

Expression des gènes de l'horloge circadienne dans les cellules sanguines mononuclées chez des comateux

Circadian clock genes expression in peripheral blood mononuclear cells of comatose patients

Taheni Ben Lazreg^a, Ilhem Ben chaefeddine^b, Moez Gribaa^b, Oualid Naiija^c, Ali Saad^b, Mohamed Dogui^a.

a : Laboratoire de Physiologie et des Explorations Fonctionnelles, Faculté de Médecine, Monastir, Tunisie.

b : Laboratoire de Cytogénétique, de Biologie moléculaire et de la Biologie de la Reproduction Humaine, CHU Farhat Hached, Sousse, Tunisie.

c : Service de Réanimation, CHU Sahloul, Sousse, Tunisie.

RÉSUMÉ

Prérequis : Récemment une dizaine de gènes « gènes de l'horloge biologique circadienne » sont identifiés, cependant peu de choses sont connues quant à la régulation de leur expression. L'évaluation des variations circadiennes de l'expression des gènes de l'horloge chez l'homme semble être d'une importance majeure aussi bien d'un point de vue fondamental que dans une perspective diagnostique et thérapeutique. Dans cette optique, Plusieurs travaux dont le nôtre ont décrit la fluctuation des gènes de l'horloge.

Buts : Décrire l'expression rythmique des gènes de l'horloge biologique chez des patients hospitalisés dans les unités des soins intensifs durant 24h et déterminer l'effet de l'absence du cycle lumière/obscurité sur ces rythmes.

Méthodes : Etude réalisée au service de réanimation CHU Sahloul chez 15 patients (5 comateux et 10 non comateux). Pour l'extraction de l'ARN on a eu recours à l'utilisation des cellules sanguines mononuclées puisque elles suscitent un intérêt particulier car elles sont facilement accessibles.

Résultats : Dans cette étude on note une conservation à un certain degré de l'expression des « gènes de l'horloge » chez les patients comateux et leur altération chez les non comateux.

Conclusion : la perturbation de la fluctuation circadienne de ces gènes pourrait être le résultat de l'effet de la chirurgie sur certains rythmes biologique comme ça pourrait être expliqué par l'absence des synchroniseurs essentiellement l'absence du cycle jour/nuit.

Mots-clés

Rythme circadien ; Gènes horloge; Coma ; Mélatonine ; Cellules sanguines mononuclées ; unités des soins intensifs

SUMMARY

Background: Recently circadian clock genes have been identified in humans but information regarding their expression has remained very limited. The evaluation of circadian variations in the expression of clock genes in humans seems to be a major importance both from a fundamental point of view as a diagnostic and therapeutic perspective. In this context, several works including ours have described the fluctuation of clock genes.

Aims: describing rhythmic expression of clock genes in intensive care units patients during 24h and we tried to determine the effect of the absence of synchronizers such as light/ dark cycle on these rhythms.

Methods: 15 patients received care in private room in intensive care units in the hospital Sahloul (5 comatous and 10 non comatous patients). For RNA isolation we used peripheral blood mononuclear cells which represent an ideal material to investigate non-invasively the human clock at the molecular level.

Results: In the present study, we noticed that clock genes mRNA exhibit a circadian expression in comatose patients, while the rhythmicity of some studied genes disappeared in non-comatose patients.

Conclusion: The disturbance of the rhythmic fluctuation of the clock genes could be the result of the effect of surgery on some biological rhythms as it could be explained by the lack of synchronizers in intensive care units such as light/dark cycle.

Key- words

Circadian rhythm; Clock genes; Coma; Melatonin; Peripheral blood mononuclear cells; Intensive care units

Tous les organismes ont évolué en réponse aux conditions rythmiques de l'environnement. De nombreuses activités physiologiques présentent une rythmicité de 24 heures (secrétions hormonales, performances cognitives, activité motrice, structure du sommeil, ...). Elles sont pour la plupart sous le contrôle de l'horloge circadienne qui se situe dans les noyaux suprachiasmatiques (NSC) de l'hypothalamus [1,2]. Chez le mammifère les rythmes circadiens ne sont pas produits par les cycles extérieurs du jour-nuit, et de veille-sommeil ils sont synchronisés par ces derniers via un processus d'entraînement [3,4]. Grâce à ce mécanisme, les indicateurs temporels de l'environnement (surtout le cycle lumière obscurité, mais aussi d'autres indicateurs, comme l'heure des repas) relie étroitement nos horloges circadiennes à l'environnement local de 24 heures. La lumière semble être le synchroniseur le plus puissant de l'horloge circadienne humaine, et le moment de l'exposition à la lumière durant la journée est responsable de l'entraînement de l'horloge circadienne [5,6].

La rythmicité circadienne est endogène en effet, elle repose sur l'expression rythmique de gènes horloges et resynchronisée quotidiennement par la lumière (cycle jour/nuit) [5,7].

Chez l'homme, l'expression du gène « Clock », le seul gène du rythme circadien cloné, est ubiquitaire.

Plusieurs boucles d'autorégulation négatives transcriptionnelles et traductionnelles impliquées dans la genèse des rythmes. Les protéines BMAL1 et CLOCK forment un hétérodimère qui active la transcription des gènes horloges Per, Cry. Lorsque les protéines PER et CRY s'accumulent jusqu'à un niveau critique, elles forment un complexe avec le dimère BMAL1-CLOCK et inhibent alors leur propre transcription. Il existe une autre boucle de régulation dans laquelle la protéine REV-ERB inhibe et la protéine ROR γ active la transcription de Bmal1. Les dernières données suggèrent que la protéine SIRT1 se lie au complexe CLOCK-BMAL1 et active la déacétylation et dégradation de PER2 [8].

Chez les mammifères, ces différents oscillateurs moléculaires se trouvent aussi bien au niveau de la plupart des organes périphériques (d'où la notion d'horloge périphérique), qu'au niveau des noyaux suprachiasmatiques [9].

Récemment plusieurs études se sont intéressées à l'expression des gènes « horloge » vu leur importance physiologique suggérée par l'identification de mutations associées avec plusieurs syndromes. L'objectif de la présente étude est de décrire l'expression rythmique des gènes de l'horloge biologique chez des patients hospitalisés dans les unités des soins intensifs durant 24h et de déterminer l'effet de l'absence du cycle lumière/obscurité sur ces rythmes.

PATIENTS ET MÉTHODES

Les sujets de notre étude sont des patients recrutés du service de réanimation de l'Hôpital Universitaire Sahloul. L'étude porte sur 15 sujets masculins dont 5 sont des sujets comateux exposés en continu à la lumière. Les étiologies du coma sont établies en fonction du recrutement (traumatique, vasculaire et métabolique, toxique ou autre). L'âge de ces patients est de 31 ans.

10 autres sujets hospitalisés en réanimation exposés en continu à la lumière mais ne sont pas comateux, ils présentent des troubles cardiaques, respiratoires ou neurologiques. Ce deuxième groupe

constitue le groupe control, leur âge est de 35.5 ans

Les caractéristiques cliniques des patients sont déterminées par des fiches de renseignements : Age, Cause du coma, médicaments prescrits, durée de l'hospitalisation.

Un consentement a été obtenu à partir des familles des patients comateux et de tous les patients non-comateux inclus dans l'étude. Nous avons également obtenu l'approbation du comité d'éthique pour la réalisation de cette étude qui a été réalisée en respectant les normes éthiques [10].

Pour déterminer le rythme de sécrétion de la mélatonine 6 prélèvements sanguins sont effectués aux horaires suivants: 20h, 24h, 04h, 12h, 16h. Au cours de chaque prélèvement 5 ml du sang veineux sont recueillis dans des tubes sur EDTA, ils sont centrifugés immédiatement pendant 10 minutes à 1500 tours/mn.

Les échantillons sériques récupérés dans des tubes à hémolyse sont aliquotés, afin d'éviter les congélations et décongélations successives, puis ils sont conservés à -20°C jusqu'au moment du dosage hormonal. Le dosage de la mélatonine a été réalisé par une méthode radio immunologique, c'est une méthode d'analyse combinant la sensibilité des mesures radioactives et la spécificité de la réaction antigène-anticorps (Melatonin Ravault, INRA, Tours, France).

2ml de sang veineux sont prélevés aux mêmes horaires que ceux pour les dosages hormonaux, afin d'effectuer l'étude génétique en utilisant les cellules sanguines mononuclées périphériques. L'ARN total de 15 patients pour chaque horaire est extrait avec le Trizol selon le protocole du fournisseur (Invitrogen). L'extraction d'ARN est réalisée sur un prélèvement sanguin dans un tube hépariné. Une fois extrait l'ARN est conservé à -20°C ou à -80°C pour utilisation ultérieure.

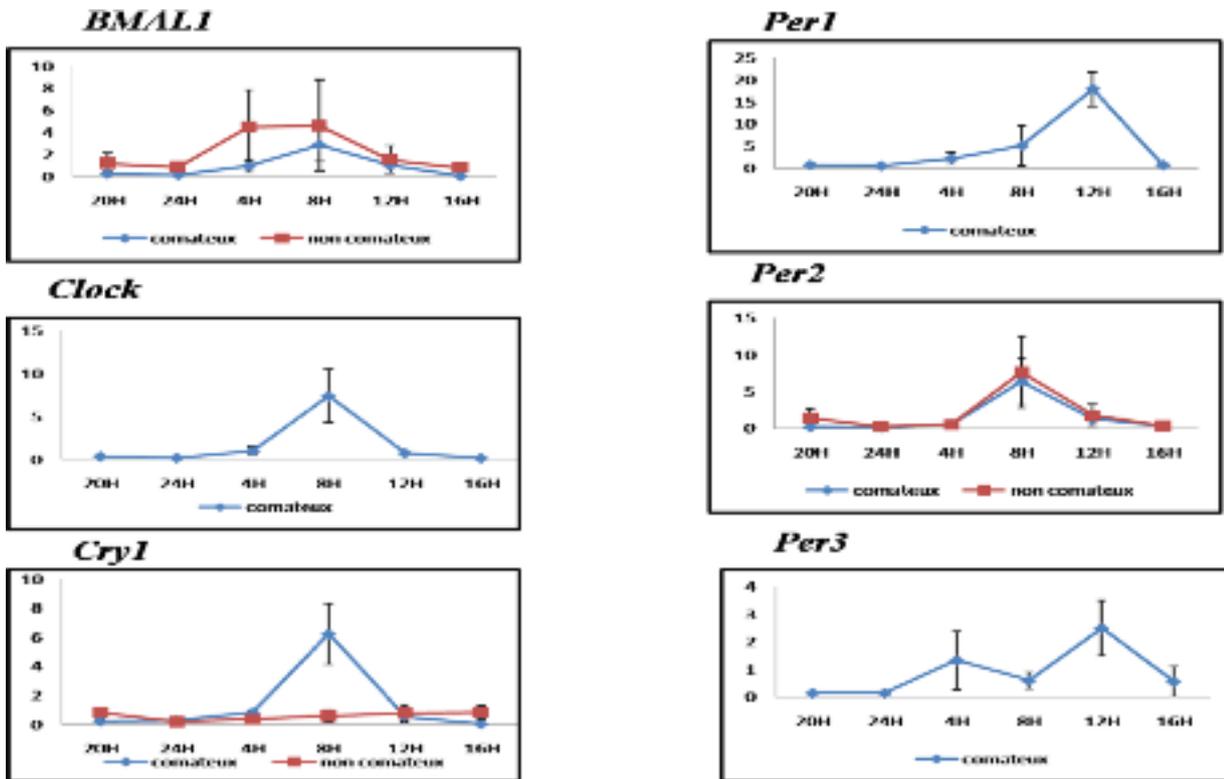
La pureté d'ARN est estimée par un rapport des densités optiques 260/280 nm. Un ARN est considéré pur si le rapport calculé est compris entre 1,8 et 2,0.

La transcription réverse (RT) est réalisée dans un volume de 20 μ l, en présence d'ARN (0,1 μ g), 200 U de transcriptase réverse (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase M-MLV RT, invitrogen), 40 U d'inhibiteur de ribonucléase, 2 μ l 0.1mM de désoxy nucléotides triphosphates (DTT) et 1 μ l d'oligo(dT)15, 4 μ l buffer, 10 mM dNTP. Après l'addition d'ARN, et de l'eau sans nucléase, le mélange réactionnel est incubé à 65°C pendant 5 minutes pour dénaturer l'ARNm.

L'ADNc est synthétisé à 37°C pendant 50 minutes. La transcription réverse est stoppée en chauffant les échantillons à 70°C pendant 15 minutes. Le produit peut être conservé à -20°C.

L'amplification spécifique de chaque ARN a été réalisée en double par PCR dans 25 ml du mélange réactionnel contenant l'ADN contenant la séquence à amplifier (1 μ l) les deux amorces oligonucléotidiques monobrans complémentaires chacune d'une des extrémités du fragment à amplifier (0,15pmol/l), des désoxy nucléotides libres dATP, dCTP, dGTP, dTTP qui sont incorporables pour former le brin d'ADN néosynthétisé. L'enzyme permettant la synthèse d'un néobrin à partir des amorces ; il s'agit d'une ADN polymérase thermostable, la Taq DNA polymerase (10U), du MgCl₂ et une solution donnant au milieu réactionnel un PH et une concentration saline optimale pour le fonctionnement de l'enzyme (1,5Mm). La PCR commence avec une dénaturation à 94°C pendant 5 minutes, puis 30 cycles programmés de la manière suivante : 30 secondes à 94°C (dénaturation), 1 minute à 55°C (hybridation) et 90 secondes à 72°C (synthèse) suivies par une

Figure 2 : Expression relative des gènes « horloges » dans les cellules sanguines mononucléés chez les sujets hospitalisés en réanimations



L'analyse statistique des concentrations plasmatiques moyennes de la mélatonine n'a révélée aucune différence significative entre les deux groupes.

Dans la présente étude on a montré que les gènes « Per » montrent une expression circadienne bien conservé chez les patients comateux, cependant cette expression est altérés chez les sujets non comateux « sujets contrôles » (seul le gène Per2 présentent une expression circadienne).

Les acrophases des différents gènes sont localisés durant la phase diurne aussi bien chez les comateux que les non comateux.

Chez les patients comateux le gène hbm1 est exprimé selon un rythme circadien avec un pic localisé durant la phase diurne.

Il en est de même chez les patients non comateux le taux d'expression du gène hbm1 est assez élevé le matin.

Les patients comateux présentent une expression circadienne du gène hclock avec une acrophase tôt le matin. Cependant pour le groupe control aucune expression circadienne n'a été notée pour ce gène.

Le rythme d'expression du gène hCry1 est circadien aussi bien chez les comateux que chez les groupe contrôle.

L'expression de ce gène est maximale le matin chez les comateux, cependant elle survient tardivement chez les non comateux durant l'après midi.

DISCUSSION

Au cours de notre étude menée chez des patients hospitalisés en unité des soins intensifs on a pu noter une conservation de la rythmicité circadienne de la mélatonine chez les deux groupes étudiés avec des pics survenant durant la phase nocturne. Cependant, les concentrations de la mélatonine sont plus élevés que ceux notés chez des sujets sains [11, 12, 13].

Cette conservation montre bien que le coma et l'absence des synchroniseurs n'altèrent pas ce rythme. Ceci n'est pas en accord avec ce qui a été notée dans la littérature. En effet Shilo et ses collaborateurs sont les premiers qui ont étudiés le rythme de l'excrétion du métabolite de la mélatonine (6-sulfatoxymélatonine) chez des patients en unité des soins intensifs. Notant ainsi une altération de ce rythme [14].

En 2002 Mundilger et al., ont montrés une altération du rythme du 6-sulfatoxymélatonine chez 16 patients parmi 17 présentant des « septicémie ». Cette altération n'est pas notée chez 6 patients parmi 7 ne présentant pas des septicémies et chez 18 parmi 23 sujet control [15]. Chez l'homme la première étude s'intéressant à l'expression des gènes horloge a été réalisée par Bjarnason et al. A partir des biopsies de peaux et de la muqueuse orale chez des sujets sains. Cette étude a révélée par RT-PCR semi quantitative, une expression rythmique des gènes « per1 » et « Bmal1 » avec des pics notés le matin et le soir respectivement [16]. Pour une meilleure étude de l'expression des

gènes de l'horloge, en évitant les biopsies une approche non invasive faisant intervenir les cellules sanguines mononucléées a été utilisée par plusieurs équipes.

Une étude menée par Takata et al. En 2002 chez des sujets sains a permis de montrer une importante hétérogénéité d'expression parmi les sujets étudiés avec une expression plus élevée du gène « Per2 » durant le matin que le soir [17].

En 2003, une autre équipe [18] a utilisé un protocole de routine constante chez trois sujets sains, ils ont évalués l'expression des gènes per1, per2, per3 et Dec1 par RT PCR en temps réel, ils ont montré une hétérogénéité du profil de l'expression de ces gènes. En effet, ils ont montré que les pics d'expression des gènes Per(s) varient de six heures selon les sujets tandis que le pic d'expression de Dec1 varie de neuf heures selon les sujets. En 2005, Teboul et ses collaborateurs ont décrit une expression rythmique des gènes horloges au niveau des cellules sanguines mononucléées [19]. Leurs résultats suggèrent que l'expression du gène Per2 et du gène Bmal1 est très variable selon les individus.

Au vu de ces travaux, nous avons entrepris d'évaluer l'expression de six gènes de l'horloge, PER1,2,3 ; Clock ; BMAL1 et Cry1 toutes les quatre heures chez dix sujets recrutés du service de réanimation de l'hôpital universitaire Sahloul Sousse- TUNISIE.

Nos sujets sont classés en deux groupes : un premier groupe de sujets comateux, un deuxième groupe de sujets non comateux apparié en âge et en sexe au premier groupe.

Au cours de notre étude on a pu déterminer une conservation de l'expression de Per1, Per2 et Per3 chez les sujets comateux. Les acrophases de ces rythmes sont notées durant le matin.

Ceci suggère donc que le coma n'affecte pas l'expression des gènes «Per» et donc ils ne sont pas contrôlés par l'oscillation centrale au niveau des NSC mais par d'autres systèmes périphériques.

A l'opposé l'expression des « Per gènes » est altérée chez les sujets non comateux (sujets opérés, hospitalisés en unités des soins intensifs) et ceci pourrait être expliqué par l'effet des glucocorticoïdes sur l'expression de ces gènes. En effet, Balsbore et al. ont montrés dans leur étude que les hormones glucocorticoïdes pourraient induire l'expression de Per1 et Per2 in vitro comme elles peuvent entraîner un

déphasage de l'expression des clock gènes et des gènes contrôlés par l'horloge au niveau des tissus périphériques [20].

De plus l'altération du rythme lumière-obscurité ainsi que l'absence des synchroniseurs tel que l'activité sociale pour les sujets non comateux pourraient être à l'origine de la perturbation du profil circadien du gène Per1 et Per3. D'autres facteurs à effet inducteur des Clock gènes peuvent être ajoutés, Akiyama et al., ont montré que les tranquillisants pourraient affecter l'expression des clock gènes chez les rongeurs [21], d'autres agents de stress d'origine physique ou bien inflammatoire pourrait aussi induire l'expression des «Per» au niveau des noyaux paraventriculaires des souris.

En examinant le profil circadien du gène «Cry1» dans notre étude, on a pu noter qu'il présente un profil normal d'expression aussi bien chez les patients comateux que les non comateux avec un décalage de l'acrophase de l'après midi au matin chez le groupe contrôle.

On a pu montrer aussi une fluctuation circadienne de l'expression des gènes «CLOCK» et « BMAL1» chez nos deux groupes étudiés avec des pics survenant durant le jour et la nuit respectivement. Ceci confirme bien ce qui a été publié par 2 équipes Boivin et ses collaborateurs ainsi que Kusanagi et ses collaborateurs dans leurs études menées chez des sujets sains [18, 22]. A l'opposé Takata et ses collaborateurs ont montré que les « clock gènes » sont arythmiques dans leur étude menée chez des sujets sains selon deux prélèvements effectués avec deux points expérimentaux seulement durant 24 heures (à 9:00h et à 21:00h) [17]. Cependant Takimoto et al ont détecté une rythmicité circadienne des gènes «CLOCK» et « BMAL1» avec des pic durant la nuit, de ce fait l'expression et l'interprétation du profil circadien de ce deux gènes constituent un point d'interrogation pour les chercheurs [23].

Les résultats de notre étude montrent donc une conservation à un certain degré de l'expression des « clock gènes » chez les patients comateux et leur altération chez les non comateux. Cette perturbation pourrait être le résultat de l'effet de la chirurgie sur certains rythmes biologique ainsi que ça pourrait être expliqué par l'absence des agents synchroniseurs (essentiellement l'absence du rythme lumière-obscurité et les facteurs socio-économiques) dans les unités des soins intensifs.

References

1. Dunlap JC, Loros JJ, De Coursey PJ. Chronobiology: biological timekeeping. In: Sunderland, MA eds. Sinauer, 2004: 238
2. Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 2002; 418: 935.
3. Miles LE, Raynal DM, Wilson MA. Blind man living in normal society has circadian rhythms of 24.9 h. *Science* 1977; 198: 421-423.
4. Moore RY, Eichler VB. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res* 1972; 42: 201.
5. Gronfier C. Physiologie de l'horloge circadienne endogène : des gènes horloges aux applications cliniques. *Médecine du sommeil* 2009; 6: 3-11.
6. Dardente H, Cermakian N. Molecular circadian rhythms in central and peripheral clocks in mammals. *Chronobiol Int* 2007; 24:195—213.
7. Okamura H, Yamaguchi S, Yagita K. Molecular machinery of the circadian clock in mammals. *Cell Tissue Res* 2002; 309: 47-56.
8. Asher G, Gattfield D, Stratmann M, et al. SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation. *Cell* 2008; 134: 317—28.
9. Hastings MH, Reddy AB, Maywood ES. A clockwork web: circadian timing in brain in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4: 649—61.
10. Touitou Y, Portaluppi F, Smolensky MH, Rensing L. Ethical principles and standards for the conduct of human and animal biological rhythm research. *Chronobiol Int* 2004; 21:161—170.
11. Arendet J. Melatonin. *Clin Endocrinol* 1988; 29: 205-229.
12. Arendet J, Skene DJ, Middleton B, Lockley SW, Deacon S. Efficacy of melatonin treatment in jet lag, shift work and blindness. *J Biol Rhythms* 1997; 12: 604-617.
13. Touitou T. Melatonin: what for? *Bull Acad Natl Med* 2005; 189: 879-889.
14. Shilo L, Dagan Y, Smorjick Y, Weinberg U, Dolev S, Komptel B, Balaum H, Shenkman L. Patients in the intensive care unit suffer from severe lack of sleep associated with loss of normal melatonin secretion pattern. *Am J Med Sci* 1999; 317: 278-281.
15. Mundtler G, Delle-Karth G, Koreny M, Zehetgruber M, Steindl-Munda P, Markt W, Ferti L, Siostrzonek P. Impaired circadian rhythm of melatonin secretion in sedated critically ill patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 2002; 30: 536-540.

16. Bjarnason GA, Jordan RC, Wood PA, Li Q, Lincoln DW, Sothorn RB, Hrushesky WJ, Ben-David Y. Circadian expression of clock genes in human oral mucosa and skin: association with specific cell-cycle phases. *Am J Pathol* 2001; 158: 1793–1801.
17. Takata M, Burioka N, Ohdo S, Takane H, Terazono H, Miyata M, Sako T, Suyama H, Fukuoka Y, Tomita K., et al. Daily expression of mRNAs for the mammalian Clock genes *Per2* and *clock* in mouse suprachiasmatic nuclei and liver and human peripheral blood mononuclear cells. *Jpn J Pharmacol* 2002; 90: 263–269.
18. Boivin BD, James FO, Wu A, Cho-Park PF, Xiong H, Sun ZS. Circadian clock genes oscillate in human peripheral blood mononuclear cells. *Blood* 2003; 102: 4143–5.
19. Teboul M, Barrat-Petit MA, Li XM, Claustrat B, Formento JL, Delaunay F, et al. Atypical patterns of circadian clock gene expression in human peripheral blood mononuclear cells. *J Mol Med* 2005; 83: 693–9.
20. Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, Schutz G, Schibler U. Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* 2000; 289: 2344–2347.
21. Akiyama M, Kirihara T, Takahashi S, Minami Y, Yoshinobu Y, Moriya T, Shibata S. Modulation of *mPer1* gene expression by anxiolytic drugs in mouse cerebellum. *Brit J Pharmacol* 1999; 128: 1616–1622.
22. Kusanagi H, Mishima K, Satoh K, Echizenya M, Katoh T, Shimizu T. Similar profiles in human *period1* gene expression in peripheral mononuclear and polymorphonuclear cells. *Neurosci Lett* 2004; 22: 124–127.
23. Takimoto M, Hamada A, Tomoda A, Ohdo S, Ohmura T, Sakato H, Kawatani J, Jodoi T, Nakagawa H, Terazono H., et al. Daily expression of clock genes in whole blood cells in healthy subjects and a patient with circadian rhythm sleep disorder. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 289: R1273–R1279.