

Modélisation

Modèles déterministes et stochastiques pour les rythmes circadiens

Deterministic and stochastic models for circadian rhythms

D. Gonze *, J. Halloy, A. Goldbeter

Unité de chronobiologie théorique, faculté des sciences, université libre de Bruxelles, Campus Plaine, CP 231, B-1050 Bruxelles, Belgique

Reçu le 12 juillet 2002 ; accepté le 7 février 2003

Résumé

Les rythmes caractérisés par une période proche de 24 h sont générés, chez quasiment tous les organismes vivants, par l'autorégulation négative de l'expression de gènes de l'horloge circadienne. Les modèles déterministes fondés sur cette régulation génétique permettent de rendre compte de ces oscillations circadiennes dans des conditions environnementales constantes (en obscurité constante par exemple) et de l'entraînement de ces rythmes par des cycles lumière–obscurité. Lorsque le nombre de molécules d'ARNm et de protéines est faible, il est nécessaire de recourir à des simulations stochastiques pour déterminer l'influence du bruit moléculaire sur les oscillations circadiennes. Il est en effet possible que le mécanisme d'autorégulation de l'expression génétique ne puisse produire de rythme stable, en raison des fluctuations, si le nombre de molécules impliquées dans le mécanisme de l'horloge est peu élevé. Nous avons effectué la comparaison entre approches déterministe et stochastique pour un modèle fondé sur l'autorégulation négative d'un gène de l'horloge circadienne. Après avoir développé le modèle déterministe en étapes élémentaires, nous montrons, à l'aide de simulations numériques, que des oscillations circadiennes robustes peuvent se produire déjà pour un nombre de molécules de l'ordre de quelques dizaines d'ARNm et quelques centaines de protéines. En outre, les résultats indiquent que la coopérativité caractérisant la répression de la transcription augmente la robustesse des rythmes tandis que l'entraînement par des cycles lumière–obscurité stabilise la phase des oscillations circadiennes.

© 2003 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Abstract

Circadian rhythms, characterized by a period of about 24h, are generated in nearly all living organisms by the negative autoregulation of clock gene expression. Deterministic models based on this genetic regulation account for circadian oscillations in constant environmental conditions (e.g., in constant darkness) and for entrainment of these rhythms by light–dark cycles. When the number of clock mRNA and protein molecules is low, it is necessary to resort to stochastic simulations to assess the influence of molecular noise on circadian oscillations. Indeed, it is possible that the autoregulatory mechanism of gene expression might not produce stable rhythms due to fluctuations if the number of molecules involved in the clock mechanism remains too low. We have compared the deterministic and stochastic approaches for a model based on the negative autoregulation of a clock gene. We show by means of stochastic simulations that robust circadian oscillations can already occur when the maximum number of mRNA and protein molecules is of the order of a few tens or hundreds, respectively. Furthermore, the results indicate that the cooperativity characterizing the repression of the transcription process strengthens the robustness of circadian rhythms and that entrainment by light–dark cycles stabilizes the phase of the oscillations.

© 2003 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Bruit moléculaire ; Modélisation ; Rythme circadien

Keywords: Molecular noise; Design; Circadian rhythms

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : dgonze@ulb.ac.be (D. Gonze).

Les rythmes circadiens, caractérisés par une période proche de 24 h, sont observés chez quasiment tous les organismes vivants, des bactéries aux mammifères en passant par *Neurospora*, les plantes et les insectes [1,2]. Chez tous les organismes étudiés, le mécanisme moléculaire de ces rythmes repose sur l'autorégulation négative d'un gène de l'horloge circadienne. Cependant, le mécanisme détaillé des rythmes circadiens varie d'un organisme à l'autre. Ainsi, chez la drosophile, la protéine PER réprime l'expression de son propre gène, *per* [1,2] tandis que chez *Neurospora*, c'est la protéine FRQ qui réprime l'expression de son gène, *frq* [1,2]. Chez la drosophile, la protéine PER exerce sa répression en formant avec TIM un complexe dont le rôle est de bloquer l'activité du complexe CYC-CLK, activateur de la transcription [2].

Plusieurs modèles théoriques pour les rythmes circadiens, fondés sur les mécanismes de contrôle mis en évidence expérimentalement ont été proposés [3–7]. Tous ces modèles utilisent des équations différentielles pour décrire l'évolution temporelle des concentrations en ARNm et en protéine de l'horloge circadienne et peuvent générer des oscillations autonomes. En outre, ils permettent l'étude de différentes propriétés des rythmes circadiens comme l'entraînement par des cycles lumière–obscurité, les déphasages induits par des pulses de lumière ou le phénomène de compensation de température.

Un système d'équations différentielles déterministe offre une description globale de la dynamique de l'horloge circadienne. Cette description peut être vue comme une moyenne sur un grand nombre de molécules intervenant dans un ensemble de réactions chimiques. Or, compte tenu du fait que des oscillations circadiennes peuvent déjà se produire au niveau de cellules isolées, la question de la validité de tels modèles pour des nombres limités de molécules d'ARNm et de protéines de l'horloge se pose [8]. En particulier, des oscillations circadiennes cohérentes peuvent-elles survenir dans ces conditions ? Cette question peut être abordée à l'aide d'une formulation stochastique du modèle, tenant compte du caractère probabiliste des réactions chimiques.

Nous avons effectué des simulations stochastiques d'un modèle simple pour les rythmes circadiens [9,10]. Ce modèle [3] est fondé sur une seule boucle de rétroaction décrivant la répression du gène *per* par son propre produit, la protéine PER, chez la drosophile (Fig. 1). Le gène *per* est transcrit dans le noyau, l'ARNm quitte le noyau pour se rendre dans le cytosol où il est traduit en protéine Per. Celle-ci est phosphorylée à double reprise. La forme biphosphorylée entre dans le noyau où elle réprime l'expression du gène *per*. Ce modèle, initialement proposé pour les rythmes circadiens chez la drosophile, peut être également appliqué au cas d'autres organismes, comme *Neurospora* [5].

Pour déterminer l'effet du bruit moléculaire sur les oscillations circadiennes, le modèle décrit ci-dessus est tout d'abord décomposé en étapes élémentaires, c'est-à-dire que chaque étape non linéaire — michaélienne ou coopérative — est décomposée selon le schéma réactionnel auquel ces ciné-

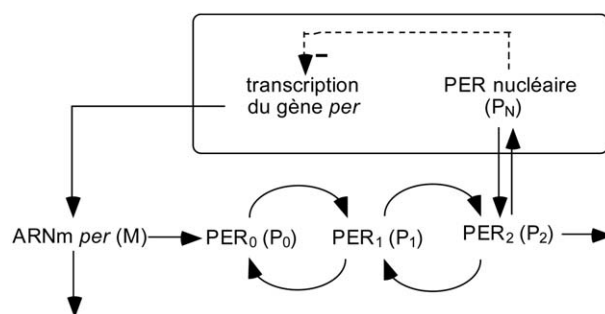


Fig. 1. Modèle pour les rythmes circadiens. Ce modèle incorpore la transcription du gène *per* et le transport de l'ARNm *per* (M) vers le cytosol où il est traduit en protéine PER non phosphorylée (P_0) et dégradé. La forme P_2 de la protéine peut être réversiblement phosphorylée de la forme P_0 en P_1 et de la forme P_1 en P_2 , successivement. La forme P_2 peut être dégradée ou transportée dans le noyau (P_N) où elle exerce une répression coopérative sur l'expression du gène *per*. L'évolution temporelle des 5 variables est décrite par un système de cinq équations différentielles déterministes [3].

tiques correspondent. Chacune de ces étapes élémentaires est caractérisée par la perte et/ou le gain de molécules et par une probabilité liée à la constante cinétique. La simulation numérique de ce schéma réactionnel détaillé peut alors être effectuée grâce à l'algorithme de Gillespie [11]. À chaque pas de temps, une réaction est tirée aléatoirement selon les probabilités associées aux différentes étapes réactionnelles et en fonction de la réaction qui a lieu, les variables sont mises à jour (voir l'appendice de l'article de Gonze et al. [9] pour plus de détails). Notons que dans la formulation stochastique les variables sont exprimées en nombre de molécules et non plus en concentration comme dans la version déterministe. La méthode de Gillespie a notamment été appliquée pour étudier la dynamique de systèmes chimiques [12], biochimiques [13] ou génétiques [14].

Les oscillations circadiennes obtenues par intégration numérique des équations différentielles déterministes ainsi que la projection du cycle limite correspondant à ces oscillations dans l'espace des phases (M, P_0) sont représentés aux Figs. 2A et 2B, respectivement. Les panneaux C-F de la Fig. 2 montrent les oscillations circadiennes et les cycles limites bruités obtenus par simulation stochastique du même modèle. Dans les panneaux D et F, la courbe blanche correspond à la courbe déterministe (en termes de nombres de molécules). Dans les panneaux C et D de la Fig. 2, les nombres de molécules varient de 0 à 200 pour l'ARNm *per* et de 50 à 800 pour la protéine PER cytosolique non phosphorylée. Pour un nombre suffisant de molécules, on retrouve bien les oscillations prédites par le modèle déterministe, malgré les fluctuations induites par le bruit moléculaire. Plus ce nombre de molécules diminue, plus les fluctuations sont marquées. Ce n'est que pour des nombres de molécules très faibles, par exemple de l'ordre d'une trentaine d'ARNm et quelques centaines de protéines au maximum, que les oscillations sont fortement affectées par le bruit moléculaire (Fig. 2E, F). De manière générale, on peut montrer que l'amplitude des fluctuations est inversement proportionnelle à la racine carrée du nombre de molécules impliquées [15].

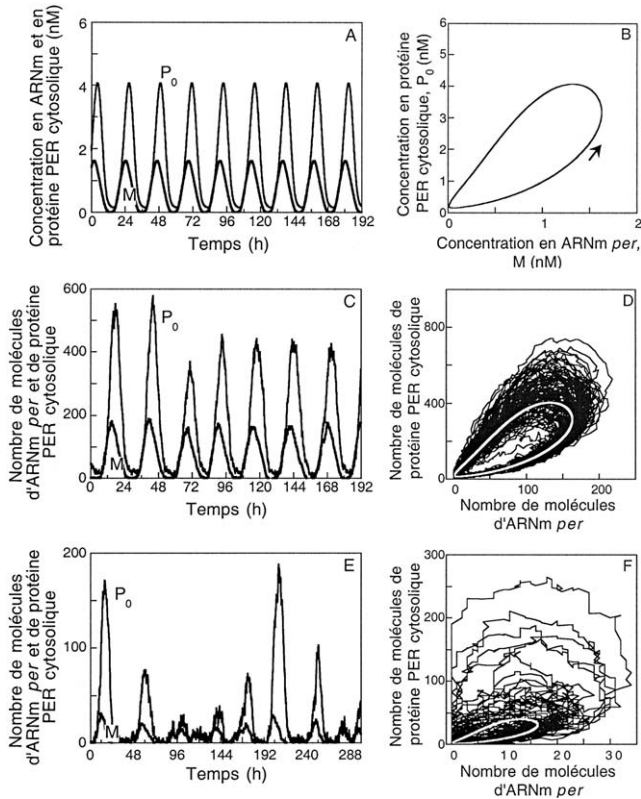


Fig. 2. Comparaison des oscillations circadiennes déterministes et stochastiques. Les oscillations déterministes (A) et le cycle limite correspondant (B) ont été obtenus par intégration numérique des cinq équations différentielles décrivant le modèle déterministe [3]. Les oscillations stochastiques (C et E) et les cycles limites correspondants (D et F) ont été obtenus par simulation stochastique de ce même modèle développé en étapes élémentaires [9,10].

D'autres facteurs ont un effet sur la robustesse des rythmes circadiens: la coopérativité de la répression augmente cette robustesse alors que l'entraînement par un cycle lumière–obscurité — simulé à l'aide d'un forçage périodique de la vitesse de dégradation de la protéine — stabilise la phase des oscillations circadiennes [9]. L'influence de certains paramètres de contrôle, comme les vitesses de transcription du gène *per* ou de dégradation de la protéine PER, a également été testée. En particulier, il a été montré que plus le système est proche d'un point de bifurcation, plus les fluctuations sont marquées [10].

Il existe à ce jour peu de mesures *in vivo* des niveaux d'ARNm et de protéines impliquées dans les rythmes circadiens. Toutefois, dans l'analyse quantitative de Mellow et al. [16], chez *Neurospora*, le nombre maximum de molécules de protéine FRQ nucléaire est estimé à seulement quelques dizaines au cours des oscillations. Plusieurs explications pourraient justifier la robustesse des rythmes circadiens qui est néanmoins observée chez cet organisme. Chez *Neurospora*, les cellules forment un syncytium ; plusieurs noyaux coexistent au sein d'une même cellule. Le couplage entre oscillateurs nucléo-cytoplasmiques au sein d'une même cel-

lule pourrait augmenter la robustesse du rythme circadien. De même, un couplage entre neurones produisant des rythmes circadiens pourrait exister chez des organismes comme la drosophile ou les mammifères [17]. Il est vraisemblable que le couplage entre oscillateurs et l'interaction entre boucles de rétroactions multiples puissent mener à une meilleure cohérence des oscillations.

En conclusion, les simulations stochastiques des modèles pour les rythmes circadiens ont montré que des oscillations robustes étaient obtenues déjà avec des nombres d'ARNm et de protéine de quelques dizaines et centaines, respectivement. De plus, la coopérativité de la répression et le forçage périodique augmentent cette robustesse [9]. Bien que les données expérimentales suggèrent la possibilité d'oscillations avec des nombres de molécules encore plus faibles, il est remarquable qu'un système fondé sur une seule boucle de rétroaction soit déjà capable de produire des oscillations circadiennes robustes à de si faibles niveaux d'ARNm et de protéine régulatrice. Ces observations justifient l'utilisation de modèles déterministes dans l'étude des propriétés dynamiques des rythmes circadiens.

Remerciements

Ce travail a reçu le soutien du Fonds de la Recherche Scientifique Médicale (FRSM, Belgique, Convention n° 3.4607.99). D. G. remercie la Fondation David & Alice Van Buuren pour son soutien financier.

Références

- [1] Dunlap JC. Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 1999;96: 271–90.
- [2] Young MW, Kay SA. Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. *Nature Rev Genetics* 2001;2:702–15.
- [3] Goldbeter A. A model for circadian oscillations in the *Drosophila* period protein (PER). *Proc R Soc Lond B* 1995;261:319–24.
- [4] Leloup JC, Goldbeter A. A model for circadian rhythms in *Drosophila* incorporating the formation of a complex between the PER and TIM proteins. *J Biol Rhythms* 1998;13:70–87.
- [5] Gonze D, Leloup J.-C., Goldbeter A., Theoretical models for circadian rhythms in *Neurospora* and *Drosophila*, *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris III* 2000;323:57–67.
- [6] Ueda HR, Hagiwara M, Kitano H. Robust oscillations within the interlocked feedback model of *Drosophila* circadian rhythm. *J Theor Biol* 2001;210:401–6.
- [7] Smolen P, Baxter DA, Byrne JH. Modeling circadian oscillations with interlocking positive and negative feedback loops. *J Neurosci* 2001; 21:6644–56.
- [8] Barkai N, Leibler S. Circadian clocks limited by noise. *Nature* 2000; 403:267–8.
- [9] Gonze D, Halloy J, Goldbeter A. Robustness of circadian rhythms with respect to molecular noise. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99: 673–8.
- [10] Gonze D, Halloy J, Goldbeter A. Deterministic versus stochastic models for circadian rhythms. *J Biol Phys* 2002;28:637–53.
- [11] Gillespie DT. Exact stochastic simulation of coupled chemical reactions. *J Phys Chem* 1977;81:2340–61.

- [12] Baras F, Pearson JE, Malek Mansour M. Microscopic simulation of chemical oscillations in homogeneous systems. *J Chem Phys* 1990; 93:5747–50.
- [13] McAdams HH, Arkin A. Stochastic mechanisms in gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:814–9.
- [14] Arkin A, Ross J, McAdams HH. Stochastic kinetic analysis of developmental pathway bifurcation in phage λ -infected *Escherichia coli* cells. *Genetics* 1998;149:1633–48.
- [15] Nicolis G, Prigogine I. *Self-Organization in Nonequilibrium Systems, From Dissipative Structures to Order through Fluctuations*. New-York: Wiley; 1977.
- [16] Mellow MW, Garceau NY, Dunlap JC. Dissection of a circadian oscillation into discrete domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94: 3877–82.
- [17] Liu C, Weaver DR, Strogatz SH, Reppert SM. Cellular construction of a circadian clock: period determination in the suprachiasmatic nuclei. *Cell* 1997;91:855–60.