèbre est un modèle de plus en plus étudié, surtout en chronobiologie, de par la facilité à observer son développement embryonnaire. La fonctionnalité de son horloge implique une boucle de rétro-régulation transcriptionnelle et traductionnelles mettant en jeu quatre gènes principaux : *cry*, *per*, *clock*, *bmal*. La particularité de ce vertébré est que tous les tissus et les cellules sont photosensibles et contiennent des oscillateurs circadiens. La lumière a pour rôle de synchroniser l'horloge de l'organisme.

Lors de ce projet, nous avons développé deux modèles qui génèrent les oscillations des rythmes circadiens du poisson-zèbre. Le premier modèle réalisé est un modèle simplifié ne prenant pas en compte l'implication de la lumière sur les oscillations. Le second se rapprochant au mieux des conditions environnementales dans le cadre d'une alternance jour/nuit. Nous verrons qu'en conditions d'obscurité constante, la période est d'environ 26 heures, alors qu'en alternance jour/nuit, la période est de 24 heures. La lumière entraîne une augmentation de l'expression des gènes *Per2* et *Cry1a*.

Mots-clés : Poisson-zèbre, Rythmes circadiens, Gènes horloge , Lumière, Période

## **Modeling zebrafish circadian clock and its light sensitivity**

Circadian clocks regulate rhythms of the physiology and behavior of most species with a period of 24 hours. The zebrafish is a model increasingly studied, especially in chronobiology, since its embryonic development can be watched easily. The mechanisms of its clock implies a feedback loop involving four important genes : cry, per, clock and bmal. Zebrafish tissues and cells, unlike mammals, are light sensitive and light responsive. They have their own circadian oscillators. Light's role is to reset circadian clock.

For this project we have developed two different models : the first mimics circadian oscillations of the zebrafish in constant darkness, and the second one in light/dark conditions. The results show that in constant darkness, the period is approximately 26 hours, whereas in light/dark conditions, the period is 24 hours. The light increases the expression of Per2 and Cry1a genes.

Key words : Zebrafish, Circadian rhythms, Clock genes, Light, Period

## Table des matières

|      |  |    |
|------|--|----|
| I.   | Démarche biologique.....   | 4  |
| A.   | Les rythmes biologiques.....   | 4  |
| B.   | Le modèle du poisson-zèbre.....  | 5  |
| 1.   | Mécanismes moléculaires de l'horloge circadienne du poisson-zèbre..... | 5  |
| 2.   | Particularités du poisson-zèbre.....                                   | 5  |
| C.   | Mécanismes photosensibles des cellules du poisson zèbre.....           | 6  |
| II.  | Modélisation.....  | 8  |
| A.   | MODELE SANS LUMIERE :.....   | 8  |
| B.   | MODELE AVEC LA LUMIERE.....  | 14 |
| III. | Démarche mathématique.....   | 18 |
| A.   | Les fonctions.....   | 18 |
| B.   | Représentations graphiques.....  | 19 |
|      | Discussion.....  | 22 |
|      | Remerciements.....   | 22 |
|      | Références.....  | 23 |
|      | Annexe.....  | 23 |

Mammifères, vertébrés et tout être vivant sur Terre connaît le lever et le coucher du soleil, le jour et la nuit et arrive à adapter son activité en fonction de cette alternance de jour et de nuit qui se fait suivant une période de 24h que l'on appelle rythme circadien. Certains animaux sont plus sensibles que d'autres à ce rythme et présentent de ce fait une horloge circadienne qui leur est propre.

Il serait intéressant de se demander comment fonctionne cet horloge, de quelle façon est-elle régulée et quelle est l'action de la lumière sur cette horloge.

Pour tenter de répondre à cette question nous allons étudier le cas du poisson zèbre.

Dans un premier temps nous allons expliquer ce qu'est un rythme biologique et le fonctionnement de l'horloge circadienne chez le poisson zèbre.

Ensuite nous allons modéliser et étudier cette horloge avec le logiciel Copasi.

Enfin nous allons étudier de plus près les équations mathématiques trouvées dans ce logiciel et qui nous ont permis la construction de notre modèle.

## I. Démarche biologique

### A. Les rythmes biologiques

Le rythme biologique permet aux organismes d'adapter leur physiologie et leur comportement aux variations de l'environnement.

Les rythmes peuvent être classifiés par la période. Il existe trois rythmes principaux : les rythmes ultradiens (période de 0 à 20h), les rythmes infradiens (période supérieure à 28h) et enfin les rythmes circadiens dûs à la rotation de la terre sur 24 heures en moyenne.

Les rythmes biologiques ont la propriété d'être ubiquitaires : on les trouve à tous les niveaux d'organisation et au niveau de toutes les fonctions biologiques. Cela confère un avantage sélectif par adaptation. Les biorythmes sont le produit de la sélection naturelle.

Les rythmes biologiques sont entraînés et synchronisés par les facteurs environnementaux locaux. Par exemple, la lumière ou la température sont des synchroniseurs (ou zeitgebers). La lumière est le principal fixateur pour l'organisme. L'intensité et la durée de la lumière sont aussi des indicateurs. Tous ces indicateurs permettent de se localiser dans le temps et de s'adapter par anticipation.

Les rythmes sont endogènes. La période endogène dépend de l'espèce. Les synchroniseurs ne créent pas les rythmes mais les calibrent, par exemple sur 24 heures. C'est donc une horloge interne qui est capable de générer de façon autonome des cycles d'environ 24 heures, indépendamment de l'extérieur. En isolement temporel, on a une désynchronisation interne.

La perturbation ne crée pas de pathologies mais favorise les pathologies (dépression, cancer...). Le facteur perturbateur est le stress.

Les rythmes sont codés par des gènes horloges. Le premier gène horloge a été identifié en 1971, chez la drosophile en étudiant leur rythme d'éclosion. La régulation du rythme se fait au niveau transcriptionnel et traductionnel.

Les rythmes circadiens sont contrôlés par deux types d'horloges : l'horloge centrale et les horloges périphériques, propres à chaque organe, sous la coordination de l'horloge centrale. Chez les mammifères, les noyaux supra-chiasmatisques (NSC) constituent l'horloge centrale (ou pacemaker) qui en recevant l'information photique permet la synchronisation des horloges de l'organisme.

Cependant, comme nous le verrons plus loin, chez le poisson-zèbre, les tissus sont photorécepteurs et possèdent une horloge circadienne intrinsèque.

On peut donc se demander s'il y a distinction des deux types d'horloge chez ce vertébré.

## B. Le modèle du poisson-zèbre

Le poisson-zèbre (*Danio rerio*) est un vertébré. Le modèle du poisson-zèbre a plusieurs avantages pour l'étude en biologie du développement animal et notamment l'étude des rythmes circadiens. En effet, les embryons sont petits et transparents et se développent rapidement : en 2 à 3 mois, les poisson-zèbres atteignent l'âge adulte et sont capables de se reproduire. Leur développement externe facilite l'observation au microscope et leur manipulation.

### 1. Mécanismes moléculaires de l'horloge circadienne du poisson-zèbre

Le fonctionnement moléculaire des rythmes circadiens est basé sur une principale boucle de rétro-régulation. Cette boucle implique les gènes *per* (*period*), *cry* (*cryptochrome*), *bmal* et *clock*.

Cette boucle met en jeu les gènes activateurs *Clock* et *Bmal* qui entraînent l'expression des gènes répresseurs *Per* et *Cry*, qui vont par rétro-régulation négative inhiber leur propre expression et ainsi induire un nouveau cycle de la boucle. Les deux protéines activatrices, CLOCK et BMAL appartiennent à la famille des facteurs de transcription bHLH (basic helix loop helix) contenant le domaine PAS. Ce domaine PAS va leur permettre de se dimériser et de se lier à l'ADN. Les hétérodimères CLOCK/BMAL formés, vont se lier à une région, dite E-box, du promoteur des gènes *Per* et *Cry* et induire leur transcription dans le cytoplasme. Après avoir été traduites, les protéines PER et CRY vont dimériser et ainsi former des complexes PER/CRY qui vont être transférés dans le noyau. Ces complexes PER/CRY vont inhiber l'action du complexe CLOCK/BMAL et donc l'activation transcriptionnelle des gènes *Per* et *Cry*.

Pour la stabilisation de cette boucle, s'ajoute une autre boucle de rétro-régulation négative (dite stabilisante). Elle est similaire à celle chez la souris.

REV-ERB $\alpha$  est un récepteur nucléaire qui, en se liant à la région RORE du promoteur de *bmal*, va inhiber la transcription de *bmal*. L'hétérodimère CLOCK/BMAL va activer l'expression de REV-ERB $\alpha$  en se liant à la région E-box du promoteur du gène du récepteur nucléaire. Un autre récepteur nucléaire, ROR $\alpha$ , a une action positive sur l'expression de BMAL. Une récente étude a démontré l'action positive de la protéine Per2 sur l'expression de Bmal en se liant à Ror $\alpha$ . Il a été aussi démontré que Per2 a besoin de Ror $\alpha$  pour réprimer l'action négative de Revb $\alpha$  (Wang et al., 2015). C'est donc une double inhibition. Cependant les mécanismes sont encore mal connus.

### 2. Particularités du poisson-zèbre

Chez le poisson-zèbre, il existe un plus grand nombre de gènes impliqués dans le processus des rythmes circadiens que chez la souris. Le poisson-zèbre possède quatre gènes *per* orthologues des gènes *per* de la souris : *per1a*, *per1b*, *per2* et *per3*. Il existe six gènes *cry* paralogues des gènes *cry* de la souris : *cry1a*, *cry1b*, *cry2*, *cry3*, *cry4*. Les gènes *cry3* et *cry4* ne semblent pas avoir de fonction inhibitrice sur CLOCK/BMAL. (Vatine et al., 2011)

Chez les mammifères, la lumière est perçue par les cellules ganglionnaires de la rétine. L'information atteint l'horloge centrale du NSC, ce qui provoquera des modifications transcriptionnelles des gènes *per*.

Cependant chez le poisson-zèbre, la réception par des cellules de la rétine n'est pas nécessaire : les cellules sont considérées comme photosensibles (Cahill, 2002).

### C. Mécanismes photosensibles des cellules du poisson zèbre

Les cellules et les tissus du poisson-zèbre contiennent une horloge intrinsèque et sont photorécepteurs.

Que ce soit chez les mammifères ou chez le poisson-zèbre, en conditions d'obscurité constante ("libre cours"), un rythme circadien est conservé. Des oscillations sont observées mais elles sont aléatoires.

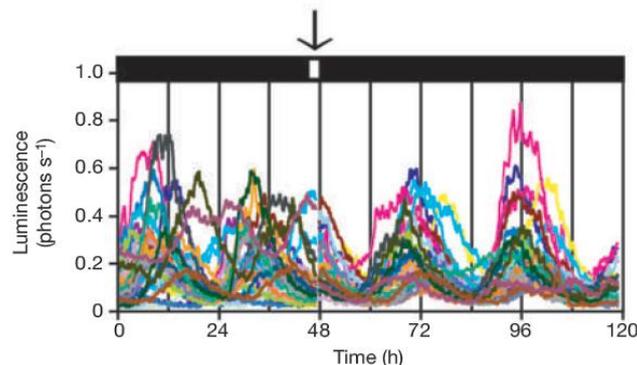
Chez le poisson-zèbre, la période en libre cours (obscurité constante) est de 25.6 heures (Kurosawa et Goldbeter, 2006). Dans ces conditions, le gène *per* est faiblement exprimé.

En conditions de lumière constante, l'amplitude de l'expression des gènes diminue fortement, voire entraîne l'absence de rythme (Tamai et al., 2007).

Les gènes photosensibles sont *per2* et *cry1a*. Des études ont montré qu'une entrée de lumière entraîne une augmentation des gènes *per2* et *cry1a* (Tamai et al., 2005).

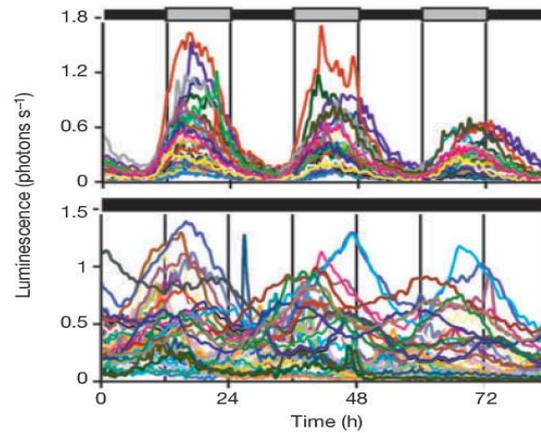
Des chercheurs ont montré qu'après un envoi de trois heures de lumière sur des cellules intestinales isolées, le gène *Cry1a* est trois fois plus exprimé qu'en obscurité constante et le gène *Per2* l'est environ quinze fois plus (Peyric et al., 2013).

Des chercheurs ont réalisé une expérience (Tamai et al., 2005) : ils ont envoyé un flash lumineux de 15 minutes sur des cellules maintenues en situation de libre cours. Suite à cette expérience il a été observé un décalage de phase. Un court envoi de lumière induit donc un déphasage rapide de l'horloge circadienne. (Fig.1)



*Figure 1 : Dépendance photosensible des rythmes physiologiques. La flèche indique l'arrivée de lumière d'une durée de 15 min chez des cellules maintenues en obscurité constante*

La lumière permet donc une synchronisation de l'horloge circadienne du poisson-zèbre. En période d'alternance jour/nuit, la période est de 24heures, avec une amplitude élevée pendant le jour et faible la nuit. (Fig.2)



*Figure 2 : Luminescence de cellules en période d'alternance jour/nuit (panel du haut) et en obscurité constante (panel du bas).*

Un passage de conditions d'alternance jour/nuit à une situation d'obscurité totale entraîne un faible amortissement de l'expression des gènes photosensibles.

Ces deux gènes photosensibles *per2* et *cry1a*, en plus de la boîte E, possèdent dans leur promoteur la boîte D. Il existe un facteur de transcription TEF qui se lie à cette boîte D. L'expression de TEF est elle-même régulée par la lumière, ainsi TEF dirige l'expression des gènes photosensibles (Vatine et al., 2011).

## II. Modélisation

Pour la suite de notre projet, nous allons utiliser le logiciel COPASI afin de modéliser notre modèle biologique du poisson zèbre.

COPASI est une application open source pour créer et résoudre les modèles mathématiques de processus biologiques comme des réseaux métaboliques, de signalisation cellulaire, des maladies infectieuses et beaucoup d'autres.

À l'aide de ce logiciel nous allons étudier le cycle circadien du poisson-zèbre. Dans un premier temps, nous allons construire un modèle simple du cycle circadien, c'est à dire sans introduire la composante lumineuse. Dans un second temps, nous allons construire un second modèle qui prendra en considération le facteur de la lumière. Enfin, nous allons étudier ces deux modèles et les comparer.

Pour construire un modèle dans copasi, la première démarche à effectuer est d'écrire le nom du modèle et sélectionner les unités. Dans notre étude les paramètres seront les suivants : le temps en heure, les concentrations en nmol et les volumes en litres. Ensuite le nombre et nom des compartiments doivent être défini. Après cela nous devons rentrer les réactions importantes que nous voulons étudier pour notre modèle.

Par exemple, pour la transcription de l'espèce A nous devons écrire :  $\rightarrow A$

Cela s'explique de la manière suivante : l'espèce A se forme à partir d'une espèce non connue.

Dans COPASI il existe une trentaine de fonctions mathématiques et pour chaque réaction nous devons choisir une fonction qui caractérise au plus proche cette réaction. Nous pouvons aussi créer une fonction si ce que nous cherchons ne figure pas parmi les fonctions existantes.

Après avoir choisi la fonction il faut aller dans l'onglet parameter overview et il faut choisir les valeurs des paramètres que nous trouvons dans les articles scientifiques. Nous pouvons ensuite tracer un diagramme qui permettra de visualiser le modèle et l'interaction des différentes espèces entre elles.

Il est également possible de visualiser la concentration des différentes espèces en fonction du temps. Il faut alors créer un « plot » dans « output specifications » en choisissant en ordonnées les concentrations des espèces et en abscisse le temps. Il faut ensuite aller dans « Tasks » et « Time course » et il faut choisir l'échelle et l'intervalle du plot souhaité et appuyer sur « Run » pour voir le plot.

D'autres manipulations peuvent être effectuées à l'aide du logiciel que nous verrons dans la suite du document.

### A. MODELE SANS LUMIERE :

Nous avons décidé de construire ce modèle « simple » afin de mieux comprendre le fonctionnement du cycle circadien dans sa généralité, comme chez les mammifères par exemple.

Pour ce modèle nous avons besoin des réactions suivantes. Pour chacune de ces réactions, une fonction devra être choisie et sera expliquée après.

#### \* -> **CLOCK**

Par cette réaction nous modélisons la transcription du gène CLOCK. La fonction choisie est flux constant.

#### \* -> **BMAL1; PERs**

Ici c'est l'activation de transcription indirecte de BMAL1 par PERs.

Rev-erb  $\alpha$  inhibe la transcription de BMAL1, et PERs inhibe Rev-erb  $\alpha$ . On considère donc qu'une double inhibition équivaut à une activation. On utilise la fonction Transcription.

\* **CLOCK + BMAL1 -> CLOCKBMAL1**

Ici c'est la représentation de la formation du complexe protéique CLOCK/BMAL1 résultant de l'association entre CLOCK et BMAL1. Nous avons choisi la loi d'action de masse de type irréversible.

\* **-> PERs; CLOCKBMAL1**

On représente la transcription du gène PERs grâce à l'action du complexe CLOCK/BMAL1. On utilise également la fonction transcription.

\* **-> CRYs; CLOCKBMAL1**

La transcription du gène CRYs se fait de la même manière que celle de PERs.

\* **CRYs + PERs -> CRYsPERs**

C'est la formation du complexe CRYs/PERs avec l'association de CRYs et PERs avec la fonction de loi d'action de masse.

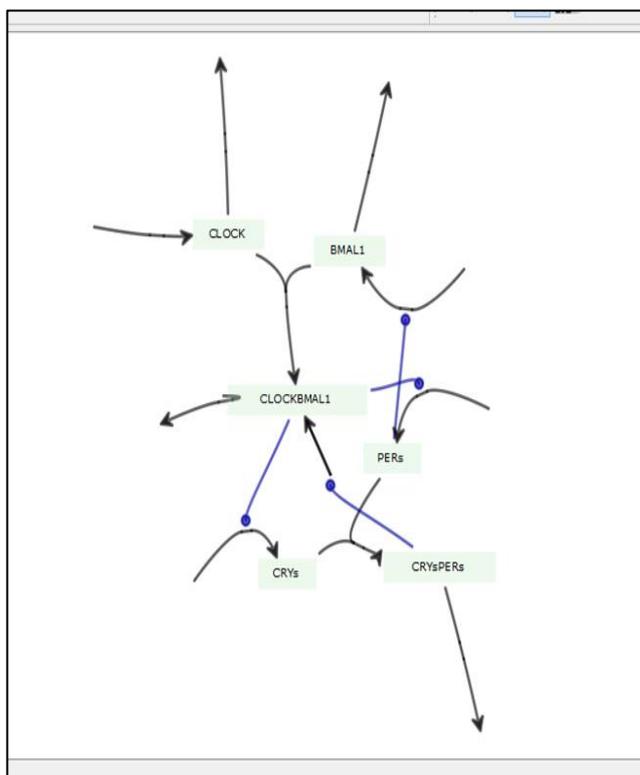
\* **CLOCKBMAL1 -> CLOCKBMAL1; CRYsPERs**

Par cette réaction nous représentons l'inhibition de clockbmal1 par le complexe CRYs/PERs.

\* **CLOCKBMAL1 ->**

Cette réaction représente la dégradation du complexe CLOCKBMAL1, elle est représentée par la fonction de loi d'action de masse de type irréversible. Toutes les autres dégradations sont représentées de la même manière.

Avec ces réactions nous obtenons le diagramme suivant (fig.3) :



Les flèches noires représentent la formation ou la dégradation de l'espèce.

Les flèches bleues représentent l'activation ou l'inhibition de l'espèce. Copasi n'a pas la faculté de différencier activation et inhibition.

On voit bien ici que le complexe CRYs/PERs inhibe la transcription de CLOCKBMAL1, ce qui est faux biologiquement, en effet normalement CRYsPERs devrait inhiber l'action de CLOCKBMAL1 sur les gènes CRYs et PERs.

*Figure 3 : Diagramme représentant l'ensemble des réactions*

Pour ce qui est des paramètres nous n'avons rien trouvé dans la littérature, nous avons alors essayé différents paramètres jusqu'à l'obtention des bons car si nous n'avons pas les bons paramètres nous n'aurons aucune oscillation et certains paramètres sont plus sensibles que d'autres. Nous allons alors voir l'évolution des cycles en fonction des paramètres changés.

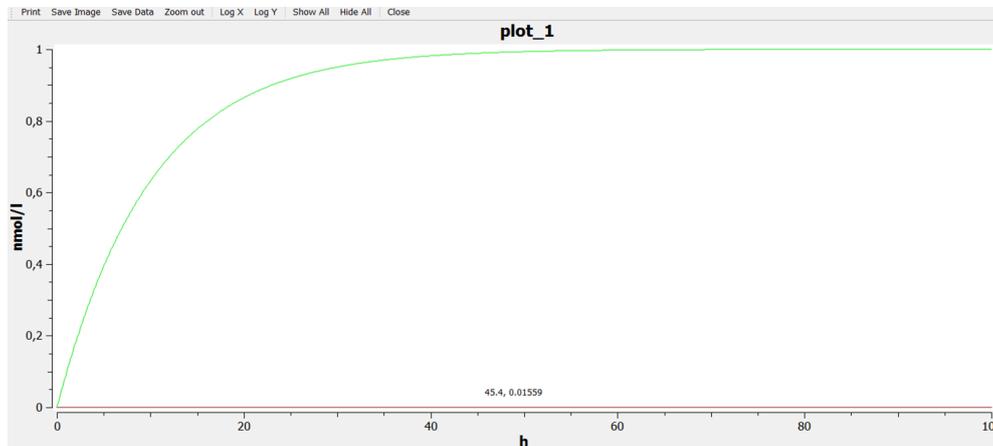


Figure 4 : représentation des concentrations des espèces en fonction du temps avec un paramétrage par défaut.

Nous avons choisi d'étudier le plot sur 100h.

Ici tous les paramètres ont été laissés à leur valeur par défaut qui est de 0.1.

Les concentrations initiales sont à 0.

On voit que les concentrations de chaque espèce sont à 0 il n'y a aucune évolution au cours du temps, mis à part celle de CLOCK qui atteint 1 nmol/l en 45h et on voit ensuite un plateau se former.

Nous avons ensuite laissé les concentrations initiales à 0 mais nous avons changé les paramètres comme ce qui suit :

| Kinetic Parameters     |    |       |                |
|------------------------|----|-------|----------------|
| Transcription CLOCK    | v  | fixed | 0,3 nmol/(l*h) |
| Transcription BMAL1    | V  | fixed | 0,5 ?          |
|                        | n  | fixed | 1,5 ?          |
| Transcription CRYs     | V  | fixed | 0,5 ?          |
|                        | n  | fixed | 1,3 ?          |
| Formation CLOCKBMAL1   | k1 | fixed | 0,5 l/(nmol*h) |
| Formation CRYsPERs     | k1 | fixed | 0,7 l/(nmol*h) |
| Inhibition CLOCKBMAL1  | k  | fixed | 0,5 ?          |
|                        | n  | fixed | 1,4 ?          |
| Transcription PERs     | V  | fixed | 1 ?            |
|                        | n  | fixed | 0,2 ?          |
| Dégradation CLOCKBMAL1 | k1 | fixed | 0,3 1/h        |
| deg CLOCK              | k1 | fixed | 0,3 1/h        |
| deg BMAL1              | k1 | fixed | 0,1 1/h        |

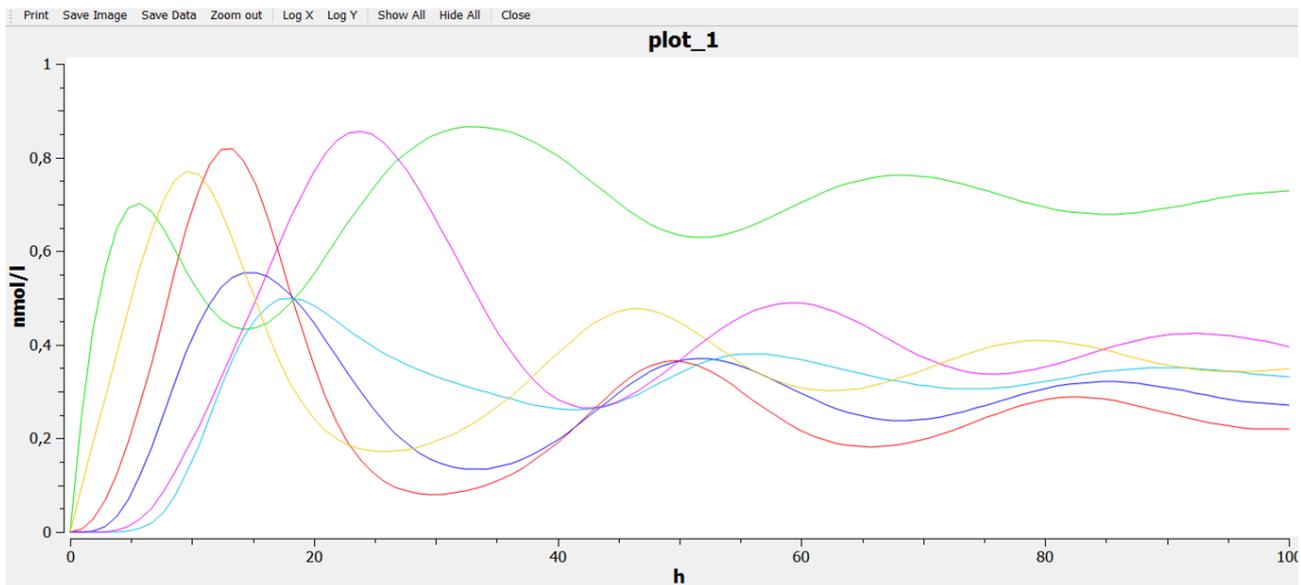
Toutes les constantes de dégradation sont égales à 0,3.

Pour la suite, par souci de lisibilité nous donnons le code couleur suivant pour les courbes :

- CRYs= rose
- PERs=jaune
- CRYsPERs= bleu ciel
- BMAL1= rouge
- CLOCK= vert
- CLOCKBMAL1=bleu foncé

Figure 5 : Tableau représentant les paramètres choisis

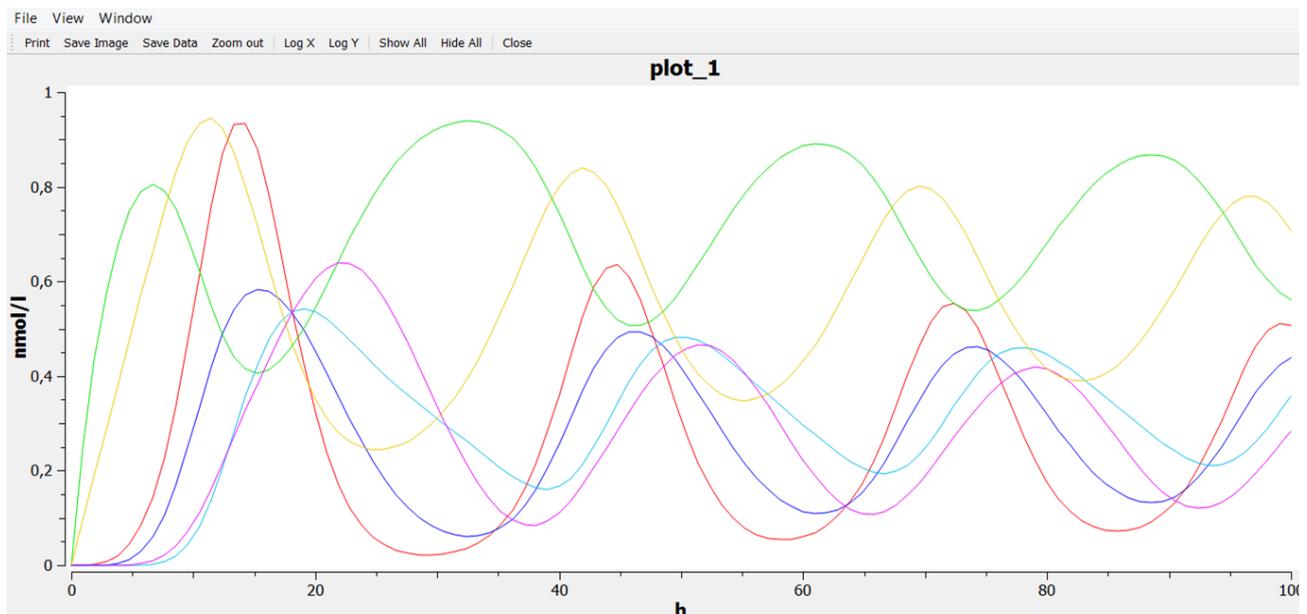
Nous obtenons alors le plot suivant :



*Figure 6 : Plot correspondant aux paramètres de la figure 3.*

Avec ces paramètres nous voyons que nous commençons à avoir des oscillations mais à court terme, en effet on voit un amortissement des courbes. On voit également que selon les variables, les oscillations se font dans le même ordre de grandeur.

Le paramètre  $n$  de la transcription de BMAL1 est très sensible, en effet en augmentant sa valeur on diminue les amortissements, voire on les fait disparaître. On change alors la valeur de  $n$  de 1.5 à 3 et on obtient (fig.7) :



*Figure 7 : représentation du plot après augmentation de la transcription de BMAL1.*

On voit que l'amplitude de la concentration de BMAL1 diminue légèrement au cours du temps.

Nous observons aussi un cycle de 30h.

Malgré cela on voit qu'il y a quand même un décalage de phase entre les 2 complexes. En effet le pic de CRYSPERs doit arriver après celui de CLOCKBMAL1 et c'est ce qu'on

obtient ici car ce dernier entraîne l'oscillation de CRYsPERs.

Nous avons par la suite donné des valeurs aux concentrations initiales des différentes espèces, nous avons choisi pour CLOCK et PERs 1.5 nmol/l comme concentration et pour CRYs et CRYsPERs 2nmol/l. Celle de BMAL1 vaut 1 nmol/l. Et celle de CLOCKBMAL1 vaut 0.7 nmol/l.

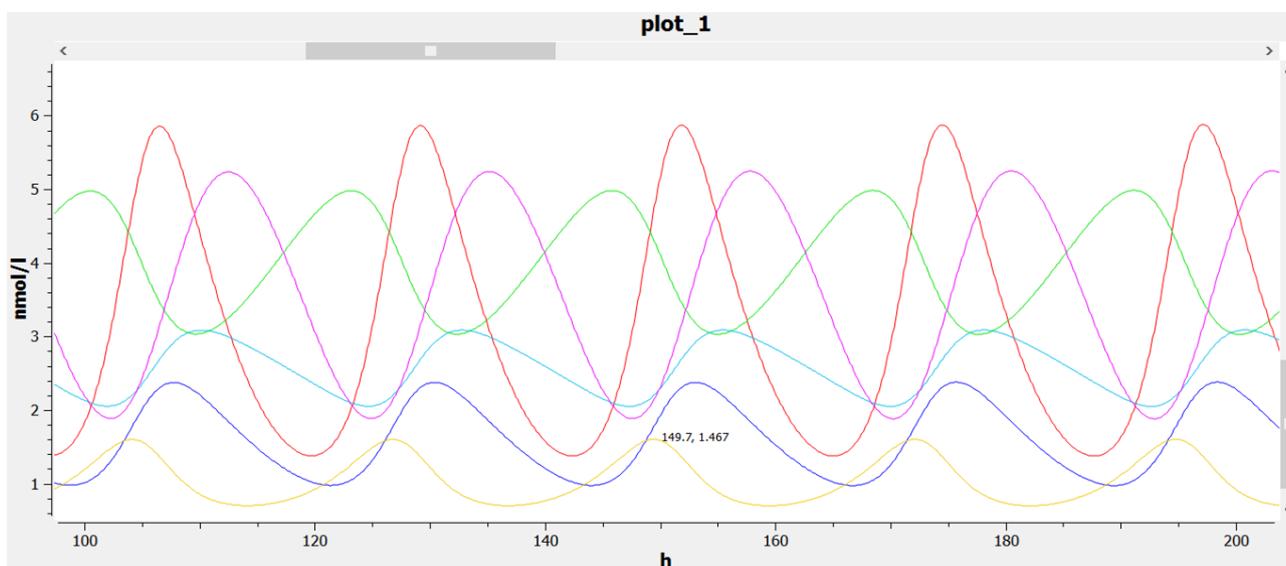
Le couple des gènes CLOCK et BMAL1 n'ont pas la même concentration initiale et en testant le modèle nous avons remarqué que ces valeurs sont sensibles. C'est aussi le cas pour les gènes PERs et CRYs.

Dans ce modèle nous avons au début choisi pour la transcription de PERs la fonction flux constant, nous l'avons par la suite changée en Transcription comme valeurs nous avons choisi un  $V= 1$  et un  $n = 0,25$  car plus le  $n$  a une grande valeur plus la courbe s'aplatit et inversement, plus il a une petite valeur plus on obtient des oscillations. Nous avons également diminué le taux de formation des complexes. Celui de CLOCKBMAL1 passe à  $0.04 \text{ l}/(\text{nmol}\cdot\text{h})$  et celle de CRYsPERs à  $0.3$  afin d'obtenir une période de 26h, mais on voit qu'il y a des amortissements. Il faut donc augmenter le taux de transcription de CLOCK qui passe à  $0.8 \text{ nmol}/(\text{l}\cdot\text{h})$ .

Les constantes de dégradation des gènes sont égales à 0.08.

De plus nous avons changé les concentrations initiales. Chaque couple de gène a la même concentration.

Le plot correspondant est le suivant (Fig.8) :



*Figure 8 : représentation du plot après seconde modification des paramètres.*

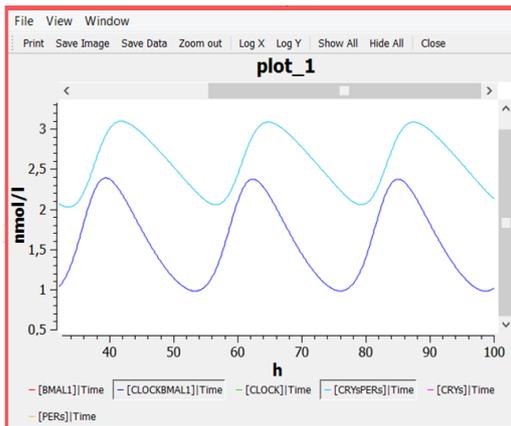
L'amplitude de chaque espèce est devenue constante, même BMAL1 ne diminue plus.

Pour avoir un décalage de la période il a fallu ralentir l'inhibition et la vitesse de transcription de PERs et de CRYs. Nous avons réussi à avoir une période autour de 26h.

Pour le décalage entre les deux complexes, c'est la transcription de PERs qui est très sensible.

Ce modèle est très sensible au pas de temps avec un intervalle de 1,2 on a des angles au niveau de PERs et ce n'est pas très régulier, lorsqu'on met 0,1 comme pas de temps et on voit que cela devient constant. Il s'agit de l'équation de Euler.

Nous pouvons maintenant analyser de plus près les cycles :

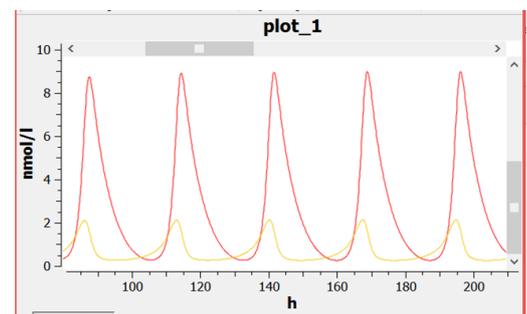


*Figure 9 : représentation des concentrations des deux complexes*

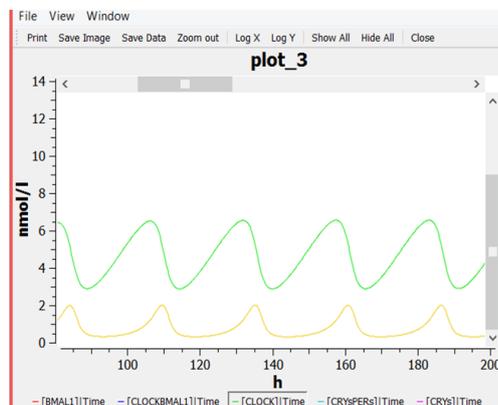
Ici (Fig.10) on étudie les cycles de BMAL1 et de PERs.

On voit que le pic de PERs vient avant celui de Bmal1. En effet, selon notre modèle PERs active la transcription de BMAL1 donc il doit être présent avant ce dernier.

Ceci est faux biologiquement : BMAL1 devrait apparaître avant PERs.



*Figure 10 : représentation des concentrations de BMAL1 et CRY*



*Figure 11 : représentation des concentrations de CLOCK et PERs*

Contrairement à ce qu'on a vu plus haut, le pic de PERs vient après celui de CLOCK et d'après notre modèle c'est logique car CLOCK active la transcription de PERs et donc ce dernier arrive après. De plus PERs n'a aucune action sur CLOCK comme avec BMAL1. Cette représentation est donc normale.

## B. MODELE AVEC LA LUMIERE

Nous avons réussi à modéliser la lumière de deux manières différentes, commençons par la plus complexe et la moins juste biologiquement. Il s'agit ici de créer une boucle de plusieurs espèces dont deux représentent des variables X et Y. Il est bon à savoir que ces réactions sont toutes des Mass action de type irréversible.

On a une espèce A qui se transforme en X, X donne Y et se dégrade en E. et il y a une réaction qui se fait en parallèle B donne D et ce favorise la production de Y. Y va ensuite redonner X.

C'est la variable Y qui va activer la transcription de CRYs et PERs.

Cette boucle génère des oscillations de 24H.

Lorsqu'on fait rentrer la lumière on obtient un décalage de la période, en effet celle-ci se raccourcit et on obtient un cycle de plus ou moins 24h. Voyons un exemple de deux cycles des deux complexes en présence de la lumière.

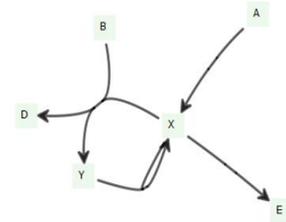


Figure 12 :

Nous voyons ici qu'on a toujours un décalage entre CLOCKBMAL1 et CRYsPERs regardons le premiers pic pour CLOCKBMAL1 il arrive à 200h et pour CRYsPERs il est vers 205h. Pour ce qui est de la période on voit que le premier cycle de CLOCKBMAL1 commence à 190h et se termine entre 213 et 214 h, ce qui fait bien un cycle de 24h. De plus nous voyons que la concentration de CRYsPERs augmente ce qui est biologiquement vrai. Mais celle de CLOCKBMAL1 diminue de peu.

Nous avons alors pu modéliser la lumière avec une boucle dont le cycle est de 24h ce qui correspond bien à un rythme circadien.

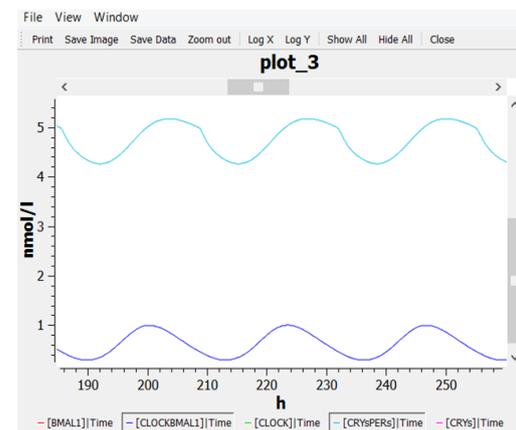


Figure 13 : représentation des deux complexes avec la boucle de lumière

Regardons maintenant de plus près la 2eme manière de modéliser la lumière et qui est correcte mathématiquement. Il s'agit ici d'utiliser la fonction sinus. La fonction sinus est utilisée couramment pour modéliser des phénomènes périodiques comme les ondes sonores ou lumineuses ou encore les variations de température au cours de l'année. Pour notre modèle cette fonction est idéale.

Nous avons alors introduit la réaction suivante :  $\rightarrow \text{lum}$

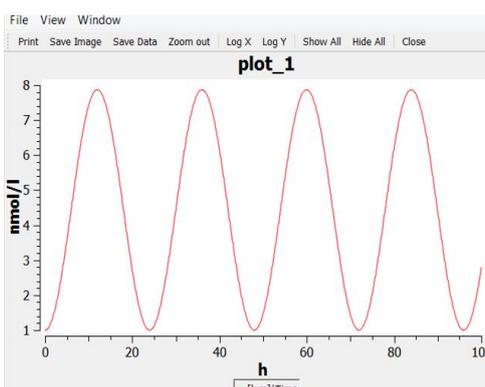


Figure 14 : représentation de la fonction sinus

Elle prend pour fonction la fonction sinus que nous avons créée. Et dans parameter overview nous avons choisi les valeurs suivantes :  $a=0.9$  et  $b=0.262$ . Ce sont les valeurs idéales pour que cette réaction oscille d'une cyclique et avec une période de 24h.

On voit que cette fonction oscille de manière constante et la période est de 24H exactement.

Nous avons bien ici une oscillation circadienne qui pourrait bien représenter le facteur lumière.

La période de lumière est représentée par la partie croissante de la courbe et l'obscurité par la partie décroissante. On voit alors que la lumière a une période de 12h et l'obscurité 12h aussi.

Nous allons maintenant faire entrer le facteur lumière dans le modèle simple que nous avons créé précédemment et plus précisément nous allons utiliser la lumière comme activateur de la transcription des gènes CRYs et PERs. Pour cela nous avons créé deux nouvelles réactions avec la fonction transcription

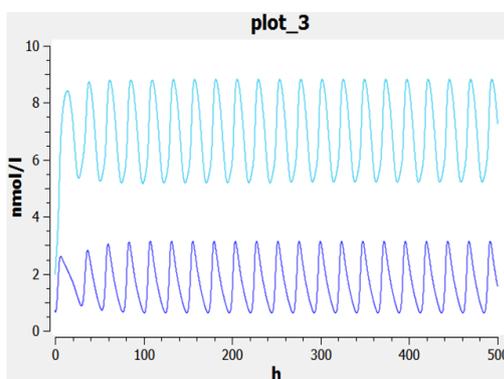
\* -> CRYs; lum

\* -> PERs; lum

Pour ces deux réactions on laisse les valeurs de paramètres par défaut : 0.1 et lorsque nous regardons de plus près un cycle de CLOCKBMAL1, celui-ci commence entre 104 et 105h et se termine en 130h. Ceci fait un cycle de 26h.

Il y a un décalage des deux complexes de 2h, toujours sur le même cycle le pic de CLOCKBMAL est à 112H celui de CRYsPERs est à 114h.

Regardons maintenant ce qu'on obtient en changeant les valeurs des transcriptions de PERs et CRYs avec transcription de PERs qui vaut :  $n=0,3$  et  $V=1$  et la transcription de CRYs qui vaut :  $n=0,3$  et  $V=1$ .

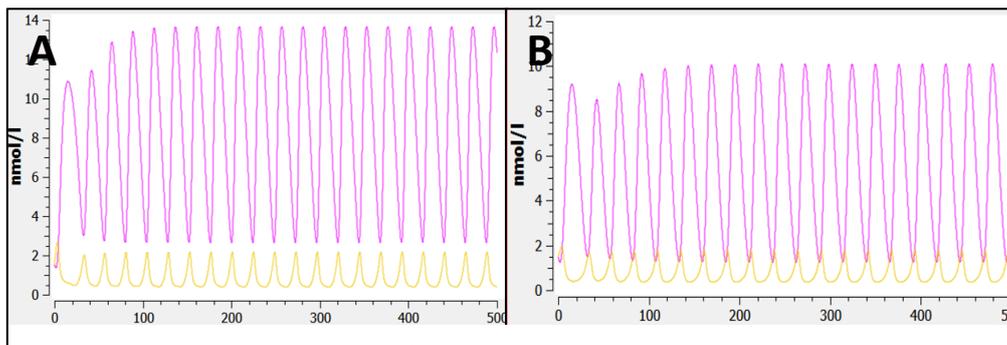


*Figure 15 : représentation des deux complexes avec la lumière sous forme de sinus*

Regardons le cycle qui commence à 100h, il commence exactement à 100,4 et se termine à 124,3. On obtient un cycle de 24H. La lumière a donc un effet sur la régulation de la période.

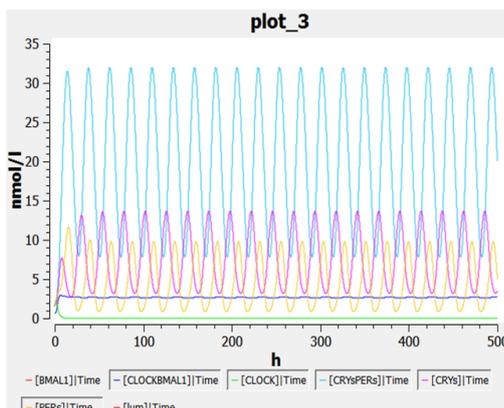
Il est également important de noter que la concentration de CLOCKBMAL1 n'a pas changé par rapport au plot précédent, tandis que celle du complexe CRYsPERs double, nous allons voir à quoi est dûe cette augmentation.

Regardons maintenant l'amplitude des gènes CRYs et PERs sous l'action de la lumière et sans lumière (Fig.16) :



*Figure 16 : Amplitudes d'oscillation de CRYs et PERs en présence (A) ou en absence (B) de lumière.*

On voit ici qu'en absence de lumière la concentration de CRYs est égale à 10nmol/l et celle de PERs est à 2 nmol/l. Tandis qu'en présence de la lumière la concentration de CRYs augmente jusqu'à 14 nmol/l et celle Prs reste la même. Ce qui explique ce qu'on a vu précédemment, c'est à dire l'augmentation de la concentration du complexe CRYsPERs. Ici la lumière ne semble pas agir sur PERs. Nous avons essayé d'augmenter l'amplitude de PERs en faisant varier les paramètres nous avons réussi mais cela dérégla le système et plus précisément les oscillations du gène CLOCK et ce qui entraîne le dérèglement du complexe CLOCKBMAL1.

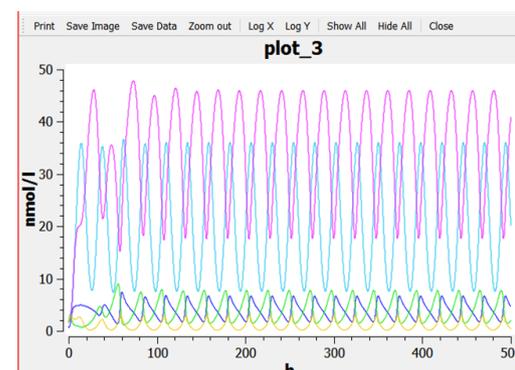


*Figure 17 : représentation des concentrations des espèces après modification des transcriptions de PERs et CRYs*

Ici on voit qu'après avoir changé les paramètres de transcriptions des deux espèces CRYs et PERs on réussit à faire augmenter la concentration de PERs jusqu'à 10 nmol/l et garder celle de CRYs constante. Mais on voit également le complexe CLOCKBMAL1 et CLOCK qui n'oscillent plus. Il faut alors régler les paramètres de transcription de ces derniers.

Pour régler ce problème nous avons augmenté la concentration de CLOCK à 1.5 nmol/(l\*h) (fig.21). Nous avons obtenu à nouveau des oscillations de CLOCK et du complexe. Cependant, la concentration de PERs revient à 2 nmol/l et celle CRYs augmente beaucoup comme nous pouvons le voir ci-dessus.

Nous voyons clairement que la concentration de PERs et celle de CRYs sont directement liées à celle de CLOCK. L'augmentation de cette dernière fait baisser le taux de PERs et augmenter le taux de CRYs. Inversement, lorsqu'on fait baisser la concentration de BMAL1 la concentration de PERs augmente et celle de CRYs baisse.



*Figure 18 : représentation des concentrations des espèces après augmentation de la transcription de CLOCK.*

Nous avons également essayé de voir comment se comporterait le modèle en présence de lumière constante, c'est-à-dire en supprimant l'alternance lumière/obscurité. Pour cela il suffit de baisser la valeur de la fréquence de la lumière. On la définit à 0,001 et l'amplitude à 0.1. La courbe de ce facteur prend une allure exponentielle à partir de 200h mais pendant les 100 premières heures la quantité de lumière est très faible voire nulle et c'est pendant cette phase que le système oscille encore comme précédemment mais lorsque la quantité de lumière commence à augmenter considérablement on observe un amortissement qui se fait dû à la faible quantité des espèces, nous avons alors doublé les valeurs de transcriptions de chaque espèce, nous obtenons alors de nouveau des oscillations avec la lumière constante, nous observons alors que la période diminue et un amortissement. On choisit d'étudier un cycle du complexe CLOCKBMAL1, ce cycle commence en 358h et se termine en 377h on obtient alors une période de 19h. Le système en présence de lumière seule n'a plus une période de 24h, cela est attendu puisque en obscurité totale la période était de 26h, lorsqu'on ajoute le facteur lumière on passe à une période de 24h la lumière raccourcit donc la période il est alors normal d'obtenir une période de moins de 24h en présence de lumière continue.

Avec ce logiciel nous sommes capables de modéliser un système qui ressemble plus ou moins à la réalité. En effet malgré la forte similarité entre ce modèle et la réalité, on peut observer quelques divergences entre ces deux derniers, notamment au niveau des décalages des phases et de l'amplitude comme nous l'avons expliqué précédemment. Et nous avons pu constater qu'il est important de maintenir une alternance entre la lumière et l'obscurité pour avoir une période de 24h et pour le bon fonctionnement du système.

### III. Démarche mathématique

#### A. Les fonctions

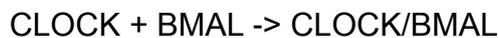
Copasi a l'avantage de transformer une certaine modélisation des réactions en un système d'équations différentielles. Le système présente cinq équations différentielles, donc cinq dimensions. Ce n'est pas un système linéaire.

Les protéines et les gènes sont des variables du système. Les équations représentent toujours la concentration des variables en fonction du temps.

$$d[\text{variable}] \cdot V / dt \quad (V \text{ étant le volume du compartiment})$$

Copasi propose, pour chaque réaction, une loi qui correspond à une fonction. Nous avons la possibilité de créer les fonctions.

Pour la formation de l'hétérodimère CLOCK/BMAL, la loi utilisée est la loi d'action de masse :



Ainsi la vitesse de la réaction est proportionnelle aux concentrations de chacun des réactifs :

$$d[\text{CLOCK/BMAL}] \cdot V / dt = V \cdot k \cdot [\text{CLOCK}] \cdot [\text{BMAL}] \quad k \text{ est une constante à valeur que l'on fixe}$$

Pour la dégradation d'une espèce, nous avons de même choisi cette loi d'action de masse. Nous avons essayé avec la loi proposée qui est le flux constant. Cependant, avec un flux constant, la dégradation ne dépendra pas de la concentration de l'espèce.

Dégradation de l'espèce CLOCK :  $\rightarrow$  CLOCK

Flux constant :  $d[\text{CLOCK}] \cdot V / dt = V \cdot k$  (k est une constante)

Loi d'action de masse :  $d[\text{CLOCK}] \cdot V / dt = V \cdot k \cdot [\text{CLOCK}]$  (k est la constante de dégradation)

Copasi possède une bibliothèque d'exemples de modèles. L'un d'entre eux contenait une fonction :  $v \cdot \text{modifier}^n$ . C'est à partir de cette fonction que nous avons créé la fonction Transcription plus précisément pour l'activation de la transcription.

Formule de transcription :  $k \cdot \text{modifier}^n$

k et n sont des paramètres constants

modifier correspond à la concentration en nmol/l de l'activateur (elle évolue)

Ainsi, l'augmentation de la concentration de l'activateur entraînera une augmentation de la variable « activée ». Par exemple, la transactivation de CRY par CLOCK/BMAL :

$$\rightarrow \text{CRY} ; \text{CLOCK/BMAL} \quad d[\text{CRY}] \cdot V / dt = V \cdot k \cdot [\text{CLOCK/BMAL}]^n$$

Pour l'inhibition, nous avons créé la fonction Inhibition dont la formule est :  $k / \text{modifier}^n$

k et n sont des paramètres

modifier correspond à la concentration de l'inhibiteur

Ainsi, l'augmentation de l'inhibiteur entraînera la diminution de l'inhibé. Et inversement.

Pour la transcription de CLOCK, nous avons choisi la loi proposée « flux constant », car cette transcription ne dépend pas d'autre variable : on a bien un flux constant.

Pour modéliser l'entrée de lumière, nous avons créé une fonction sinusoïdale de la formule suivante :  $a \cdot \sin(b \cdot x)$   
 a représente l'amplitude et b la fréquence. a et b sont des paramètres constants dont la valeur est à fixer. Et x représente le temps pour pouvoir obtenir une sinusoïde. En effet, Copasi ne nous permet pas de définir une variable, par exemple ici x, dans un intervalle comme  $[0 ; 2\pi]$ .

Explication d'une équation différentielle :

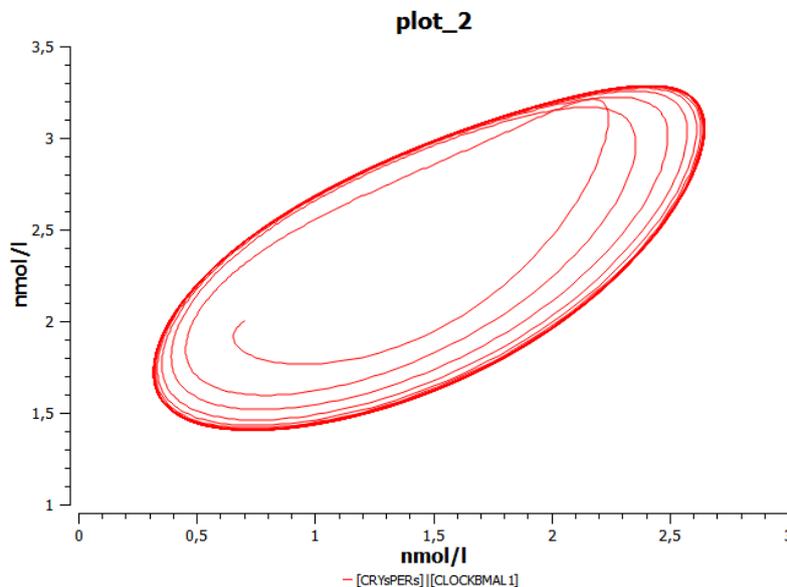
$$d([\text{CLOCK}] \cdot V) / dt = + V \cdot 0.8$$

$$- V \cdot (0.08 \cdot [\text{CLOCK}])$$

$$- V \cdot (0.04 \cdot [\text{CLOCK}] \cdot [\text{BMAL}])$$

Dans les équations différentielles, le signe + correspond à une transcription ou une formation, tandis que le signe - équivaut à une dégradation. On peut généraliser en disant, le signe - indique que la variable de l'équation différentielle est un réactif, et le signe + indique que la variable est le produit dans la réaction.

## B. Représentations graphiques



*Figure 19* : Représentation graphique de la concentration de CRYsPERs en fonction de CLOCKBMAL1

Sur ce plot (Fig.19), une courbe est tracée qui part à un instant  $t=0$  et qui évolue au cours du temps. A tout instant  $t$  la coordonnée du point sera les équations  $d[\text{variable}]/dt$ . Il n'y a qu'une seule solution. Au fur et à mesure que le temps évolue, on aura une courbe qui représente notre trajectoire. Dans notre cas où il y a cinq dimensions, cette courbe habite dans  $R^5$ . Cette courbe, avec ces équations, ne peut pas se recouper. Il n'y a donc qu'une

seule solution à chaque temps.

Cette courbe est projetée sur deux dimensions.

Ce que l'on voit quand le « cercle » s'épaissit, est ce qu'on appelle le cycle limite.

Si on part à n'importe quel point, on finira par tendre vers le cycle qui est ici épais.

C'est un comportement périodique limite. C'est intéressant dans le cas du rythme circadien. Une cellule, dans son équilibre est périodique par contre en cas de stress, le rythme est changé : on n'est plus dans le comportement normal mais il s'en rapproche et rentre à nouveau dans le cycle normal.

On parle de cycle limite quand toutes les autres trajectoires tendent vers ce cycle-là.

On voit qu'en présence de lumière, le cycle s'est déplacé légèrement vers la droite et un peu plus en haut.

Le début correspond au temps qu'il faut pour rejoindre le cycle (40h) : c'est la phase d'approche.

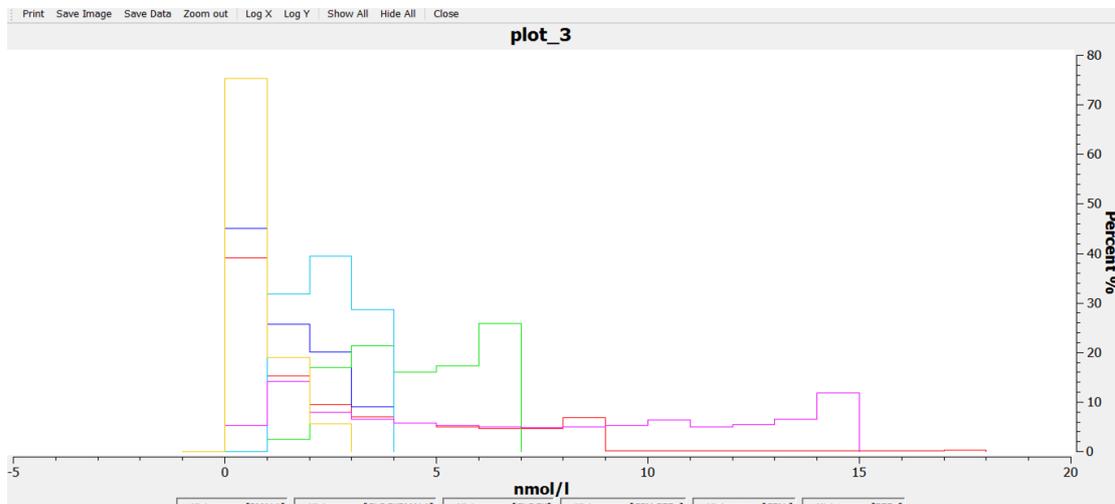
En changeant les concentrations initiales, on voit que l'approche change mais cela ne change pas le cycle une fois que l'on est dessus. Ça se stabilise de la même façon.

C'est donc bien un cycle limite.

Les amortissements que l'on obtenait pendant nos essais correspondent à un équilibre stable. Et en jouant sur les paramètres, on a pu rendre cet équilibre instable, et donc apparaît un cycle.

Dans notre système d'équations différentielles, rien n'est périodique et pourtant elles créent un phénomène oscillatoire.

Copasi nous permet également d'obtenir des représentations graphiques en histogramme.

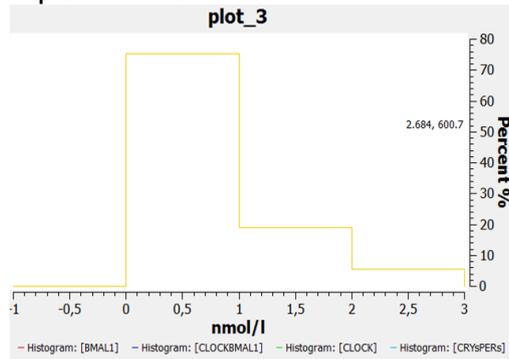


*Figure 20 : histogramme qui représente le pourcentage de temps en fonction des concentrations.*

Cet histogramme permet de montrer l'occurrence qu'une espèce se retrouve à une concentration et on peut en déduire la concentration idéale de cette espèce. On voit que ce pourcentage est très différent selon les espèces. L'étude de cet intervalle est intéressante car cela nous donne une idée des valeurs des paramètres.

Lorsqu'on vérifie nos paramètres on voit bien que ceux-ci se trouvent dans l'intervalle indiquée dans l'histogramme.

Voyons de plus près un exemple : PERs



*Figure 21* : histogramme représentant le pourcentage de temps en fonction de la concentration de PERs

On voit ici que la concentration idéale se trouve dans l'intervalle 0 et 1 nmol/l et la transcription de PERs se fait à 0.25 nmol/l donc on est bien dans le bon intervalle. Il serait intéressant d'étudier comment évoluerait le système si on choisit une valeur de la transcription de PERs hors de cet intervalle.

## Discussion

Comme nous l'avons vu précédemment le poisson zèbre est un bon modèle pour étudier l'horloge circadienne chez les vertébrés et l'action de la lumière dessus, de part sa petite taille qui le rend manipulable par l'homme et son grand nombre de gènes impliqués dans les rythmes circadiens.

Nous avons vu également qu'avec Copasi nous étions capables de construire des modèles à partir de réactions et des lois mathématiques cependant nous avons repérés quelques incohérences au sein de ces modèles avec la réalité, plus précisément au niveau des amplitudes et des décalages des cycles des espèces. En effet, nous avons vu que l'amplitude de Pers devrait être 15 fois plus grande avec le facteur lumière, or dans notre modèle l'amplitude de Pers ne change pas avec ou sans lumière. Il y a aussi le décalage entre les deux complexes CLOCKBMAL1 et CRYsPERs qui nous a posé problème, avec le modèle CRYsPERs n'était pas assez décalé à droite de l'autre complexe alors que biologiquement il devrait l'être, ici nous avons vu que son pic venait juste après celui de CLOCKBMAL1. Un dernier problème que nous avons détecté et que nous n'avons pas pu corriger est le fait que l'oscillation du gène CRY arrive après celle du complexe CRYsPERs alors que logiquement et d'après nos réactions, CRYsPERs est créé à partir des gènes CRY et PER et donc il devrait commencer à osciller après ces derniers, sauf qu'ici ce n'est pas le cas.

Copasi est un bon logiciel pour modéliser ce genre de phénomène mais n'est pas assez précis au niveau des oscillations, nous aurions pu utiliser un autre logiciel plus précis et que nous maîtrisons mieux comme Ccilib.

Du fait que nous avons pas du tout trouvé de paramètres dans les références bibliographiques pour mener notre projet à bien, nous pensons qu'un autre animal plus étudié que le poisson zèbre aurait été plus efficace et plus intéressant du point de vue biologique.

## Remerciements

Nous sommes convaincues que notre projet est loin d'être un travail solitaire. En effet nous n'aurions jamais pu réaliser ce travail sans le soutien de nos professeurs.

Nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apporté leur aide pour la réalisation de notre projet.

Nous remercions vivement Mr. Delaunay, Mr. Coquillard et Mr. Cornillon qui ont toujours été très disponibles et à notre écoute tout au long de la réalisation de notre projet.

Ils nous ont conseillé et nous fournissent de précieuses informations pour progresser dans notre projet.

Nous tiendrons également à remercier la doctorante Cécile pour avoir dirigé ce travail.

## Références

Cahill, G. M. (2002). Clock mechanisms in zebrafish, 27–34.

Kurosawa, G., Goldbeter A. (2006) Amplitude of circadian oscillations entrained by 24-h light–dark cycles *Journal of Theoretical Biology*, Volume 242, Issue 2, 478-488.

Peyric, E., Moore, H. a., & Whitmore, D. (2013). Circadian Clock Regulation of the Cell Cycle in the Zebrafish Intestine. *PLoS ONE*, 8(8), 1–12.

Tamai, T. K., Carr, a J., & Whitmore, D. (2005). Zebrafish circadian clocks: cells that see light. *Biochemical Society Transactions*, 33(Pt 5), 962–966.

Tamai, T. K., Young, L. C., & Whitmore, D. (2007). Light signaling to the zebrafish circadian clock by Cryptochrome 1a. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(37), 14712–14717.

Vatine, G., Vallone, D., Gothilf, Y., & Foulkes, N. S. (2011). It's time to swim! Zebrafish and the circadian clock. *FEBS Letters*, 585(10), 1485–1494.

Wang, M., Zhong, Z., Zhong, Y., Zhang, W., & Wang, H. (2015). The Zebrafish Period2 Protein-Positively Regulates the Circadian Clock through Mediation of Retinoic Acid Receptor (RAR)-related Orphan Receptor  $\alpha$  (Ror $\alpha$ ). *Journal of Biological Chemistry*, 290(7), 4367–4382.

## Annexe

Gantt chart :

