

UNIVERSITÉ PARIS XI
FACULTÉ DE MÉDECINE PARIS-SUD

Année universitaire 2010-2011

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS XI

Champ disciplinaire : Neurosciences

Ecole Doctorale de rattachement :

Signalisations et Réseaux Intégratifs en Biologie

Présentée et soutenue publiquement par

Alexandre DOGNON

Le 16 Mars 2011

**Contrôle de la stabilité de TIMELESS par un complexe ubiquitine
ligase de type Culline-3 dans l'horloge circadienne de
*Drosophila melanogaster***

Directeur de thèse : Brigitte GRIMA

JURY

Pr. Léonard RABINOW
Dr. Jacques MONTAGNE
Dr. Lionel PINTARD
Dr. Anne PLESSIS
Dr. François ROUYER
Dr. Brigitte GRIMA

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

Remerciements

SOMMAIRE

SOMMAIRE	4
LISTE DES ABREVIATIONS PRINCIPALES.....	7
INTRODUCTION	10
I – Généralités	10
A – Identification des rythmes circadiens	11
B – Le modèle de la drosophile	13
1 – L’activité locomotrice	13
2 – Découverte des gènes d’horloge	15
II - Bases moléculaires des rythmes circadiens	16
A – L’horloge moléculaire chez <i>Drosophila melanogaster</i>	16
1 – Deux boucles moléculaires interconnectées	16
2 – Régulations post-traductionnelles de PER et TIM	18
B – L’horloge moléculaire chez les mammifères	21
1 – Les boucles de régulation négative	21
2 – Les modifications post-traductionnelles	22
III – Voie ubiquitine protéasome	24
A - Le protéasome	25
B – Les E3 ubiquitine ligases.....	26
1 – Les U-box	26
2 – RING ubiquitine ligases.....	26
2-1 – Les complexes Cul-1 et Cul-3.....	27
2-2 – Neddylation et Déneddylation	28
3 - Les ubiquitines ligases à domaine HECT.....	30
C – Horloge et protéasome	31
1 – Dégradation circadienne de PER et TIM	31
2 – La dégradation de TIM par la lumière	32
2-1 - Cryptochrome	32
2-2 - Signalosome	34

IV – Bases anatomiques des rythmes circadiens.....	35
A – Horloge centrale et horloges périphériques	35
B - L'horloge adulte chez <i>Drosophila melanogaster</i>	36
1 – Les différents groupes de neurones	36
1-1 - Les neurones latéraux ventraux (LNV)	37
1-2 - Les neurones latéraux dorsaux (LND).....	38
1-3 - Les neurones dorsaux (DN)	38
1-4 - Les neurones latéraux postérieurs (LPN)	38
2 - Fonction des différents groupes de neurones	39
2-1 – LNV et PDF	39
2-2 – Oscillateur du matin et oscillateur du soir	41
2-3 - Perception et entrainement par la lumière	43
C – L'horloge larvaire chez <i>Drosophila melanogaster</i>	45
D – Le Noyau Suprachiasmatique (NSC) des mammifères.....	47
V – Comparaison horloge et autres systèmes.....	49
A – Voie de signalisation Wnt/Wingless.....	49
B – Voie de signalisation Hedgehog	51
VI – Objectif de la thèse	55
 RESULTATS.....	 57
I - SOUCHES DE DROSOPHILES UTILISEES.....	57
II – ARTICLE.....	58
III – RESULTATS SUPPLEMENTAIRES.....	97
A – Rôle de la <i>cullin-3</i> dans l'horloge larvaire	97
B – Implication de la <i>cullin-3</i> dans la régulation de l'horloge par la lumière	100
C – Recherche de la(les) protéine(s) à domaine BTB impliquée(s) dans l'horloge	103
1 – Crible RNAi des protéines à domaine BTB de drosophile.....	103
2 – Etude du gène <i>kelch</i>	105
3 – Etude du gène <i>lola</i>	106
4 – Etude du gène CG3571	108

DISCUSSION	113
1 – La Culline-3 est impliquée dans la régulation de l’horloge	113
2 – Régulation circadienne de TIM par Cul-3	114
3 – Cul-3 reconnaît les formes hypophosphorylées de TIM.....	115
4 – Nouveau contrôle de TIM à la lumière ?	115
5 – La place de Cul-3 dans l’horloge	116
6 – Perspectives.....	119
 ANNEXE 1 : LE SYSTEME UAS-GAL4	 123
ANNEXE 2 : La technique d’interférence ARN (RNAi).....	124
BIBLIOGRAPHIE.....	126

LISTE DES ABREVIATIONS PRINCIPALES

bHLH : domaine basique-hélice-boucle-hélice

BMAL1 : Brain and Muscle Arnt-Like protein 1

BTB : Bric a brac, Tramtrack, Broadcomplex (domaine protéique)

β -TrCP : β Transducin Repeat Containing Protein

Ci : Cubitus interruptus

CLK : clock

CT : Circadian Time

CKI, CK2 : Casein Kinase 1 et 2

CRY : Cryptochrome

Cul : Culline

CYC : Cycle

DBT : Doubletime

DD : Dark-Dark

DN : Neurones Dorsaux

Dsh : Dishevelled

EMS : Ethyl Methanesulfonate

GSK3 β : Glycogen Synthase kinase 3 β

HECT : Homologous to E6-AP Carboxyl Terminus

Hh : Hedgehog

Jet : Jetlag

LD : Light-Dark

LL : Light-Light

LN : Neurones Latéraux

LNd : Neurones Latéraux dorsaux

s-LNv et l-LNv : petits (small) et gros (large) Neurones Latéraux ventraux

Lola : longitudinals lacking

NEDD8 : Neural precursor cell Expressed Developmentally Down-regulated protein 8

NorpA : No receptor potential A

NSC : Noyau SupraChiasmatique

PAS : Per-Arnt-Sim, Period-Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-Single minded
(domaine protéique)

Ptc : Patched

PDF : Pigment Dispersing Factor

PDP1 ϵ : PAR-domain protein 1 ϵ

PER : period

POT : Posterior Optic Tract

PP1 et PP2A : Protein Phosphatase 1 et 2A

Rdx : Roadkill

RING : Really Interesting New Gene

RNAi : ARN interférant

SCF : Skp1, Cullin-1, F-Box protein

SGG : Shaggy

Slmb : Supernumerary limbs

TIM : Timeless

VRI : Vrille

ZT : *Zeitgeber* Time

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I – Généralités

Tous les organismes doivent s'adapter à l'environnement pour survivre. Cette adaptation doit donc prendre en compte les changements environnementaux tels que la lumière (la photopériode) ou bien la température. Ces changements sont quotidiens et évoluent toute l'année, selon les saisons. Pour anticiper ces changements et ainsi s'y adapter, la plupart des organismes ont développé une horloge interne. Cette horloge est dite circadienne (circa=autour, dies=jour) lorsque la période de cette horloge est proche de 24 heures.

Les rôles de l'horloge sont multiples. Ils permettent d'anticiper les variations de l'environnement et préparent donc l'organisme pour s'y adapter. Elle permet également de donner la mesure du temps à ces différents organismes, même en absence de stimuli extérieurs tels que la lumière. Il existe une horloge dans tous les organes. Chez les mammifères, l'horloge cérébrale est considérée comme l'horloge centrale car elle est la seule à recevoir les informations lumineuses. Communément, on parle donc d'horloge centrale pour les horloges cérébrales de tous les organismes. Les organes autres que le cerveau contiennent une horloge dite périphérique. L'horloge centrale permet de donner toutes ces informations aux différentes parties de l'organisme et plus précisément à ces horloges périphériques.

Le contrôle de l'activité veille-sommeil, ou activité-repos, est un phénomène lié à cette horloge qui est facilement observable chez les mammifères et les insectes. Le rôle de cette horloge chez l'homme peut être facilement observé en cas de décalage horaire. En effet, lorsque nous voyageons et que nous subissons un décalage horaire, notre corps se retrouve désynchronisé par rapport aux conditions extérieures. L'horloge n'est plus en phase avec le milieu extérieur et il faudra plusieurs jours avant d'être de nouveau en phase avec le pays de destination, et ainsi favoriser une activité pendant la journée et un repos pendant la nuit. Cependant, ce contrôle n'est pas le seul. En effet, cette horloge permet de contrôler de nombreux phénomènes physiologiques tels que la sécrétion d'hormones, l'ouverture des feuilles chez les plantes ou la synthèse de mélatonine chez les mammifères.

A – Identification des rythmes circadiens

La première expérience mettant en évidence l'existence d'une horloge biologique remonte au XVIII^{ème} siècle. En 1729, l'astronome Jean-Jacques d'Ortous de Mairan observe les mouvements journaliers de l'ouverture des feuilles de mimosa (Fig. 1). Ces feuilles s'ouvrent la journée et se ferment la nuit. Il se rend compte que ces mouvements persistent en condition d'obscurité constante. C'est la première évidence d'une horloge interne autonome.

En 1751, le naturaliste Carl Von Linné étend son observation à plusieurs espèces de fleurs. Il se rend compte d'une variation d'une espèce à l'autre et il va développer une horloge florale représentant ces observations (Fig. 1).

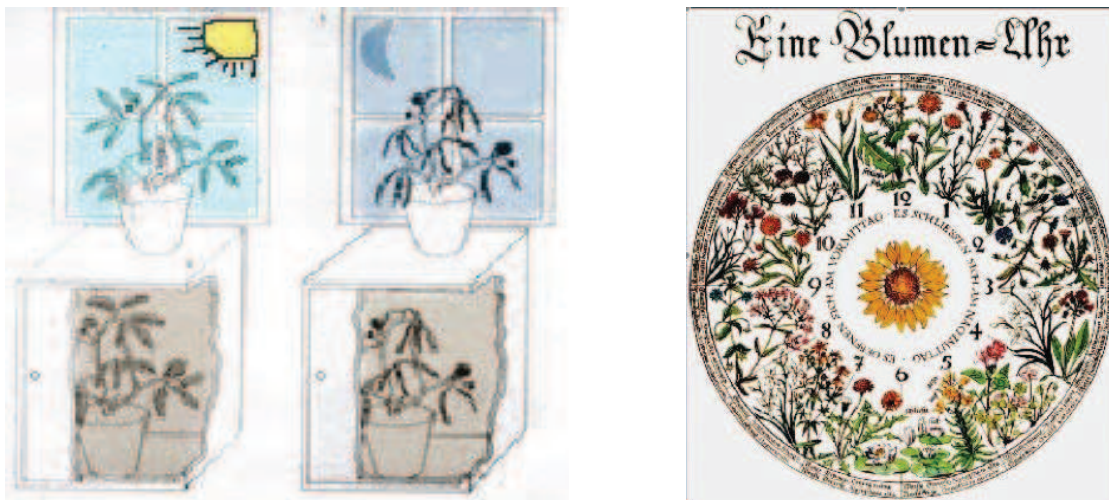


Figure 1 : Expériences d'Ortous de Mairan sur l'ouverture des feuilles de mimosa (gauche) et l'horloge florale de Carl Von Linné (droite)

En 1758, Henri-Louis Duhamel de Monceau répète les expériences de De Mairan en s'assurant bien d'être dans des conditions d'obscurité constante parfaites. Il confirme les résultats obtenus par De Mairan. Il s'assure même d'exclure l'influence de la température en empêchant ses variations quotidiennes par l'utilisation de serres chauffées de manière

constante. L'importance de la température dans la synchronisation de l'horloge ne sera découverte que bien plus tard.

En 1832, Augustin-Pyramus de Candolle met en évidence l'effet de la lumière sur la période et la synchronisation de l'horloge. En effet, en éclairant les mimosas jour et nuit, il observe toujours les rythmes foliaires mais la période est raccourcie d'une heure et demie à deux heures. D'autre part, il décide également d'éclairer les plantes la nuit et de les mettre en obscurité la journée. Il constate qu'au bout de quelques jours, les rythmes se retrouvent en antiphasse par rapport aux cycles terrestres.

En 1915, le botaniste Wilhelm Pfeffer montre que les périodes proches de 24 heures observées ne sont que le reflet des cycles terrestres. En effet, en raccourcissant la période à 8 heures de jour et 8 heures de nuit, les plantes se phasent sur ce nouveau rythme. Ce sont donc les conditions extérieures qui synchronisent ce système et notamment grâce à la photopériode. De plus, il observe qu'en conditions constantes d'éclairement, chaque espèce de plante possède une période propre et que celle-ci diffère de 24 heures. L'existence d'une période endogène propre à chaque espèce semble donc exister.

Le terme circadien n'apparaît qu'en 1959 avec Franz Halberg. Ce terme permet de désigner une période proche de 24 heures et ainsi éviter les ambiguïtés du terme « diurnal » désignant à la fois des périodes de 12 heures et 24 heures. Ses travaux avec Jürgen Aschoff définissent le fait que l'horloge n'a pas besoin d'avoir une période de 24 heures mais plutôt de stimuli extérieurs pour remettre cette horloge à l'heure et rectifier les périodes endogènes. On parle alors de *zeitgebers* ou donneurs de temps.

Ce sont les travaux de Pittendrigh en 1954 qui ont permis d'établir l'existence d'une véritable horloge endogène. Ses travaux chez la drosophile ont montré que l'horloge contrôlait les rythmes d'éclosion des adultes sur une période d'environ 24 heures en conditions d'obscurité constante, que cette période pouvait être décalée par un pulse de lumière et que de faibles variations de température ne modifiaient pas cette période (compensation de température). Il permet ainsi de poser les bases de fonctionnement de l'horloge circadienne avec des donneurs de temps (lumière, température...), une horloge endogène et des mécanismes de sorties (activité locomotrice, éclosion...) (Fig. 2).

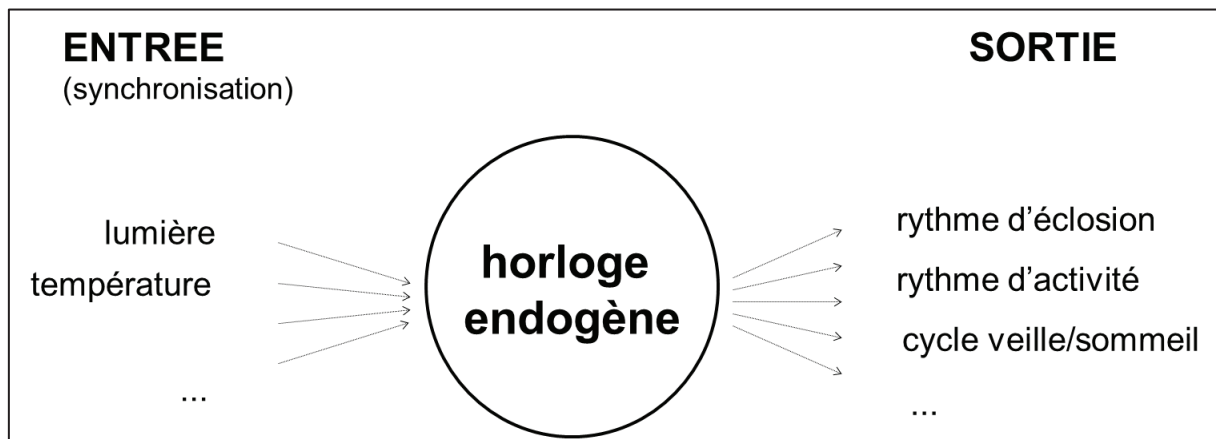


Figure 2 : Bases fonctionnelles d'une horloge circadienne

L'horloge circadienne est synchronisée par différents stimuli extérieurs (entrées) et régule divers mécanismes (sorties)

B – Le modèle de la drosophile

1 – L'activité locomotrice

La manière la plus simple d'étudier l'horloge circadienne chez la drosophile est l'étude de son comportement. Pour étudier ce comportement, on peut analyser ses rythmes d'éclosion ou bien son activité locomotrice. L'activité locomotrice reflète ses rythmes activité-repos au cours de la journée et sont donc contrôlés par l'horloge circadienne. Afin de refléter le plus simplement les conditions extérieures, les conditions d'élevage et expérimentales des drosophiles sont des cycles de 12 heures de lumière et de 12 heures d'obscurité : LD(12-12). Dans ces conditions LD, les temps sont nommés zeitgeber time (ZT) où ZT0 et ZT12 correspondent respectivement à l'allumage et à l'extinction de la lumière. Pour mesurer la période endogène de l'horloge, les mouches seront placées en conditions d'obscurité constante (DD) où les temps seront nommés circadian time (CT).

En conditions LD, les mouches ont une activité bimodale. Elles sont principalement actives au moment des transitions jour-nuit et sont peu actives entre ces transitions. Il faut préciser qu'elles réagissent fortement à l'allumage et à l'extinction de la lumière et cette forte activité masque l'activité due à l'horloge interne. Le rôle principal, connu à ce jour, de l'horloge dans l'activité de la drosophile est l'anticipation des transitions jour-nuit. Ceci se reflète par une augmentation progressive de l'activité avant ces transitions. Il est à noter

qu'une horloge fonctionnelle permet de recaler le comportement à ce modèle même après un décalage de phase (un décalage horaire par exemple). En conditions d'obscurité constante (DD), les deux pics d'activité fusionnent en un seul pic centré en fin de jour subjectif. C'est dans ces conditions que l'on peut mesurer la période endogène des mouches. La période des mouches sauvages va ainsi varier en fonction des différents fonds génétiques des souches utilisées : entre 23h30 et 24h30 pour la plupart. En condition de lumière constante (LL), les mouches n'ont plus d'activité rythmique. On dit qu'elles sont arythmiques (Fig. 3).

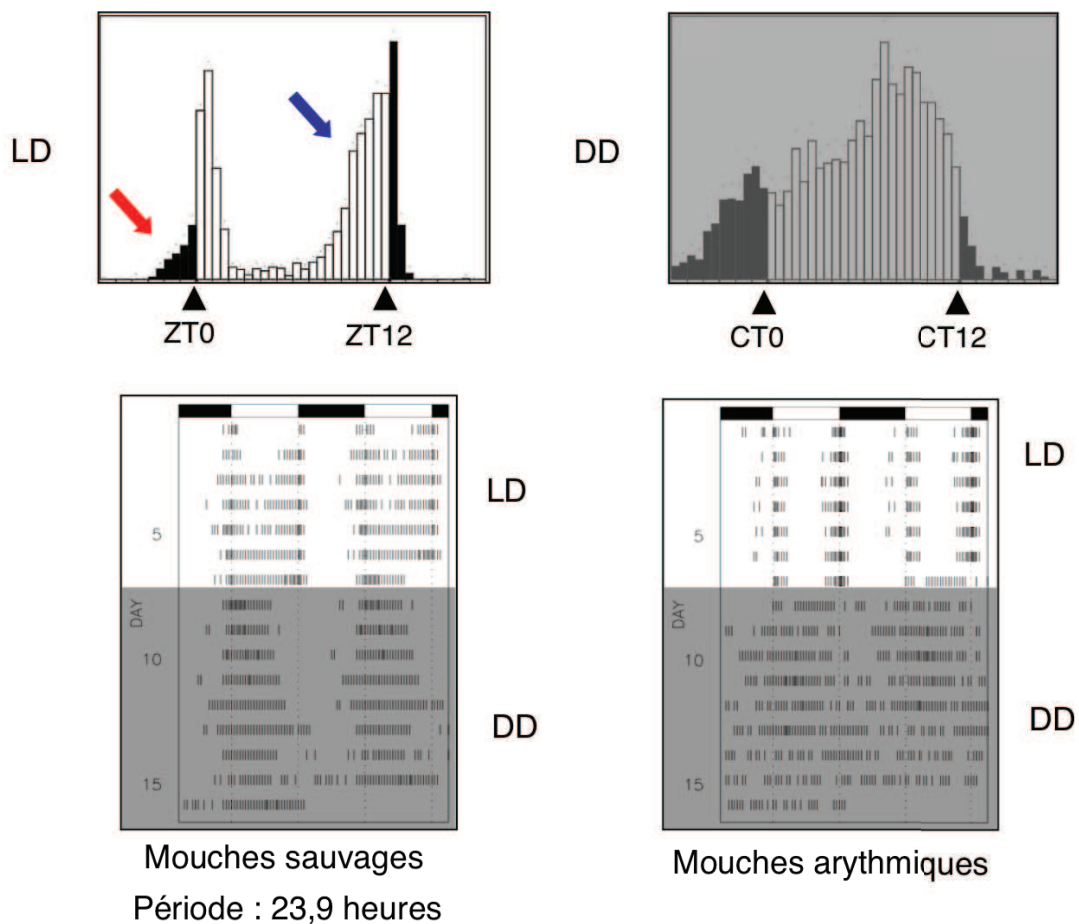


Figure 3 : Activité locomotrice des drosophiles

Haut (Eductions): Les drosophiles ont une activité bimodale en condition LD et unimodale en DD. Les flèches rouge et bleue représentent respectivement l'anticipation de l'allumage et de l'extinction de la lumière. Les barres d'histogrammes représentent l'activité par tranche de 30 min. ZT0 et ZT12 indiquent l'allumage et l'extinction de la lumière. CT0 et CT12 représentent les temps d'allumage et d'extinction de la période d'entraînement précédent l'obscurité constante.

Bas : Actogrammes de mouches sauvages (rythmiques en DD) et arythmiques en DD. Les périodes de jour et de nuit en LD sont représentées au-dessus de chaque actogramme. Chaque barre noire représente un nombre de passage des mouches devant une cellule photoréceptrice. Chaque jour est représenté 2 fois : à la suite et au-dessous du jour précédent.

2 – Découverte des gènes d'horloge

Le premier gène d'horloge fut identifié chez la drosophile en 1971. Konopka et Benzer étudiaient les rythmes d'éclosion et l'activité locomotrice des drosophiles. Ils ont découvert le gène *period* dont trois mutants présentaient des défauts de comportement (Fig. 4). Ces trois mutants sont per^{short} (per^S) avec une période de 19 heures, per^{long} (per^L) avec une période de 28 heures et le mutant nul per^{01} présentant une arhythmicité comportementale (Konopka et Benzer 1971).

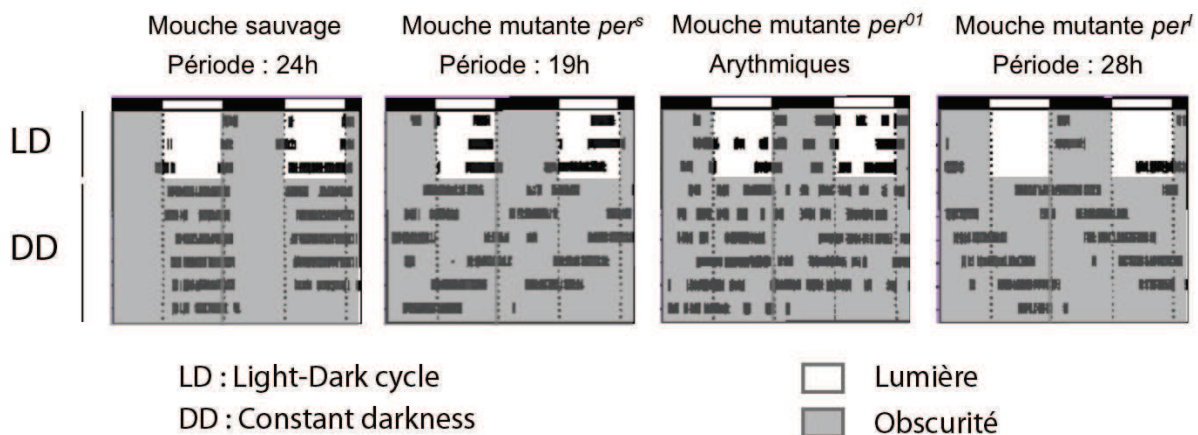


Figure 4 : Actogrammes des mutants du gène *per* (Konopka et Benzer, 1971) : per^S avec une période courte, per^L avec une période longue et per^{01} arythmique. Chaque jour est représenté 2 fois : à la suite et au-dessous du jour précédent.

Le second gène d'horloge chez la drosophile fut découvert en 1994. Il s'agit du gène *timeless* dont la mutation rendait les mouches arythmiques (Sehgal 1994). Depuis, de nombreux gènes ont été identifiés chez la drosophile : les facteurs de transcription *clock* (Allada 1998) et *cycle* (Rutila 1998) les kinases *doubletime* (Price 1998) ou *shaggy* (Martinek 2001) et bien d'autres gènes. L'horloge circadienne moléculaire commence à être bien détaillée mais il reste encore de nombreuses facettes et acteurs à identifier.

II - Bases moléculaires des rythmes circadiens

A – L'horloge moléculaire chez *Drosophila melanogaster*

1 – Deux boucles moléculaires interconnectées

L'horloge moléculaire de la drosophile repose sur l'oscillation de l'expression d'un certain nombre de gènes dits d'horloge. On peut représenter l'horloge moléculaire sous la forme de 2 boucles de rétrocontrôle négatif interconnectées (Collins et Blau, 2007) (Fig. 5). Ces deux boucles s'organisent autour du complexe CLOCK-CYCLE (CLK-CYC) qui forme un complexe activateur des deux boucles. *clk* et *cyc* sont deux facteurs de transcription de type bHLH (domaine basique Hélice-Boucle-Hélice) à domaine PAS (domaine d'interaction protéine-protéine Pas-Arnt-Sim)(Rutila et al., 1998 ; Bae et al., 1998).

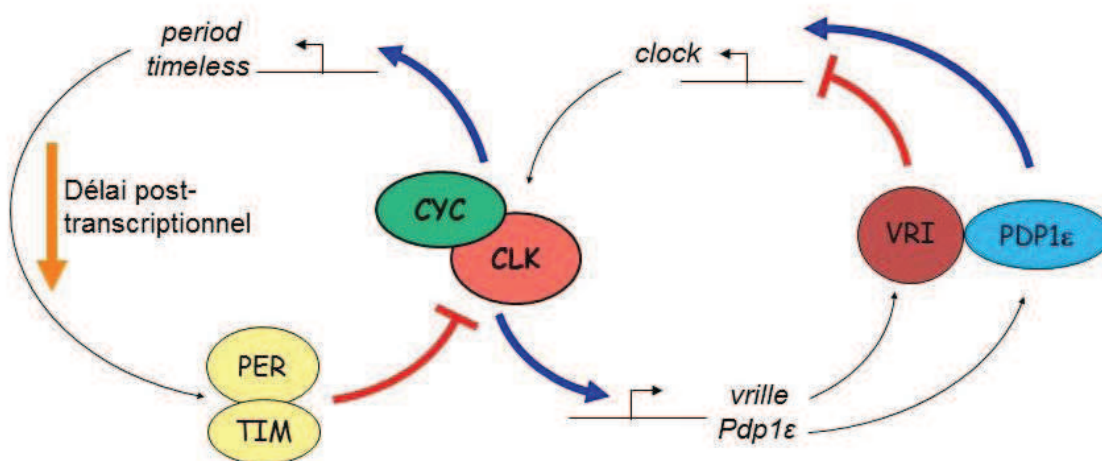


Figure 5 : Boucles de régulation transcriptionnelles négatives de l'horloge moléculaire de drosophile (D'après Rosato et al., 2006). Dans une première boucle, le dimère CLK-CYC active la transcription de *per* et *tim*, dont les protéines vont ensuite s'accumuler avec un délai. Dans le noyau, PER et TIM inhibent CLK-CYC et donc leur propre transcription. Dans une seconde boucle, CLK-CYC active la transcription de *vri* et *Pdp1ε* qui sont respectivement l'inhibiteur et l'activateur du gène *clock*.

Dans une première boucle, le complexe CLK-CYC active la transcription des gènes *period* (*per*) et *timeless* (*tim*)(Darlington 1998). Une fois accumulées dans le cytoplasme, les protéines PER et TIM entrent dans le noyau pour inhiber les dimères CLK-CYC et donc leur

propre transcription. Cette boucle d'autorégulation génère les oscillations des ARNm. Il existe un délai entre l'accumulation des ARNs de *per* et *tim* et l'accumulation des protéines (Fig. 6). Ce délai est dû à de nombreuses modifications post-traductionnelles de PER et TIM qui ralentissent leur accumulation.

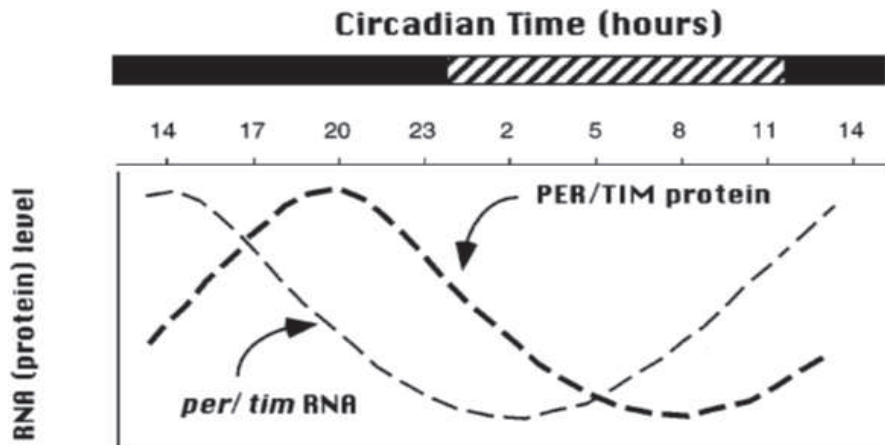


Figure 6: Délais d'accumulation entre les ARNs et les protéines PER et TIM (Young et al., 1998). La transcription de *per* et *tim* débute en début de journée (ZT3-6) et les ARNm s'accumulent jusqu'à ZT14. La traduction de PER et TIM débute vers ZT11 et les protéines s'accumulent jusqu'à ZT20.

Dans une seconde boucle, le complexe CLK-CYC active la transcription des gènes *vrille* et *pdp1ε*. *vrille* et *pdp1ε* sont respectivement le répresseur et l'activateur du gène *clk*. Il y a donc une compétition entre ces deux gènes au niveau du promoteur de *clk*, ce qui permet de réguler l'expression de *clk*. L'activité du complexe CLK-CYC, activateur de la transcription de *per* et *tim*, est donc également régulée par cette seconde boucle.

Le contrôle transcriptionnel joue donc un rôle important dans l'horloge, surtout au niveau de la régulation de l'activité du complexe CLK-CYC. Ce complexe active la transcription de *per* et *tim* quand il est lié aux séquences E-box sur leur promoteur. Il a été montré que les formes phosphorylées de PER se liaient à CLK sur les E-box, induisant son hyperphosphorylation. L'hyperphosphorylation de CLK dépend de la kinase DBT, liée à PER, qui va recruter d'autres kinases pour sa phosphorylation. CLK se décroche alors de la chromatine, toujours complexé avec PER. Suite à la dégradation de PER, CLK-CYC pourra de nouveau activer la transcription de *per* et *tim* (Kim and Edery, 2006 ; Yu et al., 2006 ; Yu et al., 2009 ; Menet et al., 2010).

2 – Régulations post-traductionnelles de PER et TIM

La boucle PER-TIM est importante pour générer le rythme des drosophiles. Les oscillations des ARN semblent rythmer l'horloge et permettre de générer des périodes de 24 heures. Cependant, il a été montré que l'expression constitutive de *per* chez des mutants *per⁰* permet de restaurer une rythmicité des mouches (Yang et Sehgal, 2001 ; Grima et al., 2004). L'expression constitutive de *tim* permet de restaurer une certaine rythmicité mais de manière moins efficace (Yang et Sehgal, 2001). Les protéines PER cyclent toujours, même en absence d'oscillations de leur ARN. Les modifications post-traductionnelles de ces protéines sont donc importantes pour générer la période des mouches. Ces modifications vont notamment contrôler la quantité des protéines ainsi que leur localisation subcellulaire (Fig. 7).

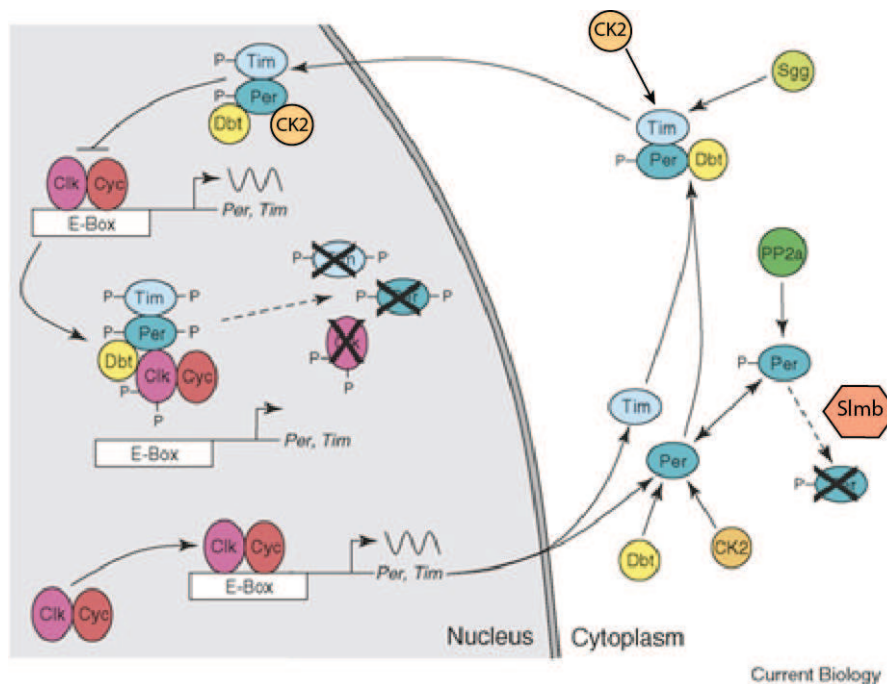


Figure 7 : La phosphorylation de PER et TIM dans le cycle circadien (D'après Hardin et al., 2005). En début de journée, CLK-CYC active la transcription de *per* et *tim*. PER est phosphorylé par DBT et CK2, ce qui conduit à sa dégradation via Slmb. Cette dégradation est contrebalancée par la phosphatase PP2A, ainsi que par la liaison entre PER et TIM. L'entrée de PER et TIM dans le noyau (en fin de nuit) est également contrôlée par la phosphorylation de TIM par CK2 et SGG. Dans le noyau PER-TIM se lie à CLK-CYC pour les décrocher de la chromatine et ainsi inhiber leur propre transcription (effet répresseur dépendant de DBT et CK2). La dégradation de PER et TIM permettra à CLK-CYC de recommencer la transcription de *per* et *tim*.

On peut considérer le début du cycle avec la transcription des gènes *period* et *timeless* qui commence en début de journée, vers ZT3-ZT6. Les ARNm de ces gènes vont s'accumuler avant d'être traduits. Les protéines vont ensuite subir des modifications post-traductionnelles, principalement des phosphorylations, par différentes kinases telles que Shaggy ou Doubletime. Ces phosphorylations seront contrebalancées par l'action de phosphatases pour bien générer les différentes phases du cycle. En ce qui concerne PER, il a été montré que cette protéine est phosphorylée par la kinase DBT (Price et al., 1998 ; Nawathean et al., 2004). Les formes hyperphosphorylées de PER vont ensuite être recrutées et ubiquitinylées par l'ubiquitine ligase SCF^{S^{lmb}}, ce qui va conduire à sa dégradation par le protéasome (Grima et al., 2002 ; Ko et al., 2002). La phosphorylation de PER est contrebalancée par la phosphatase PP2A qui ainsi stabilise PER et participe à son accumulation dans le cytoplasme (Sathyanarayanan et al., 2004). De son côté, TIM va également permettre la stabilisation des protéines PER phosphorylées. En effet, TIM interagit avec les protéines PER phosphorylées et empêche la dégradation de PER par le protéasome (Lee et al., 1996). Cette interaction PER-TIM n'empêche cependant pas l'interaction de DBT avec PER puisque des complexes PER-DBT et TIM-DBT sont retrouvées par co-immunoprécipitation (Kloss et al., 2001). De plus, la stabilisation de PER par TIM fait intervenir la phosphatase PP1 qui stabilise TIM et favorise ainsi sa liaison avec PER et son accumulation (Fang et al., 2007).

Après cette régulation cytoplasmique de PER et TIM, ces protéines doivent entrer dans le noyau pour agir sur la transcription de leurs propres gènes. L'entrée dans le noyau est une nouvelle fois contrôlée par l'état de phosphorylation de ces protéines. Une des kinases responsable de la phosphorylation de PER et TIM est la caséine kinase 2 (CK2) (Lin et al., 2002 ; Meissner et al., 2008). L'étude des mutants TIK (Timekeeper) et Andante, respectivement mutants pour la sous-unité catalytique et la sous-unité régulatrice de CK2, a montré que PER était phosphorylé par CKII (Lin et al., 2002 ; Akten et al., 2003). Trois sérines de PER (S149, S151 et S153) ont notamment été identifiées comme sites de phosphorylation par CK2 (Lin et al., 2005). En 2008, une étude *in vivo* sur CK2 montre son implication dans le contrôle de la stabilité de TIM indépendamment de PER alors que son rôle sur PER dépend de TIM (Meissner et al., 2008). D'autre part, ces mutants présentent un allongement de période corrélé à un retard d'entrée dans les noyau de PER et TIM (Lin et al., 2002 ; Akten et

al., 2003 ; Smith et al., 2008). Il semblerait donc que CK2 joue directement sur la stabilité de TIM alors que sa fonction sur PER interviendrait quand il est lié à TIM afin de participer à leur entrée dans le noyau.

En ce qui concerne l'entrée dans le noyau de TIM, elle implique sa phosphorylation par la kinase Shaggy (homologue de GSK3 β chez les mammifères). La surexpression de Shaggy (SGG) dans les neurones d'horloge raccourcit la période des mouches et entraîne une avance d'entrée dans le noyau des protéines PER et TIM (Martinek et al, 2001). Il faut noter que les quantités de TIM ne sont pas affectées par cette surexpression, suggérant que SGG est seulement impliqué dans l'entrée dans le noyau de TIM.

D'après les premières études sur l'entrée de PER et TIM dans le noyau, on pensait que ces deux protéines entraient sous forme d'hétérodimères. Cependant, depuis le début des années 2000, certains résultats tendent à montrer le contraire. En effet, le marquage des protéines PER et TIM dans les neurones d'horloge a montré que PER était présent dans le noyau avant TIM (Shafer et al., 2002) et que la présence de TIM n'est pas nécessaire à son entrée (Chang et Reppert, 2003 ; Nawathean et al., 2004 ; Dunlap, 2004). Dans une autre étude, il a été montré que PER et TIM se lient rapidement après leur traduction et qu'elles se séparent juste avant d'entrer dans le noyau. Cette liaison empêcherait ces protéines d'entrer dans le noyau et d'offrir un délai supplémentaire avant leur effet répresseur (Meyer et al., 2006).

Une fois dans le noyau, PER et TIM vont pouvoir interagir avec le dimère CLK-CYC et ainsi inhiber la transcription de leurs propres gènes. De la même manière que précédemment, PER et TIM étaient supposées réprimer CLK-CYC en hétérodimères. Cependant, il a maintenant été montré que PER pouvait inhiber CLK-CYC en absence de TIM, qui est dégradé avant PER (Rothenfluh et al., 2000 ; Chang et al., 2003). D'autre part, la phosphorylation de PER par DBT et CKII dans le noyau est indispensable à son activité répressive (Nawathean et al., 2004). La phosphorylation de PER continue après l'inhibition de CLK-CYC et envoie PER à la dégradation, permettant à un nouveau cycle de commencer.

B – L’horloge moléculaire chez les mammifères

1 – Les boucles de régulation négative

L’horloge moléculaire est très conservée chez les métazoaires. On retrouve donc de grandes similitudes entre l’horloge moléculaire de drosophile et celle des mammifères. La grande différence est l’existence de paralogues qui vont complexifier l’horloge des mammifères. Par exemple, on retrouve trois gènes *period* (*Per1*, *Per2* et *Per3*) et deux gènes *cryptochrome* (*Cry1* et *Cry2*). En ce qui concerne *Per3*, il semble qu’il n’est pas impliqué directement dans la régulation de l’horloge moléculaire (Bae et al., 2001).

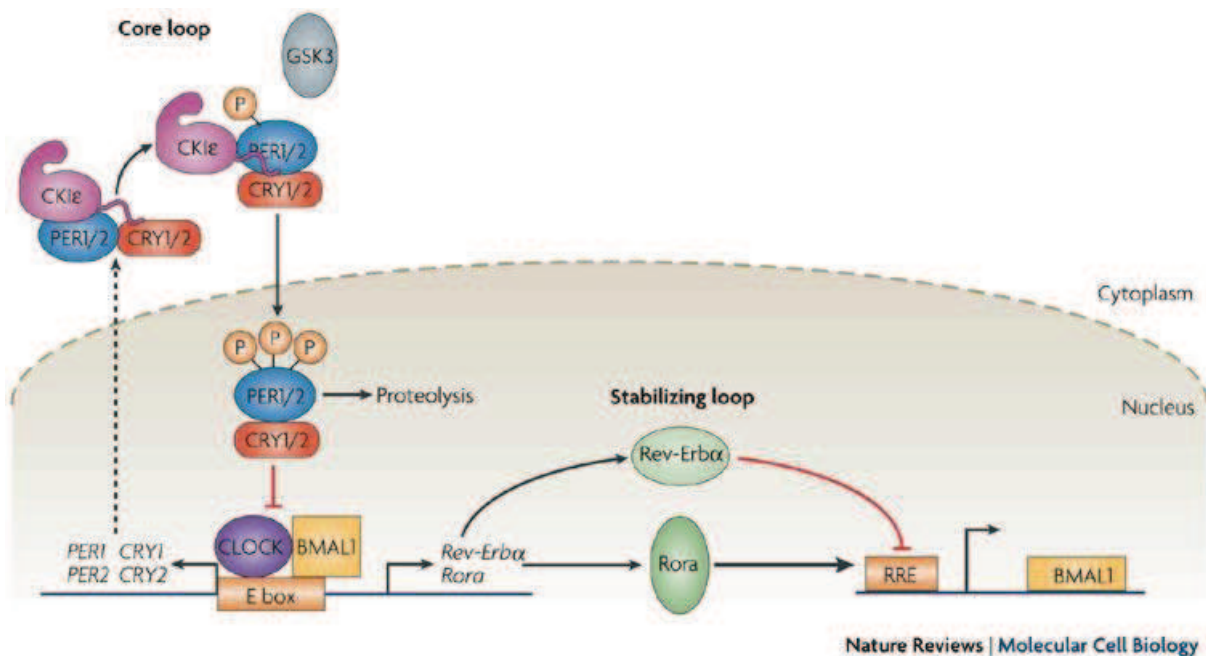


Figure 8 : L’horloge moléculaire chez les mammifères (Gallego et Virshup, 2007). Dans une première boucle, le dimère **CLOCK-BMAL1** active la transcription des gènes *Per* et *Cry*. Les protéines **PER** et **CRY** interagissent ensemble dans le cytoplasme pour pouvoir entrer dans le noyau, où elles inhiberont **CLOCK-BMAL1** et donc leur propre transcription. Dans une seconde boucle, **CLOCK-BMAL1** activent la transcription de *Rev-Erbα* et *Rora*, l’inhibiteur et l’activateur de **BMAL1**.

L’horloge chez les mammifères repose également sur deux boucles de régulation négative (Fig. 8). Au centre de ces boucles se trouvent les gènes *Clock* et *Bmal1* (orthologue de *cycle* chez la drosophile). *Clock* et *Bmal1* sont deux facteurs de transcription à domaines bHLH-PAS.

Dans une première boucle, CLOCK et BMAL1 interagissent ensemble (Gekakis et al., 1998), via leur domaine PAS, et vont se lier aux séquences E-box des gènes *Per* et *Cry* (Lee et al., 2001) pour activer leur transcription (*Per1*, *Per2*, *Cry1* et *Cry2*). Cette liaison aux séquences E-box se produit tout au long du cycle. Les protéines PER et CRY vont former un hétérodimère dans le cytoplasme. Une fois entré dans le noyau, ce complexe va inhiber l'activité du complexe CLK-BMAL1 et donc leur propre transcription. *Cry* a d'ailleurs une fonction répressive plus importante que *Per* (Kume et al., 1999). La dégradation des protéines PER et CRY permettra la levée de l'inhibition et le départ d'un nouveau cycle (Gallego et Virshup, 2007).

Il existe un gène *Tim* chez la souris mais il ne s'agit pas vraiment de l'homologue fonctionnel de drosophile. En effet, TIM n'interagit pas avec PER pour le stabiliser, entrer dans le noyau et réprimer CLK-BMAL1 (Shearman et al., 2000). Chez les mammifères, les protéines CRY remplissent cette fonction. Il faut donc noter qu'elles n'ont plus la même fonction que chez la drosophile. En effet, ce sont des répresseurs transcriptionnels (Collins al., 2006) et n'ont plus de fonction dans la photoréception : leur activité est indépendante de la lumière (Griffin et al., 1999).

En ce qui concerne la seconde boucle, elle permet une régulation transcriptionnelle du gène *Bmal1*. Le dimère CLK-BMAL1 va activer la transcription de deux autres gènes, *Rora* et *Rev-Erb α* qui sont des récepteurs nucléaires. Il y a une compétition entre ces deux récepteurs pour reconnaître les séquences RRE (R-Response Element) sur le promoteur de *Bmal1* (Emery 2004 Neuron). *Rora* et *Rev-Erb α* sont respectivement l'activateur (Preitner et al., 2002) et le répresseur (Sato et al., 2004 ; Emery et al., 2004) transcriptionnel de *Bmal1*.

2 – Les modifications post-traductionnelles

Les modifications post-traductionnelles jouent également un rôle majeur dans l'horloge des mammifères. On retrouve d'ailleurs plusieurs gènes en commun avec l'horloge de drosophile, comme par exemple DBT, CKII, SGG ou encore PP1. En ce qui concerne CKI ϵ , l'orthologue de DBT, il a été montré que cette kinase phosphorylait les protéines PER (Keesler et al., 2000 ; Eide et al., 2005 ; Yagita et al., 2009). La kinase CKI δ joue également sur

la phosphorylation de PER et semble avoir une fonction redondante à CKI ϵ (Akashi et al., 2002 ; Camacho et al., 2001). Il a été montré que la phosphorylation de PER1 et PER2 par CKI induit leur dégradation par le protéasome (Akashi et al., 2002) via l'E3 ubiquitine ligase SCF ^{β -TrCP} (β -TrCP est l'orthologue de Slimb chez la drosophile) (Shirogane et al., 2005). Cette dégradation dépendante de CKI est contrebalancée par la phosphatase PP1 (Gallego et al., 2006). La phosphorylation de PER par CKI joue également dans sa localisation subcellulaire, avec la phosphorylation des Sérines 661 et 663, nécessaires à son entrée dans le noyau (Vielhaber et al., 2000, Takano et al., 2004). CKI ϵ joue également sur la phosphorylation de CRY quand il est lié à PER et régule positivement l'activité de BMAL1 (Eide et al., 2002).

Quant à GSK3 β , l'orthologue de Shaggy, elle est impliquée dans la phosphorylation de BMAL1 (Sahar et al., 2010), PER2 (Litaka et al., 2005), CRY2 (Harada et al., 2005) et Rev-Erb α (Yin et al., 2006). Il a été montré que BMAL1 est phosphorylée par GSK3 β sur la Sérine 17 et la Thréonine21, ce qui conduit à son ubiquitination et sa dégradation. En ce qui concerne PER2, sa phosphorylation par GSK3 β lui permet d'entrer dans le noyau. D'autre part, la phosphorylation de CRY2 sur la Sérine 557 induit la phosphorylation de la Sérine 553 par GSK3 β , conduisant à sa dégradation par le protéasome via l'ubiquitine ligase SCF^{Fbxl3} (Godinho et al., 2007 ; Busino et al., 2007 ; Siepka et al., 2007). De manière surprenante, la phosphorylation de Rev-Erb α par GSK3 β ne conduit pas à sa dégradation mais à sa stabilisation.

En ce qui concerne l'implication de CKII dans l'horloge, il a été montré que cette kinase phosphorylait PER2, ce qui pourrait jouer sur sa localisation nucléaire (Maier et al., 2009). D'autre part, CKII α joue également sur la phosphorylation de BMAL1 et la phosphorylation de la Sérine90 pourrait permettre sa localisation nucléaire (Tamaru et al., 2009).

III – Voie ubiquitine protéasome

Dans l'ensemble du vivant, la régulation des protéines se fait à la fois par une alternance de synthèse et de dégradation de celles-ci. Cette régulation est très importante pour activer ou arrêter différents processus. La dégradation des protéines d'horloge est très importante pour l'oscillateur circadien et la synchronisation par la lumière.

La dégradation des protéines se fait principalement par la voie ubiquitine protéasome. Cette dégradation fait intervenir différentes enzymes permettant la reconnaissance du substrat à dégrader. L'ubiquitine est d'abord activée par l'enzyme d'activation E1, puis transférée à l'enzyme de conjugaison E2. L'E2 va ensuite interagir avec l'ubiquitine ligase E3 qui reconnaît le substrat à dégrader. Le substrat sera ainsi mono puis polyubiquitinylé afin d'être adressé et reconnu par le protéasome. C'est l'ubiquitine ligase E3 qui confère la spécificité de ce système en interagissant directement avec le substrat, conduisant à son ubiquitination (Kaiser et al., 2005) (Fig. 9).

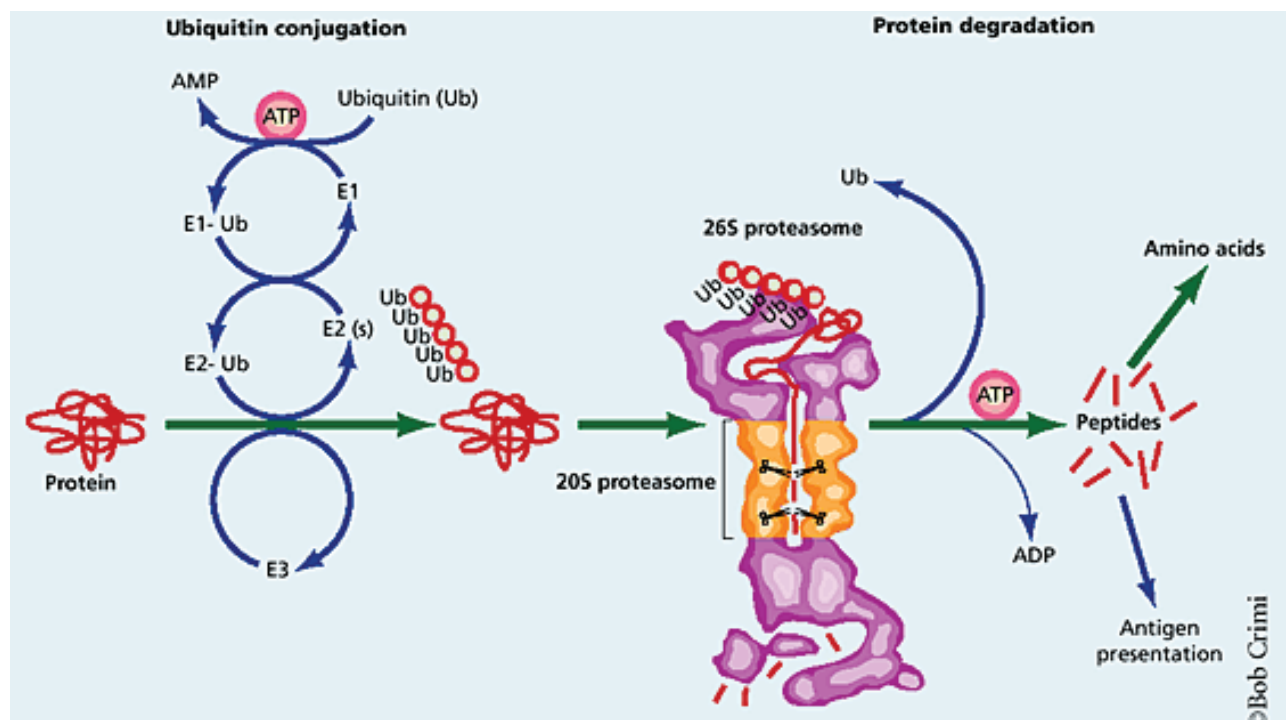


Figure 9 : Ubiquitination et dégradation par le protéasome 26S (Goldberg, 2000). L'enzyme E1 active et lie une molécule d'ubiquitine, puis la transfère à l'E2. L'E3 reconnaît le substrat à dégrader et interagit avec l'E2, conduisant à l'ubiquitination du substrat. Le substrat ubiquitinylé est reconnu par le protéasome dans lequel il sera lysé et recyclé. L'ubiquitine est également recyclée.

A - Le protéasome

Le protéasome est un complexe multiprotéique qui va dégrader les protéines. Le protéasome reconnaît le substrat par sa polyubiquitination (au moins 4 résidus d'ubiquitine), ce qui lui permet d'entrer dans ce complexe. La protéine y est dénaturée afin d'être hydrolysée en petits morceaux de 3 à 25 acides aminés. Ces morceaux seront expulsés du protéasome par l'autre extrémité. En ce qui concerne l'ubiquitine, elle sera recyclée une fois expulsée du protéasome (Sorokin et al., 2009).

Le protéasome 26S est un complexe multiprotéique composée de 3 parties. Le protéasome 20S correspond au cœur catalytique du protéasome et est composé de 2 couches de sous-unités alpha entourant 2 couches de sous-unités beta. Chaque couche est composée de 7 sous-unités. Le couvercle et la base du protéasome sont deux protéasomes 19S et permettent d'une part la reconnaissance du substrat polyubiquitinylé et d'autre part d'expulser les morceaux de 3 à 25 acides aminés ainsi que les résidus d'ubiquitine (Kaiser et al., 2005 ; Sorokin et al., 2009) (Fig. 10).

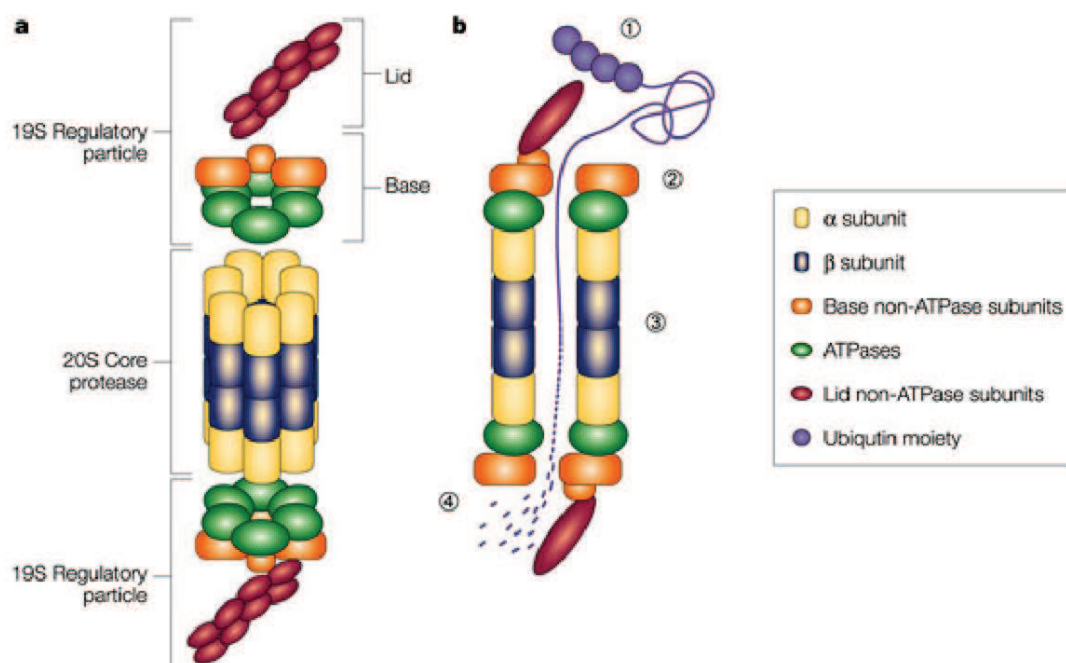


Figure 10 : Structure du protéasome 26S et processus de dégradation (Sullivan et al., 2003). (a) Le cœur protéolytique 20S se compose de 4 couches de 7 sous-unités α et β . Ce cœur contient le domaine catalytique central. Les complexes régulateurs 19S forment le couvercle et la base du protéasome. Ces complexes sont constituées de sous-unités ATPase et non ATPase. (b) La chaîne de polyubiquitine du substrat est reconnue par le couvercle 19S, puis cette protéine entre dans le cœur 20S où elle sera hydrolysée. Les petits peptides qui sortent du protéasome seront ensuite recyclés.

B – Les E3 ubiquitine ligases

Comme je l'ai précisé précédemment, les E3 ubiquitine ligases confèrent la spécificité de reconnaissance du substrat. Il en existe de nombreuses que l'on peut regrouper en trois familles : les U-box, les RING ubiquitine ligases (Really Interesting New Gene) et les ubiquitines ligases à domaine HECT (Homologous to E6-AP Carboxyl Terminus).

1 – Les U-box

Les protéines U-box furent d'abord identifiées comme facteurs participant à la polyubiquitination des substrats avec les 3 enzymes E1, E2 et E3 (Johnson et al., 1995 ; Koegl et al., 1999). En 2001, une étude a montré que ces U-box avaient une activité E3 ubiquitine ligase, formant ainsi une nouvelle famille. Ces ubiquitines ligases U-box ont une structure similaire aux RING ubiquitine ligase. Leur activité ubiquitine ligase leur provient de ce domaine U-box, placé en position C-terminale, avec une proline conservée (Hatakeyama et al., 2001).

2 – RING ubiquitine ligases

Les RING ubiquitine ligases forment la famille la plus représentée dans le vivant. Elles sont organisées autour des Cullines. Ces Cullines sont au nombre de 6 chez la drosophile et permettent de nombreuses associations multiprotéiques. En position C-terminale, ces Cullines possèdent une lysine qui permet la neddylation du complexe en liant la protéine NEDD8 (Neural precursor cell Expressed Developmentally Down-regulated protein 8). Cette neddylation permet de réguler leur activité. C'est également dans cette région que va se lier la protéine RING, permettant la liaison à l'E2 pour ubiquitinyler le substrat. En position N-terminale, ces Cullines ont chacune un domaine spécifique qui permet de lier leur adaptateur. Cet adaptateur est la protéine faisant la liaison entre l'E3 ubiquitine ligase et le substrat à dégrader (Petroski et Deshaies, 2005) (Fig. 11).

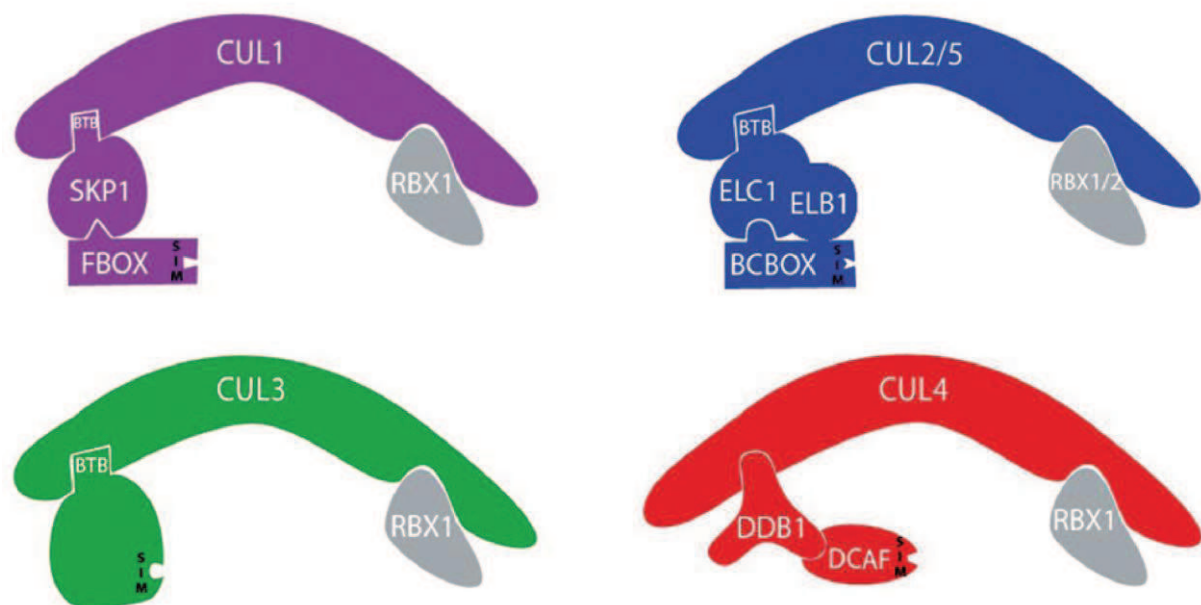


Figure 11 : Structure des différentes RING ubiquitine ligases (Merlet et al., 2009). Elles sont nucléées autour d'une des 5 cullines (CUL1-5). Le complexe CUL1 (SCF) et les complexes CUL2 et CUL5 possèdent une protéine (SKP1 et Elongine C : ELC1 et ELB1) faisant le lien entre la culline et la protéine reconnaissant le substrat (F-box et BC-BOX). Les complexes CUL3 ont une unique protéine faisant le lien entre la culline et le substrat. Pour les complexes CUL4, DDB1 se lie à la culline et recrute DCAF qui reconnaîtra le substrat. La reconnaissance du substrat par ces complexes se fait via différents motifs d'interaction (SIM), tels que WD40, Kelch ou leucine-rich repeats.

2-1 – Les complexes Cul-1 et Cul-3

Les complexes les plus décrits et les mieux caractérisés sont les complexes SCF (SkpA, Cullin-1, F-box protéine), organisés autour de la Cullin-1. En N-terminal, la Culline-1 interagit avec la protéine Skp1 (S-phase-Kinase-associated Protein-1) qui va elle-même interagir avec la protéine à boîte F via le domaine d'interaction protéine-protéine F-box. La protéine à boîte F confère la spécificité de ce complexe et donc la spécificité du substrat reconnu (Cardozo et Pagano, 2004). L'interaction entre la protéine à boîte F et le substrat se fait par différents domaines d'interaction protéine-protéine, tels que le domaine WD40 ou encore le domaine leucin-rich repeats. Différentes protéines à boîte F ont été identifiées et décrites dans la littérature. Parmi celles-ci, on retrouve la protéine Slmb (Supernumerary limbs) chez la drosophile (β -TrCP chez les mammifères). Une implication de Slmb dans la voie ubiquitine protéasome a été décrite à plusieurs reprises dans des processus tels que l'apoptose, la voie Hedgehog ou encore la voie Wnt. En 2002, il a été montré que Slmb était impliqué dans la

régulation de l'horloge, et plus particulièrement de la protéine PERIOD (Grima et al ; Koh et al Nature, 2002 ; Chiu et al., 2008).

D'autres E3 ubiquitine ligases de type RING commencent à être plus largement décrites et notamment celles organisées autour de la Cullin-3. L'implication de ces complexes est retrouvée dans divers processus tels que la voie Hedgehog ou encore l'apoptose. Ces complexes multiprotéiques sont organisés de la même manière que les complexes SCF, avec la Cullin-3 comme protéine centrale. Dans ces complexes, la Cullin-3 interagit directement avec son adaptateur. Ici, cet adaptateur entre l'ubiquitine ligase et la protéine à dégrader n'est plus une protéine à boîte F mais une protéine à domaine BTB (Bric a brac, Tramtrack, Broadcomplex). L'interaction entre cette protéine et la Cullin-3 se fait via ce domaine BTB. C'est cette protéine qui va conférer la spécificité de ces complexes Cul-3 (Xu et al., 2003 ; Pintard et al., 2004). En ce qui concerne la liaison entre la protéine à domaine BTB et le substrat, elle pourrait se faire via différents domaines d'interaction. Parmi ces domaines, on retrouve les domaines Zinc-finger, kelch repeats ou MATH (Meprin and TRAF homology) (Xu et al., 2003 ; Pintard et al., 2004). Un autre domaine, le domaine BACK (BTB And C-terminal Kelch) est fréquemment retrouvé dans les BTB possédant le domaine kelch repeat. Ce domaine BACK pourrait également participer à la liaison du substrat (Stogios et Privé, 2004).

2-2 – Neddylation et Déneddylation

L'activité des RING ubiquitine ligases est régulée par la neddylation et la déneddylation de ce complexe. La neddylation permet l'activation du complexe RING alors que la déneddylation provoque notamment la dissociation du complexe (Merlet et al., 2009).

a - Neddylation

La neddylation consiste à la liaison de NEDD8, une petite protéine de type ubiquitine, à une lysine en position C-terminale de la Culline. La neddylation requiert également trois enzymes. L'hétérodimère E1-like, composé de UBA1 et UBA3 (homologue pour les domaines N-terminal et C-terminal de l'enzyme activatrice E1) active NEDD8 pour la donner à l'E2.

UBC12 semble être la seule E2 impliquée dans le processus de neddylation. DCN1 interagit ensuite avec la Culline et UBC12 pour permettre l'accrochage de NEDD8 à la Culline. DCN1 pourrait avoir une fonction similaire à une E3 ubiquitine ligase (Merlet et al., 2009).

La neddylation permet l'activation des complexes RING mais il a également été montré que cette neddylation rendait ces complexes instables (Wu et al., 2005), en jouant notamment sur la stabilité de la Culline. La neddylation entraîne l'ubiquitination des composants de ces complexes et leur dégradation.

b - Déneddylation

En ce qui concerne la déneddylation, elle fait intervenir le signalosome COP9. Le signalosome COP9 ou CSN est une protéase composée de 8 sous-unités (CSN1 à CSN8) (Fig.12) qui régule l'activité des E3 ubiquitine ligases à domaine RING en interagissant avec ces dernières. Ce complexe a une activité isopeptidasique qui retire NEDD8 de la Culline (Lyapina et al., 2001 ; Cope et al., 2002 ; Wolf et al., 2003). Il a été montré que CSN5 est la sous-unité responsable de la déneddylation (Cope et al., 2002). D'autre part, il a été montré que le CSN pouvait également jouer sur la phosphorylation et la déubiquitination des substrats de la voie ubiquitine protéasome (Chamovitz et al., 2004, Sorokin et al., 2009), ainsi que sur la stabilité des Cullines et donc des complexes (Wu et al., 2005). Sur ce dernier point, il a été montré que la neddylation déstabilise les Cullines, alors que les formes déneddylées sont stables. La déneddylation par le CSN permet donc de conserver l'intégrité de ce complexe en empêchant l'auto-ubiquitination des composants et leur dégradation.

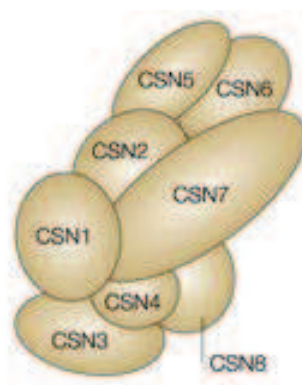


Figure 12 : Structure du signalosome COP9 (Sullivan et al., 2003). COP9 est un complexe multiprotéique constitué de 8 sous-unités (CSN1-8)

Le signalosome a d'abord été identifié chez *Arabidopsis* dans la régulation de la croissance de ces plantes en fonction de la lumière (Wei et al., 1994 ; Chamovitz et al., 1996). Il a été montré qu'il était requis dans la dégradation dans le noir du facteur de transcription HY5, responsable de la croissance. En 2008, l'équipe de Justin Blau a montré que le signalosome était impliqué dans la dégradation de la protéine TIMELESS par la lumière (Knowles et al., 2009).

3 - Les ubiquitines ligases à domaine HECT.

Les ubiquitines ligases à domaine HECT sont moins décrites que les RING ubiquitine ligases. Cette famille a été initialement identifiée en relation avec le papilloma virus (HPV). En effet, il a été montré que l'ubiquitine ligase E6-AP ubiquitinait *p53* en présence de ce virus (Hatakeyama et al., 1997).

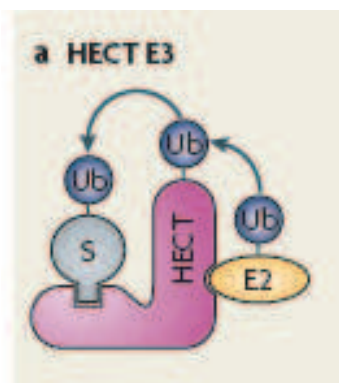


Figure 13 : Structure d'une E3 ubiquitine ligase de type HECT. L'ubiquitine est transférée de l'E2 à l'E3 avant d'ubiquitinyler le substrat S (Rotin et al., 2009)

Le domaine HECT est composé d'environ 350 acides aminés en position C-terminale et il possède une cystéine conservée. La plupart des ligases à domaine HECT (retrouvés dans 879 séquences dans 101 espèces, en passant de la levure à l'humain) possèdent également des domaines d'interaction protéine-protéine ou protéine-lipide localisés en position N-terminale de la protéine. La particularité de ces ubiquitines ligases est cette cystéine conservée. L'ubiquitine est transférée de l'E2 à l'E3 sur cette cystéine, avant d'ubiquitinyler le substrat. Ce système diffère des RING ubiquitine ligases qui ne fixent pas l'ubiquitine directement et qui servent donc de lien entre l'E2 et le substrat pour l'ubiquitinyler (Fig. 13).

C – Horloge et protéasome

1 – Dégradation circadienne de PER et TIM

Nous avons vu que les ARNs de PER et TIM cyclent ainsi que les protéines. De plus, les oscillations de PER persistent même quand les ARNs ne cyclent plus. La régulation de ces protéines est donc un facteur clé pour le bon fonctionnement de l'horloge. Au niveau de cette régulation, la dégradation de PER et TIM est importante pour générer ces oscillations et les différentes phases du cycle. En 2002, deux laboratoires ont découvert le premier composant de la voie ubiquitine protéasome impliqué dans la dégradation de protéines d'horloge chez la drosophile. Il s'agit du gène *slmb* qui code pour une protéine à boîte F. La protéine Slmb sert d'adaptateur aux ubiquitines ligases de type SCF et leur confère donc leur spécificité.

Chez les mutants *slmb*, les mouches deviennent arythmiques en DD. L'analyse par Western Blot de PER et TIM dans ces mouches montre une absence d'oscillation de ces protéines avec une persistance des formes phosphorylées de PER et TIM en DD (Grima et al., 2002). Des expériences dans des cellules S2 ont également montré une accumulation de formes phosphorylées de PER lorsque *slmb* est dérégulé (utilisation d'ARN interférence et d'un mutant de *slmb* délété de son domaine F-box). Cette accumulation dépend d'ailleurs de la phosphorylation de PER par DBT (Ko et al., 2002). La phosphorylation de PER par DBT sur la Sérine 47 semble être importante. En effet, si on empêche la phosphorylation de ce site, PER est stabilisé et a moins d'affinité pour Slmb, et inversement (Chiu et al., 2008). Slmb est donc impliqué dans le contrôle du niveau des formes de PER phosphorylées par DBT.

Une interaction entre PER et Slmb a été observée *in vivo* en DD à tous les temps (Grima et al., 2002). Cette interaction persiste d'ailleurs en absence de TIM. Ces résultats suggèrent un contrôle de Slmb sur les formes libres de PER dans le cytoplasme (PER reste cytoplasmique en absence de TIM), ce qui permettrait de retarder sa translocation dans le noyau. D'autre part, la mise au point d'un anticorps reconnaissant la phosphorylation de S47 a permis de montrer que PER était phosphorylé sur ce site en fin de nuit, lorsqu'il est nucléaire (Shafer et al., 2002 ; Chiu et al., 2008). Slmb pourrait donc dégrader PER pour lever l'inhibition de l'activité de CLK-CYC dans le noyau.

En ce qui concerne la régulation de TIM, rien ne nous permet de conclure à un contrôle direct de sa dégradation via Slmb. L'accumulation de formes phosphorylées de TIM chez les mutants Slmb indique que leur dégradation est Slmb-dépendante mais il pourrait s'agir d'une conséquence de l'effet sur PER.

2 – La dégradation de TIM par la lumière

L'horloge est entraînée par des cycles environnementaux jour-nuit. La lumière synchronise l'horloge et lui permet de se remettre à l'heure. D'autre part, nous avons vu que les protéines PER et TIM continuent d'osciller en DD, après un entraînement en LD. Pour mieux comprendre cette remise à l'heure par la lumière, des expériences de pulse de lumière, sur des mouches placées en DD, ont été réalisées. Ces expériences ont montré que ces pulses induisaient une dégradation de TIM (Myers et al., 1996). TIM semble donc être dégradé « par » la lumière. En 1999, l'inhibition du protéasome dans des cellules a permis de montrer que la lumière induisait l'ubiquitination de TIM et sa dégradation par le protéasome (Naidoo et al., 1999). Puisque TIM est toujours dégradé par la lumière en absence de Slmb, l'ubiquitination et la dégradation de TIM par la lumière doit faire intervenir une autre ubiquitine ligase (Grima et al., 2002).

2-1 - Cryptochrome

Le Cryptochrome (CRY) est une protéine sensible à la lumière bleue de la famille des photolyases (Emery et al., 1998). Des études, *in vitro* et *in vivo*, ont montré que CRY interagit avec TIM en réponse à la lumière, ce qui conduit à sa dégradation par le protéasome (Ceriani et al., 1999 ; Busza et al., 2004). D'autre part, la mutation *cry^b* rend les mouches rythmiques en LL (Emery et al., 2000).

En 2006, de nouvelles mutations rendant les mouches rythmiques en LL ont été découvertes. Le gène touché par ces mutations code pour une protéine à boîte F : *jetlag*, faisant partie d'un complexe SCF. Deux mutations spontanées de ce gène ont été découvertes : *jet^c*, que l'on retrouve le plus fréquemment, et *jet^r*, plutôt rare. Le phénotype de ces mutants ressemble au mutant *cry^b* (rythmicité en LL et aucun phénotype

comportemental en DD), suggérant que ce gène pourrait être impliqué dans la photoréception (Koh et al., 2006). De plus, en culture de cellules, TIM est dégradé à la lumière, uniquement en présence de CRY et de JET. Dans ces mêmes cellules, il a été montré que les protéines TIM et JET interagissent entre elles. Au vu de ces résultats, on peut dire que la lumière active CRY, induisant son interaction avec TIM. Cette interaction va permettre à TIM d'être reconnu par JET qui va l'adresser au protéasome.

Peu après la découverte des allèles de *jetlag*, il a été montré que l'allèle *jet^f* n'induit pas seul la rythmicité en LL. En effet, il faut que cette mutation soit accompagnée de l'allèle *ls-tim* de *timeless* (Peschel et al., 2006). Dans la nature, on retrouve deux allèles de *tim* : l'allèle *ls-tim* et l'allèle *s-tim*. L'allèle *ls-tim* possède deux codons alternatifs d'initiation de la traduction. Ces 2 ATG conduisent à l'expression des protéines L-TIM (1421 aa) et S-TIM (1398 aa). Quant à l'allèle *s-tim*, la délétion d'une guanine entre les deux codons d'initiation, interrompt la phase de lecture avec un codon stop, générant la forme S-TIM uniquement (Tauber et al., 2007 ; Sandrelli et al., 2007). La forme L-TIM a moins d'affinité pour CRY que la forme S-TIM, conduisant à une plus faible sensibilité à la lumière des mouches *ls-tim*. La combinaison des allèles *ls-tim* et *jet^f* contribue à la stabilisation de TIM, ce qui conduit à la rythmicité des mouches en LL (Rosato et al., 1997 ; Peschel et al., 2006 ; Sandrelli et al., 2007).

En 2009, il a été montré que JET induisait également la dégradation de CRY en absence de TIM. En présence de TIM, l'interaction entre CRY et S-TIM protège CRY de la dégradation (S-TIM ayant plus d'affinité avec CRY que L-TIM). JET est donc impliqué dans la dégradation de TIM et CRY, mais TIM reste la cible préférentielle (Peschel et al., 2009). On peut penser que la lumière active CRY qui va alors se lier à TIM. Les complexes JET-TIM sont alors favorisés et CRY devra attendre de n'être plus protégé par TIM pour être dégradé via JET (Fig. 14).

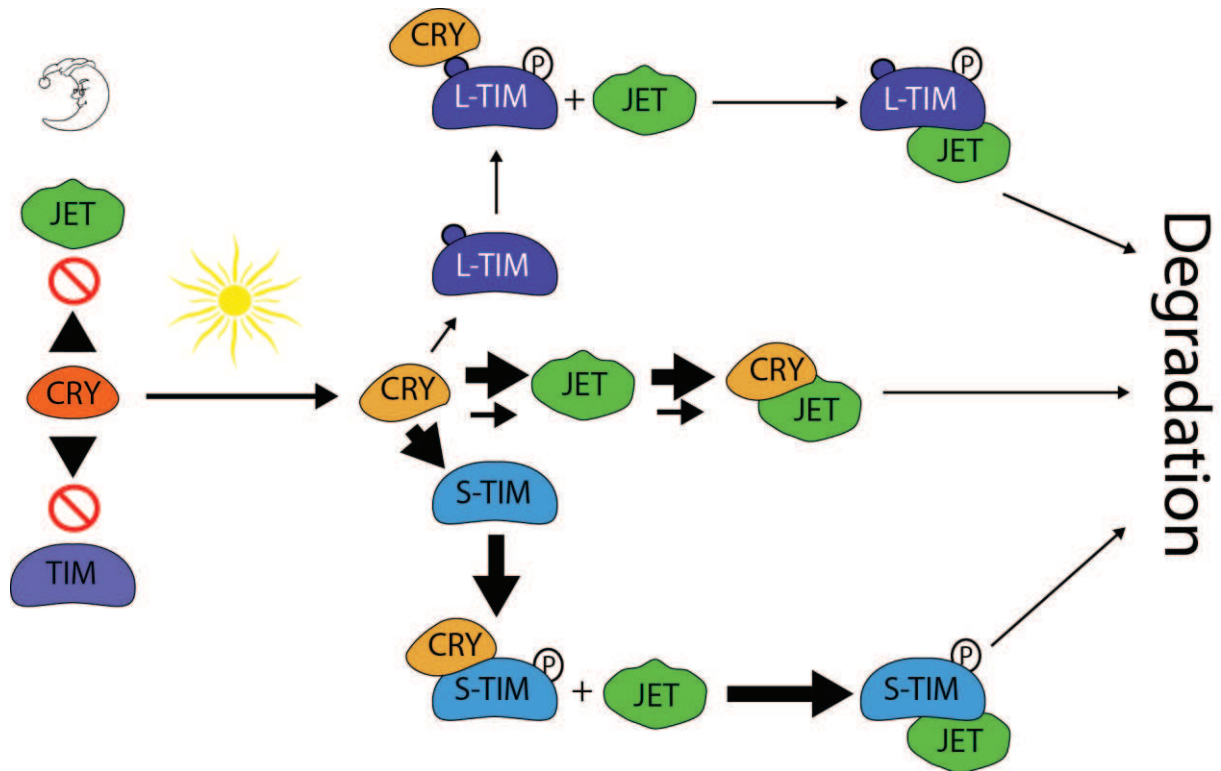


Figure 14 : Dégradation séquentielle de TIM et CRY par la lumière via JETLAG (Peschel et al., 2009). La lumière modifie CRY pour se lier à TIM. L'affinité entre CRY et TIM est plus forte pour la forme S-TIM, conduisant à sa dégradation par JET. Une fois libéré de TIM, CRY est reconnu par JET pour être dégradé. Avec la forme L-TIM, CRY se lie préférentiellement à JET et est dégradé. La dégradation de L-TIM est donc moins efficace.

2-2 - Signalosome

Le Signalosome COP9 est un complexe multiprotéique ayant un rôle de régulateur général de la dégradation des protéines. Des mutations nulles de la sous-unité CSN4, ou de la sous-unité CSN5 de ce complexe, affectent l'intégrité de COP9. Chez ces mutants, la dégradation de TIM par la lumière est affectée (Knowles et al., 2009). En effet, des pulses de lumière chez ces mutants affectent très légèrement les niveaux de TIM. Cependant, la dégradation de TIM arrive à être restaurée lorsqu'on co-exprime *jetlag* dans les neurones à PDF. Le rôle du signalosome dans la dégradation de TIM par la lumière semble donc être dans la même voie que *jetlag*.

IV – Bases anatomiques des rythmes circadiens

A – Horloge centrale et horloges périphériques

Chez la drosophile, l'horloge qui gouverne les rythmes d'activité-repos se situe dans le cerveau. Les neurones composant cette horloge sont définis par leur expression cyclique de la protéine PER. Cependant, des cellules d'horloge sont présentes dans de nombreux organes en dehors du cerveau. Parmi ces organes, on retrouve par exemple : les antennes, les pattes, les ailes, le proboscis, l'intestin, les tubules de Malpighi ou encore les cellules folliculaires ovariennes (Liu et al., 1988 ; Siwicki et al., 1988). Dans ces organes se trouve une horloge dite périphérique. Ces horloges périphériques fonctionnent lorsque les organes sont placés séparément en culture (elles sont donc autonomes) mais avec des oscillations qui s'amortissent après quelques jours. Ces oscillations ont notamment pu être observées par l'expression de la luciférase sous le contrôle du promoteur du gène *per* (Fig. 15) (Plautz et al., 1997).

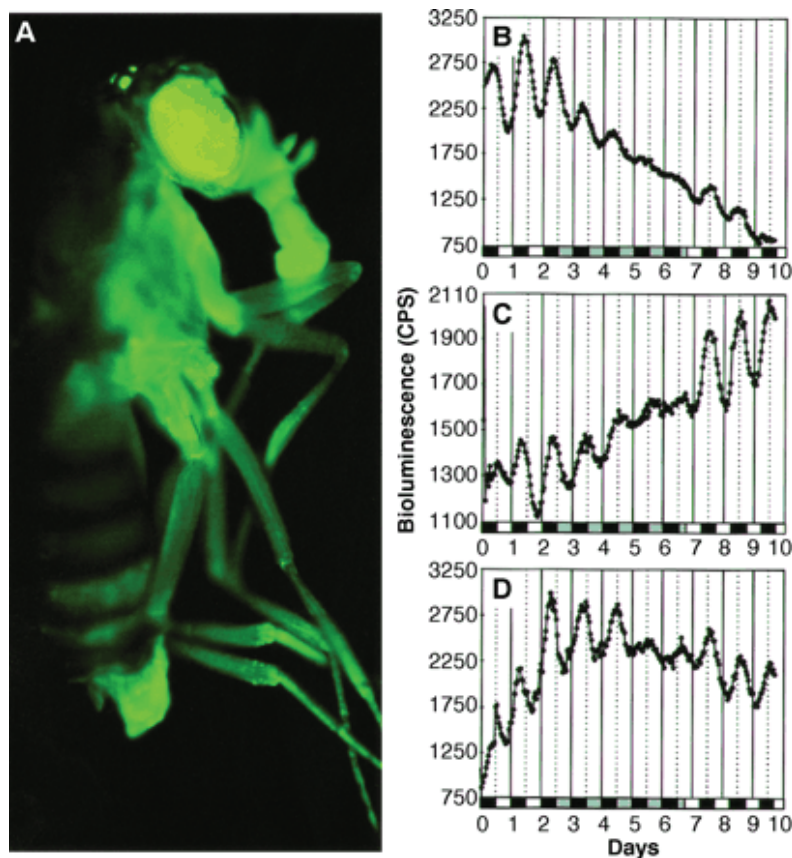


Figure 15 : Des horloges périphériques dans tout l'organisme de la drosophile.

Rythmes de bioluminescence en LD, DD puis LD. Lorsque le gène de la luciférase est placé sous le contrôle des séquences promotrices du gène *per*, des rythmes de bioluminescences sont observables dans tout l'organisme en LD et en DD : sur les mouches entières (A), et dans des tissus en culture (têtes (B), thorax (C) et abdomens (D)). Barres noires : obscurité ; barres blanches : lumière ; barres grises : jour subjectif (Plautz et al., 1997).

Dans cette étude, il a d'ailleurs pu être mis en évidence que ces horloges en culture étaient de nouveau entrainables par des cycles LD. Ces horloges perçoivent donc la lumière. Cette perception de la lumière semble passer, comme pour l'horloge cérébrale, par la protéine photoréceptrice CRYPTOCHROME (CRY) (Ivanchenko et al., 2001). Plus tard, il a été montré que la mutation *cry^b* de CRY diminuait la rythmicité de ces horloges (antennes corps pattes...) en culture (Krishnan et al., 2001 ; Levine et al., 2002), suggérant un rôle supplémentaire de CRY dans la génération du rythme des horloges périphériques.

Des études sur les tubules de Malpighi ont montré des oscillations des protéines PER et TIM en LD. Afin de montrer l'autonomie de cette horloge périphérique, les oscillations de PER et TIM ont été comparées avec des drosophiles décapitées ou non. Il a été observé une persistance des rythmes de PER et TIM à la fois en LD et en DD. De plus, suite à un décalage de photopériode de 12 heures, les oscillations de PER et TIM se sont également décalées pour s'adapter à cette nouvelle photopériode. Il existe donc bien une horloge périphérique autonome dans les tubules de Malpighi (Giebultowicz et al., 1997 ; Hege et al., 1997).

B - L'horloge adulte chez *Drosophila melanogaster*

1 – Les différents groupes de neurones

Chez la drosophile, l'horloge cérébrale s'organise sous la forme d'un réseau neuronal comprenant plusieurs groupes de neurones que l'on peut séparer par leur position dans le cerveau ainsi que par des différences morphologiques et fonctionnelles. L'horloge est composée d'environ 150 neurones exprimant les protéines PER et TIM. Ces neurones peuvent être divisés en différents groupes dont les principaux sont: les neurones latéraux ventraux (LNV), les neurones latéraux dorsaux (LND) et les neurones dorsaux (DN) (Fig. 16).

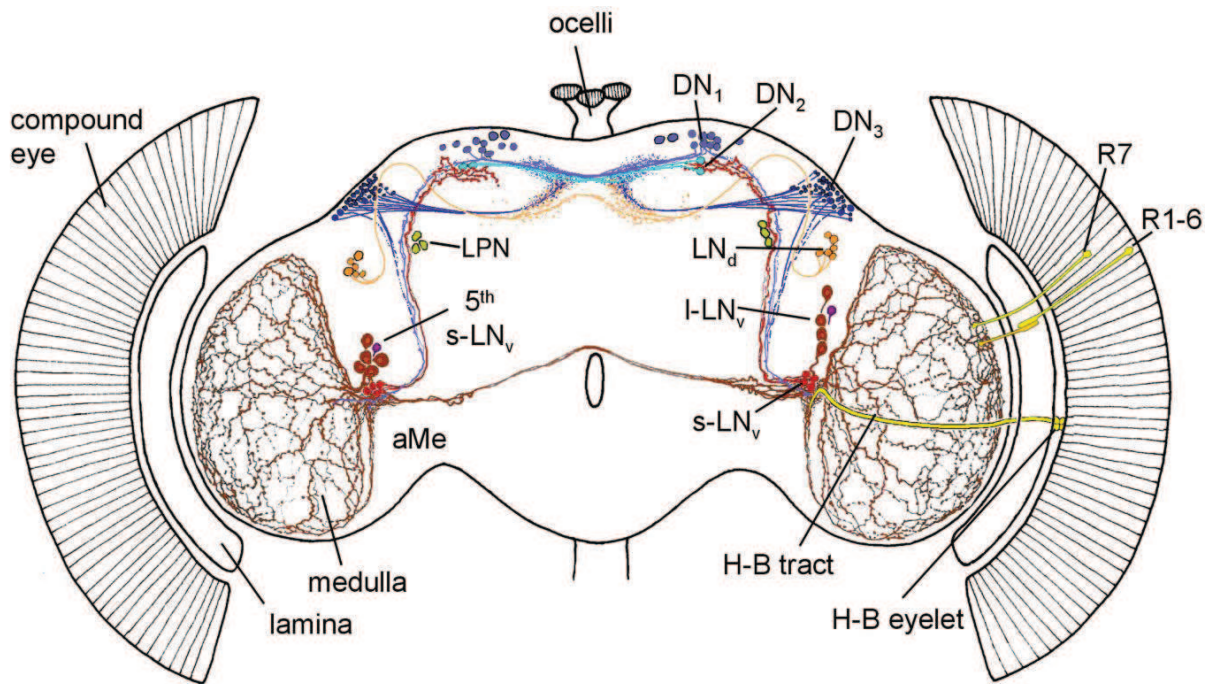


Figure 16 : Les neurones d'horloge et leurs projections dans un cerveau de drosophile adulte (Helfrich-Förster et al., 2007). Les LNV (s-LNV et l-LNV) sont en rouge, le 5^{ème} s-LNV en violet, les LND en orange, les DN (DN1, DN2 et DN3) en bleu et les LPN en vert.

1-1 - Les neurones latéraux ventraux (LNV)

Il existe entre 9 et 11 neurones latéraux ventraux par hémisphère cérébral. On peut diviser ces neurones en 2 sous-groupes : les petits (s-LNV) et les gros (l-LNV) neurones latéraux ventraux. Les s-LNV sont au nombre de 5 mais seulement 4 d'entre eux expriment le neuropeptide PDF. Le s-LNV n'exprimant pas le PDF est appelé 5^{ème} s-LNV afin de le différencier des autres s-LNV. Les l-LNV sont entre 4 et 6, et ces neurones expriment tous le PDF.

Les s-LNV se trouvent dans la medulla accessoire (aMe) et ils projettent dans la région dorsale du cerveau. En ce qui concerne les l-LNV, ils sont situés au-dessus de la medulla accessoire et projettent d'une part, dans toute la medulla et d'autre part, vers l'autre hémisphère. Les projections contralatérales venant de chaque hémisphère relient donc les 2 medulla accessoires au travers du POT (Posterior Optic Tract).

1-2 - Les neurones latéraux dorsaux (LNd)

Il y a 6 neurones latéraux dorsaux que l'on peut diviser en 2 grands groupes selon leur expression ou non du cryptochrome. Les 3 LNd exprimant le cryptochrome (LNd CRY+) projettent dans la région dorsale et également vers la medulla accessoire. D'autre part, 2 de ces 3 neurones expriment également le neuropeptide sNPF (short NeuroPeptide F) et le 3^{ème} exprime ITP (Ion Transport Peptide). En ce qui concerne les LNd n'exprimant pas CRY (LNd CRY-), ils projettent uniquement dans la région dorsale du cerveau.

1-3 - Les neurones dorsaux (DN)

Comme leur nom l'indique, les neurones dorsaux sont localisés en position dorsale dans chaque hémisphère cérébral. On peut les séparer en trois différents groupes, les DN1, les DN2 et les DN3. Les DN1, environ 17 neurones, peuvent encore être divisés en sous-groupes, les DN1a (antérieurs) et les DN1p (postérieurs). Les 2 DN1a sont les seuls DN1 présents chez la larve et sont séparés des autres DN1 par leur position antérieure. Les DN1 projettent entre autre vers la medulla accessoire ou vers la Pars Intercerebralis (PI) ou bien les deux. Il n'y a que 2 DN2 et ils sont situés au niveau des projections dorsales des s-LNv. Les projections de ce groupe rejoignent celles des DN1 vers la PI (Helfrich-Förster et al., 2003). En ce qui concerne les DN3, il y a environ 40 neurones qui sont localisés de façon très latérale, juste au-dessus des LNd.

1-4 - Les neurones latéraux postérieurs (LPN)

Ils sont au nombre de 4 et sont placés au même niveau que les LNd mais de l'autre côté des projections dorsales des s-LNv. Ils sont impliqués dans l'entraînement par la température (Yoshii et al., 2005 ; Shafer et al., 2006 ; Miyasako et al., 2007).

2 - Fonction des différents groupes de neurones

2-1 – LNV et PDF

La particularité de ces neurones d'horloge est l'expression du neuropeptide PDF (Pigment Dispersing Factor). En effet, tous les l-LNV expriment ce neuropeptide et 4 des 5 s-LNV l'expriment aussi. L'expression du PDF dans ces neurones se situe à la fois dans les corps cellulaires et les projections (Fig. 17).

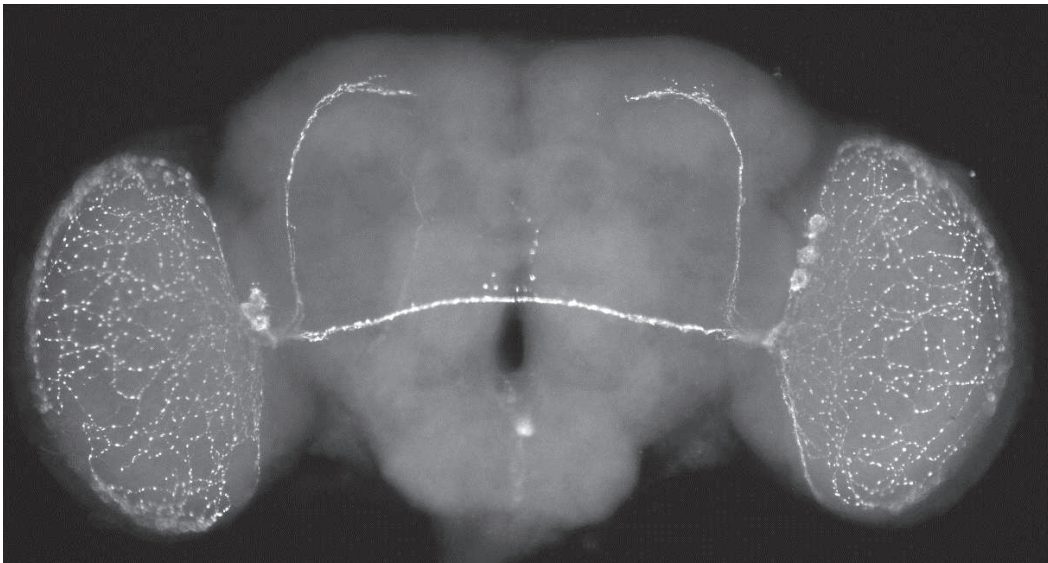


Figure 17 : Expression du PDF dans un cerveau de drosophile adulte

L'immunomarquage révèle les corps cellulaires et les projections des s-LNV et des l-LNV

L'expression du *pdf* n'est pas soumise à un contrôle circadien. En effet, il a été montré par Northern blot que les ARNm de *pdf* n'oscillent pas (Park et al., 2000). Cependant, l'expression du *pdf* dans les LN larvaires et les s-LNV est dépendante des gènes *clk* et *cyc*. En effet, les mutants *cyc*⁰ et *clk*^{rk} présentent une absence d'expression de *pdf* (ARN et protéine) dans les s-LNV ainsi que dans leurs précurseurs larvaires. L'expression dans les l-LNV est cependant peu affectée avec seulement des défauts de projections de ces neurones (Park et al., 2000). CLK et CYC ont donc un rôle cellule-spécifique sur l'expression de ce neuropeptide.

Le rôle du PDF semble plutôt être un rôle de coordination entre les différentes composantes neuronales de l'horloge. En effet, les mouches *pdf⁰* sont toujours entrainables en conditions LD mais présentent quelques défauts comme une anticipation absente du matin et une avance de phase du pic du soir (entre 1 et 2 heures). Ces mouches conservent une rythmicité en conditions constantes (DD) pendant 2-3 jours puis deviennent arythmiques pour la plupart (Fig. 18). Certaines mouches conservent une certaine rythmicité mais avec une période courte (Renn et al., 1999). De plus, l'analyse de la protéine PERIOD, en *pdf⁰* dans les s-LNV, nous apprend autre chose. Individuellement, les s-LNV ont toujours une persistance des oscillations de PER pendant au moins 9 jours de DD. L'amplitude de ces oscillations est cependant moindre que dans des mouches sauvages. L'absence du PDF aurait donc pour conséquence une absence de synchronisation entre les différents neurones s-LNV. Ces neurones présentent un décalage de phase dans l'intensité de PER et dans sa localisation subcellulaire mais les oscillations persistent (Lin et al., 2004).

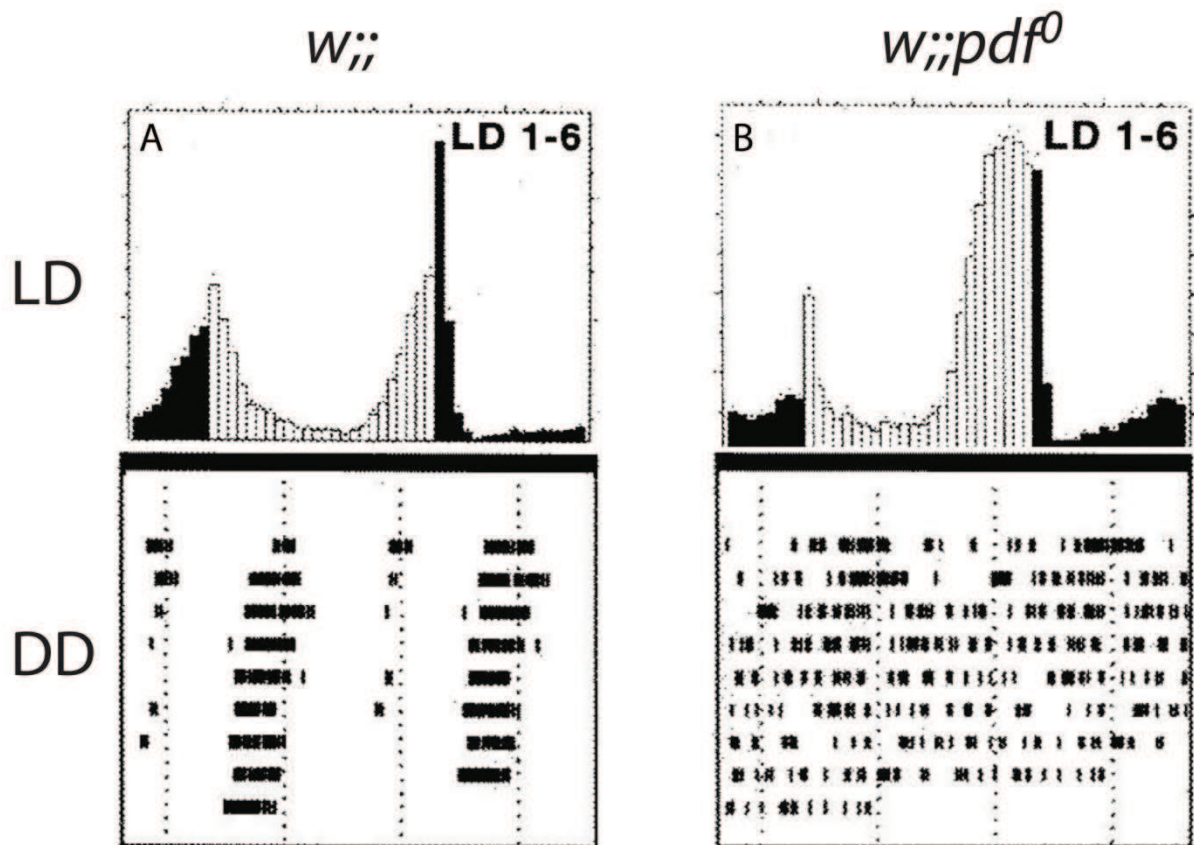


Figure 18 : Activité locomotrice des mutants *pdf⁰* en LD et en DD. En LD, les mouches *pdf⁰* n'ont plus d'anticipation du matin et ont une avance du pic du soir. En DD, ces mouches sont arythmiques (Renn et al., 1999)

Un récepteur au neuropeptide PDF a finalement pu être identifié. En 2005, trois différentes études ont identifié un récepteur couplé à une protéine G de classe II (GPCR) répondant aux signaux PDF (Mertens et al., 2005 ; Lear et al., 2005 ; Hyun et al., 2005). Ils ont montré que des mutants pour ce récepteur diminuaient la rythmicité des mouches en DD. D'autre part, ces mouches ne présentent plus d'anticipation du matin en LD ainsi qu'une avance d'anticipation du soir. Ces résultats sont les mêmes que chez les mutants pdf 01. La localisation de ce récepteur (PDF-R, Han ou gop selon les études) dans les neurones montrait différents résultats dans ces trois études. En 2008, Shafer a montré par l'utilisation d'un rapporteur à l'AMPC que du PDF-R ciblé dans tous les neurones d'horloge répondait au PDF dans tous les groupes à l'exception des l-LNVs (Shafer et al., 2008). En 2010, le groupe de Taghert a utilisé un transgène contenant ce récepteur couplé à un tag Myc pour notamment déterminer sa localisation (Im et al., 2010). Une forte expression du PDF-R a été trouvée dans 6 DN1, le 5^{ème} s-LNV et 3 LNd ainsi qu'une expression plus faible dans 4 DN1, 2 DN2, 10 DN3 et les l-LNV. Un bas niveau dans les s-LNV. De plus, une cinquantaine de cellules ne faisant pas partie des neurones d'horloge expriment également le récepteur au PDF.

2-2 – Oscillateur du matin et oscillateur du soir

La drosophile est un organisme qui anticipe l'aube et le crépuscule. Ces deux activités sont contrôlées par deux différents oscillateurs : l'oscillateur du matin et l'oscillateur du soir.

a – L'oscillateur du matin

L'oscillateur du matin est le groupe de cellules qui va permettre à la drosophile d'anticiper l'allumage de la lumière. En 2004, l'existence de ces 2 oscillateurs a été mise en évidence (Stoleru et al., 2004 ; Grima et al., 2004). Il a été montré que l'ablation des cellules à PDF rend les mouches arythmiques en DD et engendrent une absence de pic du matin en LD (Stoleru et al., 2004). Les neurones à PDF font donc partie de l'oscillateur du matin. Par contre, l'oscillateur du soir ne permet pas de générer une rythmicité des mouches en DD. L'implication de ces cellules dans l'oscillateur du matin a également été montrée par notre équipe. Elle a montré que la restauration d'une horloge seulement dans les neurones à PDF

permet de générer une anticipation du matin en LD et une rythmicité en DD (Grima et al., 2004). Ces deux études ont donc montré qu'une horloge fonctionnelle uniquement dans ces cellules est suffisante pour générer une rythmicité en DD, et que ces neurones font partie de l'oscillateur du matin.

D'autre part, une horloge fonctionnelle restreinte aux l-LNvs ne permet pas de restauration de ce pic du matin (Grima et al., 2004). En 2009, la restauration d'une horloge, uniquement dans les s-LNv, a permis de restaurer une anticipation du matin en LD (Cusumano et al., 2009). On peut donc restreindre le rôle des neurones à PDF, dans l'anticipation du matin, aux s-LNv (Fig. 19).

b – Oscillateur du soir

L'oscillateur du soir est donc, quant à lui, le groupe de cellules qui va permettre à la drosophile d'anticiper l'extinction de la lumière. L'ablation des cellules CRY+, PDF- (5^{ème} s-LNv, les 3 LNd CRY+ et des DN1 et DN3) entraîne la disparition du pic du soir en LD. Les neurones CRY+, PDF- font donc partie de l'oscillateur du soir (Stoleru et al., 2004). Cet oscillateur fut ensuite restreint aux 3 LNd CRY+ et au 5^{ème} s-LNv (PDF-) par notre équipe (Grima et al., 2004). En effet, ce papier montre qu'une horloge restaurée dans les LNv PDF+ conduit à la restauration d'un pic du matin, alors que sa restauration dans tous les LNv et les LNd CRY+ permet la restauration des pics du matin et du soir. On peut donc dire que les 3 LNd CRY+ et le 5^{ème} s-LNv PDF- sont suffisants pour générer un pic du soir dans ces conditions (Fig. 19).

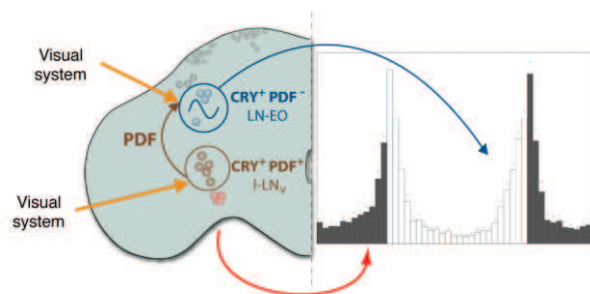


Figure 19 : Oscillateurs du matin et du soir. L'oscillateur du matin se limite aux s-LNv PDF⁺, et le 5^{ème} s-LNv PDF⁻ et les LNd CRY⁺ composent l'oscillateur du soir. (D'après Cusumano et al., 2009).

2-3 - Perception et entrainement par la lumière

L'horloge circadienne fonctionne de manière autonome pour générer sa période proche de 24 heures. Cependant, cette horloge a besoin d'être synchronisée. Cette synchronisation se fait par différents stimuli extérieurs (tels que lumière et température) mais le synchronisateur le plus efficace est la lumière. Chez la drosophile, la perception de la lumière se fait de plusieurs manières : via le CRYPTOCHROME, l'eyelet de Hofbauer-Buchner et l'œil composé (Fig. 20).

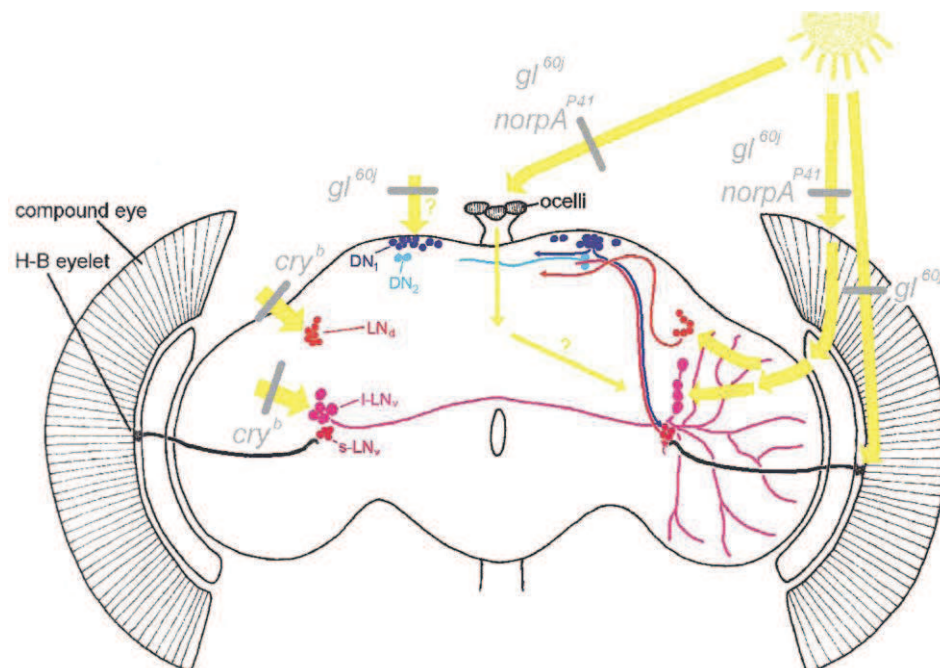


Figure 20: Trois voies de photoréception circadienne informe l'horloge cérébrale de la drosophile : la rétine (œil composé), l'eyelet de Hofbauer-Buchner et le cryptochrome (Helfrich-Förster et al., 2001)

a – Le Cryptochrome

En ce qui concerne le CRYPTOCHROME, il s'agit d'une protéine photoréceptrice sensible à la lumière bleue. L'implication du CRYPTOCHROME dans l'horloge circadienne de drosophile a été découverte en 1998 à l'aide du mutant *cry^b* (Stanewsky et al., 1998). Ce mutant *cry^b* (*cry baby*) est rythmique en LD et en DD mais les oscillations moléculaires de PER et TIM sont affectées dans les extraits de tête. En effet, on peut observer que les

niveaux de ces protéines en LD sont constants tout au long de la journée, tandis que des cycles de température restaurent les oscillations, indiquant un effet spécifique sur l'entraînement par la lumière. D'autre part, ceci est confirmé par le fait que ce mutant n'est pas sensible aux pulses de lumière, bien qu'il reste entraîné par des cycles LD, indiquant l'existence d'une autre voie. En 2000, ces mouches ont été analysées en condition de lumière constante (LL). Dans ces conditions, les drosophiles sont normalement arythmiques. Cependant, les mouches *cry^b* sont rythmiques et se comportent comme des mouches sauvages placées en DD (Emery et al., 2000). Dans cette étude, les auteurs concluent que CRY est le photorécepteur majeur de l'horloge circadienne.

En ce qui concerne l'expression de CRY dans les neurones, différents outils ont permis de répondre à cette question. La fabrication de pilotes d'expression *cry-gal4* (Emery et al., 2000 ; Klarsfeld et al., 2004) a permis de montrer que ce photorécepteur était exprimé dans les LNvs (s-LNvs et l-LNvs), les LNd et certains DN. La mise au point d'un anticorps dirigé contre le CRYPTOCHROME indique plus précisément la présence de CRY dans les LNv, 3 des 6 LNd, 2 DN1a, 6 DN1p (Yoshii et al., 2008 ; Benito et al., 2008).

b – Le système visuel

Nous avons vu que la perception de la lumière peut se faire via le cryptochrome mais elle utilise également le système visuel. Le système visuel est composé de 2 structures : l'œil et l'eyelet de Hofbauer-Buchner. Il se pourrait également que les ocelles, placées sur le dessus de la tête, participent à la perception de la lumière de l'horloge mais de manière mineure.

L'œil de drosophile est composé d'environ 800 ommatidies qui constituent la rétine. Chaque ommatidie est composée de 8 cellules photoréceptrices (R1 à R8) qui projettent vers le cerveau central. Chaque cellule photoréceptrice est sensible à une longueur d'onde définie par le type de rhodopsine qu'elle exprime. Les rhodopsines sont responsables de la photoréception via leur activation par la lumière. La cascade de phototransduction par les rhodopsines passe par la phospholipase C NorpA (No receptor potential A). Il a été montré que chez les mutants *norpA*, les ocelles et l'œil composé ne répondent plus à la lumière et

ne propagent donc plus les signaux lumineux (Pearn et al., 1996). Cependant, ce mutant reste entrainable par la lumière, tout comme le mutant *cry^b* (Stanewsky et al., 1998). Le double mutant *cry^b, norpA* reste entrainable dans certaines conditions, suggérant l'existence d'une voie *norpA* indépendante. Ce résultat montre l'implication de l'œil et des ocelles à la photoréception circadienne.

En ce qui concerne l'eyelet de Hofbauer-Buchner, il s'agit d'une structure photoréceptrice extrarétinienne localisée entre la rétine et la lamina. Elles projettent vers la Medulla accessoire dont leur terminaison sont proches des LNV (Hofbauer and Buchner, 1989 ; Helfrich-Förster et al., 2002 ; Malpel et al., 2002).

Glass est un facteur de transcription nécessaire au développement des cellules photoréceptrices (Moses et al., 1989). Un mutant de ce gène ne possède donc plus ni d'ocelles, ni de cellules photoréceptrices de la rétine. Il a été montré que le mutant *gl^{60j}* ne présentait pas non plus d'eyelet de Hofbauer-Buchner (Helfrich-Förster et al., 2001). Les mutants *cry^b* et *gl^{60j}* sont entrainables en cycle LD et s'adaptent à un nouveau cycle avec plus ou moins de difficultés. Cependant, le double mutant n'est plus entrainable en cycle LD. L'analyse des oscillations de PER et TIM dans les neurones montre des oscillations dans les LNs chez les mutants *cry^b* et *gl^{60j}*. Cependant, il n'y a plus d'oscillations dans ces neurones chez le double mutant. Au vu de ces résultats, l'horloge est bien aveugle chez ce mutant et on peut en conclure que la photoréception circadienne passe par plusieurs structures : le système visuel et le cryptochrome.

C – L'horloge larvaire chez *Drosophila melanogaster*

Dès le stade larvaire, la drosophile possède une horloge fonctionnelle. On peut cependant souligner que cette horloge est simplifiée en comparaison de l'horloge adulte. En effet, seulement trois groupes de neurones sont présents chez la larve en comparaison des 6 groupes de neurones adulte. Chez la larve, on trouve donc 5 neurones latéraux ventraux (LNV) et 4 neurones dorsaux (DN), eux-mêmes divisés en DN1 et DN2 selon leur position dans le cerveau (Fig. 21).

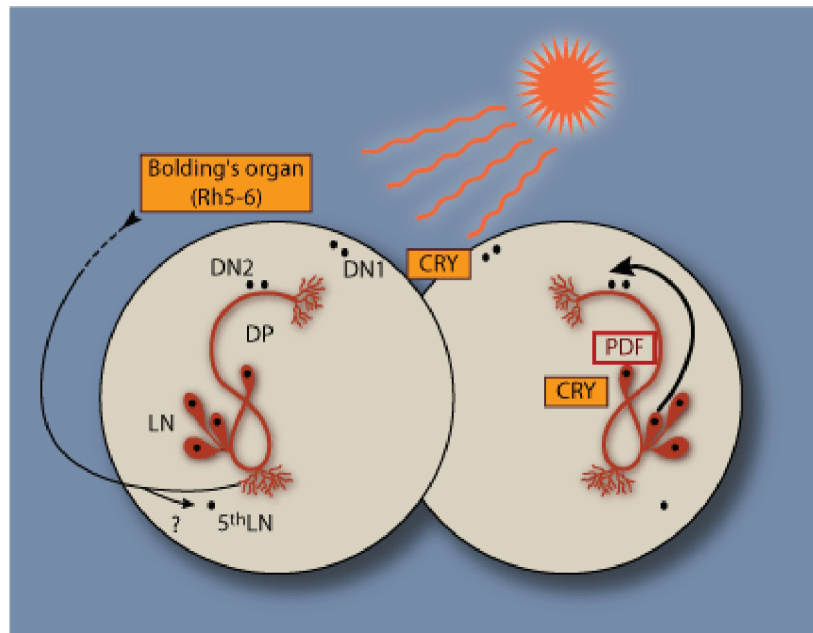


Figure 21 : Les neurones d'horloge et les projections des LNvs dans le cerveau d'une larve de drosophile. Les structures pour la perception de la lumière sont également représentées (Organe de Bolwig et CRYPTOCHROME).

En ce qui concerne les LNvs, ce sont les précurseurs des s-LNvs chez l'adulte. Comme chez l'adulte, seulement 4 de ces neurones expriment le neuropeptide PDF (Pigment Dispersing Factor) (Kaneko et al., 1997). Il y a 2 DN2, comme chez l'adulte, et seulement 2 DN1 qui deviendront les DN1a chez l'adulte.

L'horloge moléculaire chez la larve repose également sur les oscillations des protéines PER et TIM. Cependant, tous les neurones n'oscillent pas en phase comme chez l'adulte. Il a été montré que les oscillations de PER et TIM dans les DN2 sont en antiphasse des autres neurones (Kaneko et al., 1997).

La perception de la lumière permet également à l'horloge larvaire d'être synchronisée. La perception de la lumière se fait via deux structures : l'organe de Bolwig (Green et al., 1993) et le Cryptochrome. L'organe de Bolwig est le précurseur de l'eyelet de Hofbauer-Buchner (Helfrich-Förster et al., 2002) et projette dans le cerveau au niveau des LNv PDF+ (Malpel et al., 2002). En ce qui concerne le cryptochrome, il est exprimé dans tous les neurones d'horloge larvaire excepté le 5^{ème} s-LNv et les DN2 (Klarsfeld et al., 2004).

D – Le Noyau Suprachiasmatique (NSC) des mammifères

Chez les mammifères, l'horloge centrale est située dans le noyau suprachiasmatique (NSC). Le NSC est localisé dans l'hypothalamus, sous le chiasma optique, et se compose de deux noyaux : le cœur ventro-latéral et l'enveloppe dorso-médiane. Chez la souris, chaque noyau contient environ 10000 neurones. Ces noyaux sont positionnés de façon à pouvoir recevoir l'information lumineuse, de la rétine au NSC, des cycles LD (Light-Dark). Cette perception se fera de manière directe ou indirecte (Reppert and Weaver, 2001). Ces deux noyaux diffèrent par leur innervation et par le type de cellules qui les composent. Le cœur est composé de plusieurs types cellulaires exprimant différents neuropeptides. Parmi ceux-ci, on trouve des cellules exprimant le Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP), le Gastrin-releasing Peptide (GRP) ou bien encore la Calbindin (CalB). Le cœur reçoit une innervation rétinienne directe et exprime des gènes tels que *c-fos*, *Per1* et *Per2* en réponse à des pulses de lumière. En ce qui concerne l'enveloppe, les cellules la composant n'expriment qu'un seul neuropeptide, la vasopressine (VP). L'enveloppe est faible en innervation rétinienne, et ne reçoit donc pas beaucoup d'information lumineuse directe (Fig. 22 : gauche).

Dans le SCN, la rythmicité des cellules est générée de manières différentes. Les cellules de l'enveloppe ont une rythmicité maintenue de manière autonome (en jaune). Du fait de la faible innervation rétinienne de cette région, ces cellules ne réagissent pas directement à la lumière des nouveaux cycles LD et vont donc mettre du temps à se recalibrer sur les nouveaux cycles LD. En ce qui concerne le cœur, il y a des cellules qui perçoivent directement la lumière (en grise) et se recalent donc rapidement sur de nouveaux cycles LD. Ces cellules permettent également de synchroniser les cellules de l'enveloppe à ces nouveaux cycles. On retrouve deux autres populations de cellules dans le cœur : des cellules qui expriment les gènes *period* en antiphase (en bleu) et des cellules qui expriment *per* en réponse à l'expression du neuropeptide GRP (en vert) (Fig. 22 : droit)

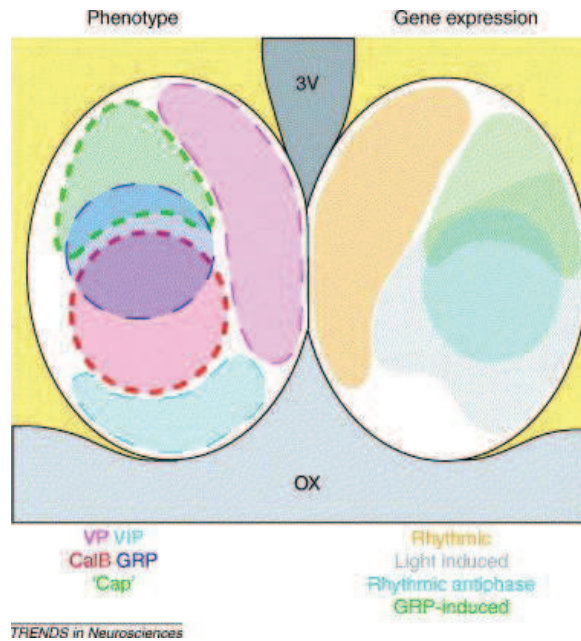


Figure 22: Organisation des différentes populations de cellules dans les noyaux suprachiasmatiques du Hamster. Le noyau gauche décrit les sous-populations de cellules exprimant différentes molécules (VP, GRP, CalB ou VIP). Le noyau droit représente les différentes régions définies par les oscillations des gènes *period* (indiquées sous le schéma). (Antle et Silver, 2005).

V – Comparaison horloge et autres systèmes

L'étude du vivant et de ses mécanismes a permis de montrer l'existence de nombreuses similarités entre certaines voies de signalisation, que ce soit au sein d'un même organisme ou bien entre les espèces. En effet, on peut retrouver, dans deux processus, les mêmes gènes impliqués et jouant des fonctions similaires. On peut par exemple voir les mêmes kinases et phosphatases qui régulent la stabilité de protéines différentes, conduisant à leur dégradation via les mêmes complexes d'ubiquitination (notamment les E3 ubiquitine ligases). Les voies de signalisation Wnt/ Wingless et Hedgehog sont des mécanismes qui ne dérogent pas à cette règle et qui présentent certaines similarités avec la régulation de l'horloge.

A – Voie de signalisation Wnt/Wingless

La voie de signalisation Wnt/Wingless est impliquée dans de nombreux processus à la fois aux niveaux embryonnaires et adultes. Elle est notamment impliquée dans la prolifération cellulaire ou bien la détermination du devenir cellulaire.

L'activation de cette voie se fait par l'interaction des ligands avec les récepteurs Frizzled. Ce mécanisme est très conservé chez les mammifères et la drosophile. La stimulation des récepteurs Frizzled par le ligand Wnt/Wg induit l'activation de CKI ϵ (homologue de la kinase DBT de drosophile) qui va phosphoryler Dishevelled (Dsh). Dsh va pouvoir ainsi séquestrer GSK3 β (SGG chez la drosophile) et diminuer son activité, ce qui va permettre à la β -caténine (homologue d'Armadillo de drosophile) d'être stabilisée et de ne pas être ubiquitinylée (Xu et al., 2009). La β -caténine va ainsi s'accumuler dans le cytoplasme puis être relocalisée au noyau pour réguler la transcription de ses gènes cibles. En absence de signaux Wnt, la β -caténine cytoplasmique est conservée en faible quantité par un complexe de dégradation composé du suppresseur de tumeur Axin, de la protéine APC (Adenomatous Polyposis Coli), de la kinase GSK3 β et de la phosphatase PP2A. La β -caténine est alors phosphorylée par CKI α et GSK3 β (Angers et al., 2006 ; Price et al., 2006) et est ensuite adressée au protéasome par l'E3 ubiquitine ligase SCF ^{β -TrCP} (β -TrCP étant

l'homologue de Slmb chez les mammifères) où elle sera dégradée (Latres et al., 1999) (Fig. 23).

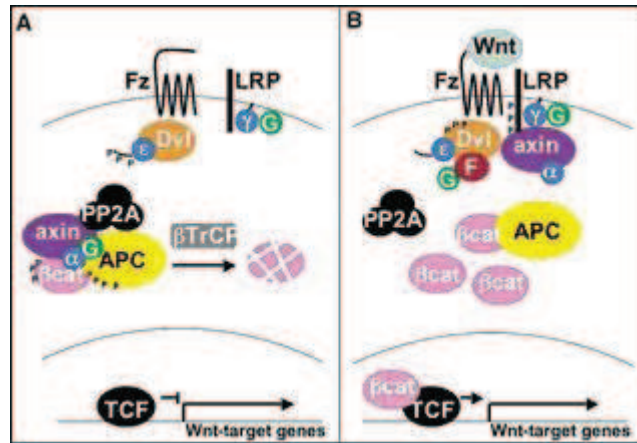


Figure 23 : Modèle de la signalisation Wnt (Price et al., 2006)

En absence de signaux Wnt, la β -caténine est poly-ubiquitinylée et dégradée via $SCF^{\beta-TrCP}$. La dégradation requiert axin, APC et les kinases $CKI\alpha$ et $GSK3\beta$ (A). La liaison de Wnt sur les récepteurs Frz active $CKI\epsilon$ qui va phosphoryler Dishevelled (Dvl). $GSK3\beta$ est ensuite inhibé, ce qui conduit à la stabilisation de la β -caténine, puis à sa translocation dans le noyau (A').

Dsh est au coeur de cette voie de signalisation puisqu'elle induit ou non la dégradation de l'effecteur principal de cette voie : β -caténine / Armadillo. Afin de mieux comprendre la régulation de cette protéine, les protéines interagissant avec Dsh ont été recherchées en utilisant le système de purification TAP-TAG dans des cellules humaines. Les protéines interagissant avec Dsh ont ensuite été identifiées par spectroscopie de masse (Angers et al., 2006). Les protéines trouvées en plus forte abondance sont la Cullin-3 et KLHL12, une protéine à domaine BTB. Il a ensuite été montré que Cul-3 et KLHL12 interagissent ensemble de manière constitutive et que KLHL12 interagit avec Dsh en réponse à un signal Wnt. Cette interaction conduit à l'ubiquitination de Dsh et à sa dégradation par le protéasome.

Cette voie de signalisation est donc contrôlée à deux niveaux par la voie ubiquitine protéasome. D'une part, la β -caténine (Armadillo) est dégradée via $SCF^{\beta-TrCP}$ (SCF^{Slmb}) en

absence de signaux Wnt et d'autre part, l'activateur de la β -caténine, Dsh, est régulée par Cul-3^{KLHL12}.

On retrouve donc plusieurs similarités entre cette voie et l'horloge. En effet, PER est phosphorylé par DBT, conduisant à sa dégradation via SCF^{Slimb}, et cette dégradation est contrebalancée par PP2A. D'autre part, Dsh est activé par DBT, ce qui entraîne également sa dégradation par Cul-3^{KLHL12}. L'horloge est régulée finement et à différents niveaux. On pourrait donc penser qu'une régulation par la Cul-3 pourrait également être conservée dans l'horloge.

B – Voie de signalisation Hedgehog

La voie Hedgehog est un processus très conservé de la drosophile aux mammifères. Ce processus est principalement important pour réguler des processus développementaux, notamment le devenir cellulaire, la polarité segmentaire ou encore le patterning embryonnaire. Les cibles principales de cette voie sont les cellules progénitrices.

L'activation de cette voie se fait par l'interaction des ligands avec le récepteur transmembranaire Patched (Ptc). De cette interaction résulte le relargage de signaux Smoothened qui activent les facteurs de transcription de la famille Gli. Le contrôle de l'expression des gènes cibles de cette voie de signalisation se fait par la régulation de l'activité de ces facteurs de transcription. Ce contrôle fait notamment intervenir la voie ubiquitine protéasome.

Chez la drosophile, le facteur de transcription *Cubitus interruptus* (Ci) est un homologue de Gli des mammifères. La régulation de l'activité de Ci est au cœur de la signalisation Hedgehog (HH). La régulation de Ci a été bien décrite dans le développement de l'œil de drosophile, c'est-à-dire dans les disques imaginaux. Il faut signaler que dans les disques imaginaux, le signal HH est uniquement sécrété en position postérieure au sillon morphogénétique (c'est-à-dire dans les cellules différenciées). Il a été montré qu'en position antérieure au sillon, il n'y a donc pas de signal HH, ce qui conduit à l'inhibition de Smoothened par le récepteur Patched. Dans ces conditions, la forme longue de Ci (Ci^{FL}) est phosphorylée par diverses kinases : CKI α , puis GSK3 β (SGG) et enfin PKA (Price et al., 2002 ;

Jia et al., 2005). La phosphorylation de Ci^{FL} induit son adressage au protéasome par l'ubiquitine ligase SCF^{Smb} (Jiang et al., 1998), conduisant à son clivage protéolytique en une forme tronquée : Ci^{75} . Cette forme a une fonction transcriptionnelle répressive et empêche donc l'activation des cibles de la voie Hedgehog.

Au niveau du sillon morphogénétique, le signal HH secrété en position postérieure se lie au récepteur Ptc, conduisant à l'accumulation de Ci^{FL} . Ci^{FL} ne s'accumule ni en position antérieure (clivé en Ci^{75} par SCF^{Smb}), ni en position postérieure (malgré les signaux HH). Smb ne contrôlant l'activité de Ci qu'en position antérieure, un autre mécanisme doit contrôler la stabilité de Ci en position postérieure. En 2002 et 2004, il a été montré que des mutations de la *culline-3* conduisaient à une accumulation de Ci^{FL} en position postérieure au sillon (Ou et al., 2002 ; Mistry et al., 2004). Le contrôle de la stabilité de Ci dans cette zone se ferait donc par un nouveau complexe : un complexe Cul-3. De plus, Cul-3 semble induire la dégradation de Ci^{FL} non phosphorylé (Ou et al., 2002), contrairement à Smb qui induit le clivage de Ci^{FL} phosphorylé (Fig. 24)

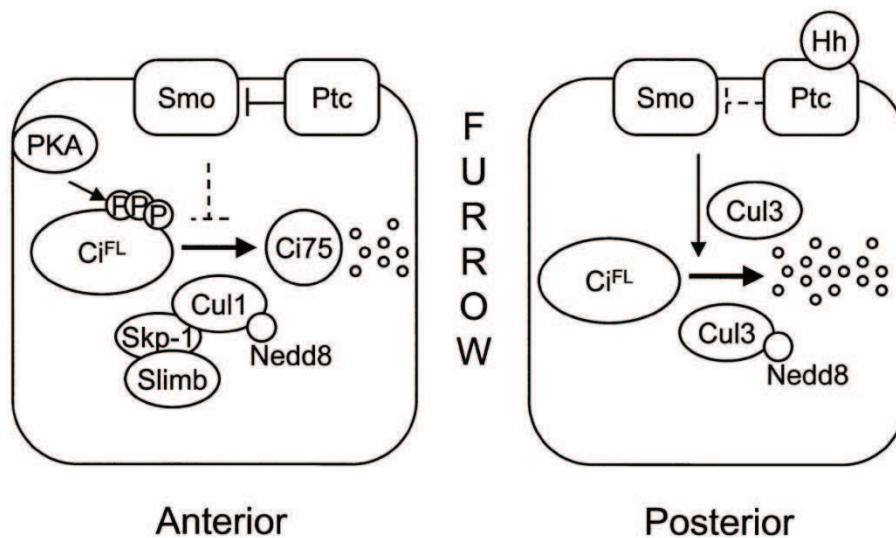


Figure 24 : Modèle de la dégradation de Ci (Ou et al., 2002)

En position antérieure du sillon morphogénétique, Patched (Ptc) inhibe Smoothened (Smo). Ci^{FL} est alors phosphorylé par CK1 α , GSK3 β et PKA, conduisant à son clivage via SCF^{Smb} . En position postérieure, Hh inhibe Ptc, ce qui conduit à l'accumulation de Ci^{FL} qui est dégradé par un complexe Cul-3.

Dans 2 papiers de 2006, la protéine à domaine BTB impliquée dans la régulation de Ci par un complexe Cul-3 pourrait avoir été identifiée. En effet, il a été montré que la perte de fonction de *roadkill* (*rdx*) induit une augmentation de la quantité de Ci^{FL} en position postérieure au sillon. D'autre part, l'immunoprécipitation de *Rdx*, grâce à la construction *rdx-MYC*, a permis de montrer une interaction entre *Rdx* et Ci^{FL} et non Ci⁷⁵ (Kent et al., 2006). Dans une autre étude (Zhang et al., 2006), la dérégulation de *rdx* par RNAi (nommé HIB dans cette étude) conduit également à une accumulation de Ci^{FL} en position postérieure. D'autre part, ils ont montré, en culture de cellules, que Cul-3 interagit avec HIB et entraîne l'ubiquitination et la dégradation de Ci^{FL} par le protéasome.

La régulation de l'activité de Ci fait donc intervenir un complexe Cul-1 et un complexe Cul-3. En absence de signaux Hedgehog, Ci^{FL} est phosphorylé puis clivé en sa forme répressive, Ci⁷⁵, par SCF^{Slimb}. En présence de HH, Ci^{FL} est activé et permet la transcription de ses gènes cibles. L'activité de cette forme est alors régulée par Cul-3^{Rdx} qui induit sa dégradation par le protéasome (Fig. 25).

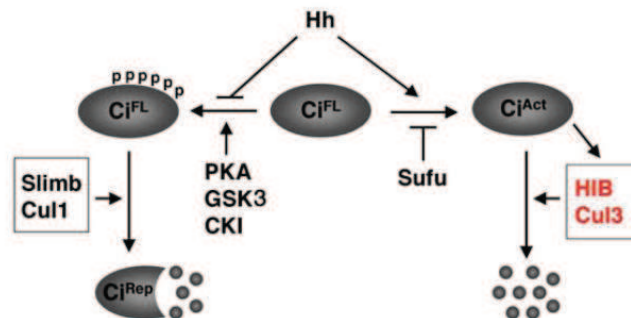


Figure 25 : Modèle de la régulation de Ci par Cul-1 et Cul-3 (Zhang et al., 2006)

En absence de signaux Hh, Ci^{FL} est phosphorylé par PKA, CKI et GSK3, conduisant à son clivage par SCF^{Slimb}. En présence de signaux Hh, Ci^{FL} est activé en Ci^{Act}. Ci^{Act} active les gènes cibles de la voie HH ainsi que HIB (Rdx). Ci^{Act} non phosphorylé est alors ubiquitinylé et dégradé via Cul-3^{HIB}.

La régulation de la voie Hedgehog et celle de l'horloge circadienne présentent plusieurs similarités. La stabilité de protéines centrales à leur fonctionnement (PER, TIM, Ci) est régulée par des acteurs communs aux deux systèmes. En effet, PER et Ci^{FL} sont phosphorylées toutes les deux par CKI (DBT), conduisant à leur dégradation par le protéasome via l'ubiquitine ligase SCF^{Slmb}. La phosphorylation de Ci^{FL} par CKI n'est pas suffisante pour induire sa dégradation et requiert également les kinases SGG et PKA. SGG est également impliqué dans la régulation de l'horloge mais à un autre niveau, en régulant la localisation subcellulaire de TIM.

On retrouve donc des acteurs communs et des processus conservés entre les deux systèmes. Dans l'horloge, PER et TIM sont régulés par Slmb et Jetlag mais la stabilité de ces protéines semble être également contrôlée à un autre niveau. On peut donc se demander si la voie Hedgehog et l'horloge ne pourraient pas partager un autre mécanisme comme la régulation de PER et TIM par un complexe Cul-3.

VI – Objectif de la thèse

Les oscillations des protéines PER et TIM sont au cœur de l'horloge. La régulation fine de ces oscillations est indispensable au bon fonctionnement de l'horloge et à la génération d'une période de 24 heures. Pour générer ces oscillations, la dégradation de ces protéines est un processus majeur de leur régulation. Dans ce système, il a déjà été montré que certaines phosphorylations de ces protéines conduisaient à leur dégradation par le protéasome via différentes E3 ubiquitine ligase de type SCF. La protéine Slmb contrôle la dégradation principalement de PER mais également de TIM. En ce qui concerne TIM, elle est dégradée via Jetlag et le signalosome dans des conditions dépendantes de la lumière. Cependant, Slmb et Jetlag ne semblent pas réguler tous les aspects du contrôle de la stabilité de PER et TIM.

Dans d'autres processus biologiques telles que les voies de signalisation Wnt et Hedgehog, on retrouve de nombreux points communs avec ce que l'on connaît de la régulation de l'horloge. On retrouve notamment différentes kinases et phosphatases ainsi que l'E3 ubiquitine ligase SCF^{Slmb}. Dans ces deux voies, on retrouve également l'implication d'un autre complexe d'ubiquitination : le complexe Cul-3. Ce complexe participe à la régulation des composants de ces voies en parallèle avec Slmb.

Au vu de ces connaissances, nous avons regardé si la *cullin-3* pouvait également participer à la régulation de ces protéines. La dérégulation de ce gène dans les neurones d'horloge conduisait à une perte de rythmicité des mouches et montrait donc une implication de ce gène. Nous avons donc voulu, d'une part, caractériser le rôle de la *cullin-3* dans l'horloge, et d'autre part déterminer le composant du complexe Cul-3 qui lui confère sa spécificité dans l'horloge : la protéine à domaine BTB.

RESULTATS

RESULTATS

I - SOUCHES DE DROSOPHILES UTILISEES

Mutants	Type de mutation	Référence
<i>w10</i>	Mutation nulle de <i>white</i>	
<i>gft</i> ³¹⁶⁰	Mutation nulle de <i>culline-3</i>	Flybase
<i>gft</i> ^{B1-3}	EMS : non caractérisé	Chien, C.T. (non publié)
<i>gft</i> ^{B3-2}	EMS : non caractérisé	Chien, C.T. (non publié)
<i>per</i> ⁰	Mutation nulle de <i>period</i>	Konopka and Benzer, 1971
<i>tim</i> ⁰	Mutation nulle de <i>timeless</i>	Sehgal et al, 1994
<i>kelch</i> ^{DE1}	Mutation nulle de <i>kelch</i>	Xue and Cooley, 1993
<i>slimb</i> ⁸	Mutation nulle de <i>slimb</i>	Miletich and Limbourg-Bouchon, 2000
<i>tim</i> ^{Δ260-292}	Délétion des aa 260 à 292 du gène <i>timeless</i>	Ousley et al, 1998
<i>cry</i> ^b	Mutation hypomorphe du <i>cryptochrome</i>	Stanewsky et al., 1998
<i>jet</i> ^c	Mutation hypomorphe de <i>jetlag</i>	Peschel et al, 2006

Pilotes d'expression	Domaine d'expression	Référence
<i>tim-gal4</i>	Tous les neurones d'horloge	Kaneko et al., 1998
<i>pdf-gal4</i>	LN PDF+	Renn et al., 1999
<i>gal1118</i>	LN PDF+, LNd CRY-	Blanchardon et al, 2001
<i>cry-gal4-39</i>	Tous les neurones d'horloge	Klarsfeld et al., 2004

Lignées UAS	Gène exprimé	Référence
<i>UAS-cul-3-flag</i>	<i>cul-3</i> , étiqueté FLAG	Wu et al., 2005
<i>UAS-cul-3</i> ^{K717R}	Forme dominant-négative de <i>cul-3</i>	Zhu et al., 2005
<i>UAS-cul-3</i> ^{ΔC}	Forme dominant-négative de <i>cul-3</i>	Mistry et al., 2004
<i>UAS-RNAi-cul-3</i>	Séquences RNAi dirigés contre <i>cul-3</i>	NIG-FLY
<i>UAS-FLAG-slimb</i>	<i>slimb</i> , étiqueté FLAG	Article
<i>UAS-RNAi-lola</i>	Séquences RNAi dirigés contre <i>lola</i>	VDRC
<i>UAS-RNAi-lola</i>	Séquences RNAi dirigés contre <i>lola</i>	VDRC
<i>UAS-RNAi-CG3571</i> (43777)	Séquences RNAi dirigés contre <i>CG3571</i>	VDRC
<i>UAS-RNAi-CG3571</i> (43778)	Séquences RNAi dirigés contre <i>CG3571</i>	VDRC
<i>UAS-RNAi-CG3571R1</i>	Séquences RNAi dirigés contre <i>CG3571</i>	NIG-FLY
<i>UAS-RNAi-CG3571R4</i>	Séquences RNAi dirigés contre <i>CG3571</i>	NIG-FLY
<i>UAS-3571-FLAG</i>	<i>CG3571</i> , étiqueté FLAG	Fujiyama-Nakamura et al., 2009

II – ARTICLE

RESUME

Dans cet article, nous montrons l'implication d'une nouvelle E3 ubiquitine ligase dans la régulation de l'horloge circadienne. Il s'agit d'un complexe multimérique organisé autour de la Cullin-3 et faisant partie de la famille des RING E3 ubiquitine ligase.

Dans un premier temps, nous avons montré que la dérégulation de la *cullin-3*, spécifiquement dans les neurones d'horloge, engendrait une perte de rythmicité des mouches en obscurité constante (DD), que ce soit en utilisant un RNAi ou des formes dominant-négatives de la *cullin-3*.

Afin d'étudier le rôle de la *cullin-3* dans l'horloge, nous avons ensuite regardé si les protéines d'horloge PER et TIM étaient affectées par la dérégulation de ce gène. Dans les neurones responsables de la rythmicité en DD, les s-LNvs, les oscillations de TIM sont plus affectées que celles de PER, avec un amortissement pour PER et la quasi abolition de celles de TIM. L'analyse moléculaire de PER et TIM a montré que Cul-3 agissait post-traductionnellement sur ces protéines et que son inhibition induisait une persistance de formes phosphorylées de TIM et plus modestement de PER. D'autre part, nous avons montré que l'effet sur TIM était indépendant de PER.

Sachant que les protéines PER et TIM sont stabilisées en absence de Slmb, nous avons regardé les effets combinés de la dérégulation de *cul-3* et de *slmb*. Nous avons ainsi observé que Cul-1-Slmb a un effet plus important sur PER de façon TIM indépendante alors que Cul-3 a un effet plus important sur TIM de façon PER indépendante.

En dernier point, nous avons pu observer une interaction entre Cul-3 et TIM qui est augmentée en contexte *per⁰*. Cul-3 interagit d'ailleurs avec les formes hypophosphorylées de TIM, contrairement à Slmb.

Conclusions :

- La *cullin-3* contrôle les rythmes d'activité de la Drosophile.
- La dérégulation de la *cullin-3* induit une accumulation de formes phosphorylées de TIM.
- La fonction de Cul-3 sur TIM est indépendante de PER, contrairement à celle de Cul-1-Slmb sur TIM qui dépend de PER.
- Cullin-3 interagit avec des formes hypophosphorylées de TIM alors que Slmb interagit avec des formes de TIM phosphorylées.

⇒ Cullin-3 pourrait donc contrôler l'accumulation des formes phosphorylées de TIM pendant la nuit, alors que Slmb contrôle la dégradation de TIM en fin de nuit.

A CULLIN-3 ubiquitination complex controls TIMELESS degradation in the *Drosophila* circadian clock

Brigitte Grima¹, Alexandre Dognon¹, Annie Lamouroux, Elisabeth Chélot and François Rouyer

Institut de Neurobiologie Alfred Fessard, CNRS UPR 3294, 91198 Gif-sur-Yvette, France

¹ These authors contributed equally to this work

Running title: Circadian role of CULLIN-3

Total characters:

Correspondence should be addressed to:

François Rouyer

Email: rouyer@inaf.cnrs-gif.fr

Tel: 33 1 69 82 34 36 Fax: 33 1 69 82 41 78

Summary

In *Drosophila*, the control of PERIOD (PER) and TIMELESS (TIM) protein oscillations largely depends on post-translational mechanisms. They involve both light-independent and light-dependent pathways that rely on the phosphorylation, ubiquitination and proteasomal degradation of the clock proteins. The F-box-containing E3 ubiquitin ligase SLMB is required for the circadian degradation of PER and TIM. We show here that this circadian degradation also depends on the CULLIN-3 (CUL-3) ubiquitin ligase. Deregulation of CUL-3 induces behavioral arrhythmicity and abolishes TIM cycling in constant darkness but not in light-dark cycles. CUL-3 does not require PER to control TIM but has very little effect on PER in the absence of TIM. Moreover, CUL-3 forms protein complexes with hypophosphorylated TIM whereas SLMB associates with phosphorylated TIM. Our results support a model where CUL-3 controls the night accumulation of phosphorylated TIM whereas SLMB controls the late night degradation of the protein.

Introduction

Circadian clocks are present in most living organisms and control a variety of physiological and behavioral functions. Eukaryotic clocks stem from a transcriptional negative feedback loop where activators induce the expression of repressors, which then inhibit the activators (Bell-Pedersen et al., 2005). The accumulation of the repressor proteins is delayed by post-translational mechanisms, allowing to define active and inactive phases of transcription, hence an oscillation. In *Drosophila*, the two basic helix-loop-helix PER-ARNT-SIM (bHLH PAS) proteins CLOCK (CLK) and CYCLE (CYC) activate the transcription of their targets in the evening (Weber, 2009; Allada and Chung, 2010). The target genes *period* (*per*) and *timeless* (*tim*) encode two proteins that associate in a complex, progressively accumulate and become phosphorylated, to repress CLK/CYC -dependent transcription in the late night. The delayed accumulation, nuclear entry and transcriptional activity of PER and TIM involve their phosphorylation by several kinases such as DOUBLE TIME (DBT) CK1 ϵ (Kloss et al., 1998; Price et al., 1998; Kloss et al., 2001; Nawathean and Rosbash, 2004; Kim et al., 2007; Nawathean et al., 2007; Muskus et al., 2007) that targets PER. The CK2 casein kinase (Akten et al., 2003; Lin et al., 2002; Meissner et al., 2008) and SHAGGY (SGG) GSK3 (Martinek et al., 2001) rather target TIM. The phosphorylation of PER and TIM are also regulated by the phosphatases PP2A (Sathyanarayanan et al., 2004) and PP1 (Fang et al., 2007), respectively. Nuclear phosphorylated PER induces CLK phosphorylation and removal from the chromatin, then PER degradation in the morning allows CLK-CYC –dependent transcription to resume (Kim and Edery, 2006; Yu et al., 2006; Yu et al., 2009; Menet et al., 2010).

The pace of the oscillation depends largely on the speed of PER/TIM accumulation during the early night and the one of their degradation in the late night. The stability of

phosphorylated PER and TIM is controlled by the SUPERNUMERARY LIMBS (SLMB) E3 ubiquitin ligase, (Grima et al., 2002; Ko et al., 2002). For PER, the phosphorylation of a few serine residues around S47 by DBT cooperatively increases SLMB binding to PER and subsequent PER degradation (Chiu et al., 2008). Both S47 phosphorylation and direct SLMB-binding occur at the end of the night, suggesting that SLMB controls nuclear PER at the end of the cycle (Chiu et al., 2008). DBT has been proposed to also induce cytoplasmic PER degradation in the absence of TIM and thus control the delayed accumulation of PER (Kloss et al., 2001; Kloss et al., 1998). This model predicts that the control of cytoplasmic PER stability depends on TIM accumulation. The evidence for SLMB participating in TIM degradation (Grima et al., 2002) suggests that phosphorylation may play a major role in the control of TIM stability. CK2 activity has been suggested to destabilize TIM (Meissner et al., 2008), whereas PP1 appears to favor TIM stabilization (Fang et al., 2007), but how SLMB-controlled TIM degradation is regulated is not known.

In addition to SLMB that controls the circadian oscillations of TIM, the JETLAG (JET) E3 ligase targets TIM and CRYPTOCHROME (CRY) for the light-induced proteasome-dependent protein degradation that participates to the resetting of the clock (Koh et al., 2006; Peschel et al., 2006; Peschel et al., 2009). The JET-dependent degradation, but not the SLMB-dependent one, appears to be regulated by the COP9 signalosome (Knowles et al., 2009). SLMB and JET are parts of CULLIN-1-based SCF complexes, that belong to the RING family of E3 ubiquitin ligases (Nakayama and Nakayama, 2005). SLMB plays a major role in CUBITUS INTERRUPTUS (CI) proteolysis, which generates the repressor form of the CI transcription factor in the absence of HEDGEHOG (HH) signaling (Jiang and Struhl, 1998; Jiang and Struhl, 1998). In addition to SLMB, other components of the HH pathway such as CK1, CK2 and SGG are shared with the circadian oscillator (Hooper and Scott, 2005). Another ubiquitin

complex, based on CULLIN-3 has been shown to participate to the proteolytic regulation of CI (Ou et al., 2002; Jiang, 2006; Kent et al., 2006; Zhang et al., 2006). Since SLMB alone unlikely regulates all aspects of the circadian control of PER and TIM stability, we asked whether CULLIN-3 complexes may participate to the control of PER and/or TIM oscillations. We show that CUL-3 downregulation induces strong defects of rest-activity rhythms, which result from persisting phosphorylated TIM during the circadian cycle. Indeed, CUL-3 form protein complexes with hypophosphorylated TIM form, which are favored in the absence of PER, suggesting that CUL-3 controls the early night accumulation of TIM. In contrast, SLMB is present in complexes that contain more phosphorylated TIM and are favored by the presence of PER, suggesting a rather later in the control of TIM cycling.

Results

Deregulation of CUL-3 in the clock neurons induces behavioral arrhythmicity

Since *cul-3* mutants are homozygous lethal, we used targeted expression of *cul-3* RNAi to test the possible role of CUL-3 in the control of behavioral rhythms. Expressing *cul-3* RNAi with *tim-gal4* induced lethality, but targeting expression with the more restricted *pdf-gal4* and *cry-gal4* drivers produced perfectly viable flies. In light-dark (LD) cycles, flies expressing *cul-3* RNAi in PDF cells had activity levels similar to controls but they displayed no morning anticipatory activity whereas an evening peak was clearly observed (Figure 1A). After transfer to constant darkness (DD), RNAi flies either became arrhythmic or showed weak rhythms (Table 1 and Figure 1A). To confirm the RNAi results, two transgenes encoding modified inactive forms of CUL-3 were expressed in the clock neurons. CUL-3^{K717R} bears a mutation preventing neddylation of the protein (Zhu et al., 2005), whereas CUL-3^{ΔC} lacks the

conserved C-terminal domain that includes the neddylation site (Mistry et al., 2004). Expression of one or the other inactive protein under the control of a *pdf-gal4* or *cry-gal4* driver did not significantly affect behavior (not shown), but neither morning anticipation in LD nor robust free running rhythms in DD were observed with the *tim-gal4* driver that is strongly expressed in all clock cells (Table 1 and Figure 1B). This indicated that the modified proteins were acting as dominant negative forms to inhibit the circadian function of endogenous CUL-3. RNAi and inactive CUL-3 targeted expression thus revealed that CUL-3 was required in the clock neurons for morning activity in LD and rhythmic behavior in DD. Since *cul-3* mutants affect the axonal growth of the mushroom body neurons (Zhu et al., 2005), we checked the morphology of the cells expressing the *cul-3* RNAi or the inactive CUL-3 proteins. Cells expressing the pigment dispersing factor (PDF) neuropeptide display a well defined pattern of neuronal processes and were thus used to do so. Anti-PDF labeling did not show any detectable morphological defects of the PDF-positive ventral lateral neurons in flies expressing *cul-3* RNAi. Slightly more defasciculated projections were observed for flies expressing CUL-3^{ΔC} (Sup Figure 1) and one or two additional PDF-positive cells were sometime seen in flies expressing either CUL-3^{ΔC} or CUL-3^{K717R} (not shown). The absence of any defect in the RNAi flies indicated that the behavioral phenotype induced by CUL-3 downregulation was not a consequence of a developmental defect.

CUL-3 controls PER and TIM oscillations in the clock neurons

Since the PDF-expressing small ventral lateral neurons (s-LNvs) are the main pacemaker cells for activity rhythms in DD (Grima et al., 2004), they were analyzed for PER and TIM oscillations in *w ; pdf-gal4; UAS-cul-3RNAi* and *w ; tim-gal4 ; UAS-cul-3^{K717R}* (hereafter *tim>cul-3^{K717R}*) flies (Figure 2). In flies expressing *cul-3* RNAi in the PDF cells, PER

cycling was dampened while TIM cycling was barely observed during the second DD day (Figure 2A). TIM also appeared more evenly distributed between nuclear and cytoplasmic compartments in the RNAi flies (Figure 2A). TIM amounts were not very high on western blots of *tim>cul-3^{K717R}* extracts, but they appeared even lower in the PDF-cells. A similar observation was made for highly phosphorylated PER in *slmb^m* mutants (Grima et al., 2002). It may indicate that some of the TIM molecular species that accumulate in *tim>cul-3^{K717R}* flies are abnormal and are not well recognized by the antibody. An even stronger phenotype was observed in *tim>cul-3^{K717R}* flies in the third DD day (Figure 2B), with PER showing weak oscillations and TIM levels staying flat.

CUL-3 acts on PER and TIM post-transcriptionally

PER and TIM oscillations were analyzed in head extracts of *tim>cul-3^{K717R}* flies (Figure 3). In LD cycles, mutant and control flies showed robust PER (not shown) and TIM (Figure 3A) cycling. CUL-3 is thus not required for the degradation of TIM, and subsequently PER, in the presence of light. In DD (Figure 3B), TIM cycling in the mutant was slightly affected at day 1, with a small increase of phosphorylated forms in the late day and early night (CT9-15) compared to controls. This suggested that CUL-3 downregulation increased TIM phosphorylation or stabilized phosphorylated TIM during the early night accumulation of the protein. PER cycling was marginally altered at DD1, but slightly more phosphorylated PER accumulated during the night. At day 2, TIM cycling was abolished in the mutant with both forms of TIM present at all time points at similar levels, supporting a post-translational effect of CUL-3 downregulation. Phosphorylated TIM was observed at levels comparable to its peak levels in the controls, whereas hypophosphorylated TIM was observed at levels lower than its peak levels in the controls, suggesting lower TIM synthesis. In contrast, PER cycling was

still observed at day 2 but it was dampened, with less accumulation of unphosphorylated PER at the beginning of the subjective night (CT33-39) and a concomitant increase of phosphorylated protein. In the absence of light, CUL-3 is thus required for TIM oscillations and for robust PER oscillations. Since PER oscillations were clearly less rapidly affected than TIM oscillations, it suggested that CUL-3 might control TIM more directly than PER.

We then asked how CUL-3 deregulation affected *per* and *tim* mRNA levels. mRNA were quantified in head extracts of *tim>cul-3^{K717R}* and control flies (Figure 4). For both *per* and *tim*, mRNA levels still cycled at day 2 (left panels) in the mutant but peak levels were about 25% lower. At day 3 (right panels), *per* and *tim* mRNA oscillations were more severely dampened with peak levels lowered by about 40%. The decreased mRNA levels provided a likely explanation for the lower accumulation of unphosphorylated PER and TIM proteins at the beginning of the night (see Figure 3). Since *tim* mRNA levels still showed oscillations at DD2 while TIM protein was already flat, it indicated that *cul3* deregulation first affected TIM protein. PER protein and *per* mRNA showed dampened oscillations at DD2 in the flies expressing CUL-3^{K717R}. However, their mRNA increase began to slow down at CT30 when more phosphorylated PER was observed (see Figure 3), suggesting that higher phosphorylated PER levels were responsible for lower mRNA accumulation and subsequent lower PER and TIM synthesis. The data thus supported CUL3 acting at the protein level to control PER and TIM oscillations.

The control of phosphorylated TIM by CUL-3 does not require PER

To understand how CUL-3 controls PER and TIM proteins, we analyzed PER in *tim⁰* *tim>cul-3^{K717R}* flies and TIM in *per⁰* *tim>cul-3^{K717R}* flies (Figure 5). TIM is not required for PER phosphorylation, but highly phosphorylated PER does not accumulate in *tim⁰* mutants (Price

et al., 1995). We observed a very small increase of PER molecular weight in *tim⁰ tim>cul-3^{K717R}* flies compared to *tim⁰* controls, indicating that CUL-3 could slightly affect PER in the absence of TIM (Figure 5A, top). However, highly phosphorylated PER did not accumulate as in a *tim⁺* background (see Figures 3B and 6A), suggesting that CUL-3 has very limited effects on PER in the absence of TIM.

As described previously (Zeng et al., 1996), TIM remained mostly unphosphorylated in *per⁰* flies (Figure 5A, bottom). In contrast, *per⁰ tim>cul-3^{K717R}* flies showed accumulation of phosphorylated TIM, thus indicating that CUL-3 does not require PER to induce destabilization of phosphorylated TIM. This result thus supports TIM as being phosphorylated and degraded in *per⁰* flies. Interestingly, *per⁰ tim>cul-3^{K717R}* flies had a higher phosphorylated/unphosphorylated TIM ratio than *per⁺ tim>cul-3^{K717R}* flies (see Figures 3B and 6A), suggesting that PER somehow interferes with the control of TIM by CUL-3. It has been reported that hypo-phosphorylated TIM is mostly cytoplasmic in *per⁰* flies (Myers et al., 1996). Since CUL-3 downregulation affected TIM in the absence of PER, CUL-3 could act in the cytoplasmic compartment. Indeed, TIM immunolabeling was mainly cytoplasmic in both *per⁰* and *per⁰ tim>cul-3^{K717R}* flies, although some faint nuclear labeling was observed in the mutant (Figure 5B). This supported the hypothesis that CUL-3 is able to control the accumulation of phosphorylated TIM in the cytoplasm.

We then asked whether a *tim* deletion affecting TIM phosphorylation and stability would affect CUL-3 -dependent stabilization. *tim⁰ tim^{Δ260-292}* flies carry a *tim* transgene with a 32 aa deletion in a conserved N-terminal region and thus express a TIM protein that migrates faster than TIM in a *per⁰* background on gel electrophoresis (Ousley et al., 1998). This deletion removes a serine rich region that contains putative phosphorylation sites

(Meissner et al., 2008). No effect of CUL-3 downregulation could be observed in *tim⁰ tim^{Δ260-292}* flies, indicating that this small region of TIM was required for CUL-3 function (Figure 5C).

CUL-3 and SLMB stabilize phosphorylated TIM through different pathways

In DD, both PER and TIM are stabilized in *slmb^m* mutants, which do not have detectable SLMB protein (Grima et al., 2002). We thus asked whether decreasing CUL-3 activity in *slmb^m* mutants would show additional effects on TIM stability. In the presence of both PER and TIM (Figure 6A), *slmb^m* and *tim>cul-3^{K717R}* flies showed a progressive increase of phosphorylated TIM in DD, leading to an equivalent amount of hypophosphorylated and phosphorylated protein at day 2 (CT 33 and 39). However, *slmb^m* mutants showed a slightly higher TIM molecular weight than *tim>cul-3^{K717R}* flies. In the double mutants, a progressive loss of unphosphorylated TIM was observed, leading to a large excess of phosphorylated protein at day 2, migrating similarly to the high molecular weight TIM of *slmb^m* mutants. Different results were observed for PER, with hyperphosphorylated protein accumulating similarly in *slmb^m* and double mutants, whereas only moderately phosphorylated PER accumulated in the *tim>cul-3^{K717R}* flies. This indicated that SLMB and CUL-3 have additive effects on TIM, with *slmb^m* mutants showing stabilization of higher forms of the protein. In contrast, *slmb^m* has a much stronger effect than *cul-3^{K717R}* on PER with no detectable effect of CUL-3 alteration in *slmb^m* mutants. The additive effects of *slmb^m* and *cul-3* mutants on TIM suggested that the two E3 ubiquitin ligases control TIM degradation through different pathways.

To better understand the respective roles of SLMB and CUL-3, we compared the effects of the two mutants on PER and TIM in *tim⁰* and *per⁰* backgrounds, respectively. As in a *tim⁺* background, *tim⁰ tim>cul-3^{K717R}* flies showed a very small increase of PER

phosphorylation (Figure 6B). In contrast, *slmb^m* (see also (Grima et al., 2002)) and double mutants accumulated large amounts of highly phosphorylated PER when associated with a *tim⁰* mutation. The absence of TIM thus did not change the small effect of CUL-3 downregulation on PER, whereas it strongly increased the effect of *slmb^m* mutants on PER. In the absence of PER, *slmb^m* mutants had similar amounts of phosphorylated and hypophosphorylated TIM (Figure 6C). However, *per⁰ tim>cul-3^{K717R}* and *per⁰ slmb^m tim>cul-3^{K717R}* mutants showed more accumulation of phosphorylated TIM than *per⁰ slmb^m* flies. TIM was thus less affected in *tim>cul-3^{K717R}* flies in a *per⁺* background than in a *per⁰* background, indicating that the absence of PER increases the effect of CUL-3 deregulation on TIM. We conclude that CUL-3-controlled TIM degradation is partly inhibited by PER whereas SLMB-controlled TIM degradation is not.

Different forms of TIM make complexes with CUL-3 and SLMB

Since TIM appears to be the main target of CUL-3, we asked whether the two proteins could be co-immunoprecipitated from head extracts of flies expressing a tagged version of CUL-3. A BTB-domain protein is likely to provide the substrate-binding component of the CUL-3 complex and indirect, thus rather weak, interactions were expected. We generated *tim>cul-3-flag* flies in a heterozygous *cul-3* mutant background to reduce competition between endogenous and tagged CUL-3 proteins for immunoprecipitation assays. Anti-FLAG immunoprecipitated extracts from such flies showed a faint TIM band that corresponded to hypophosphorylated TIM (Figure 7A, left). Since CUL-3 effect on TIM was higher in the absence of PER, a *per⁰* background would be expected to favor TIM-CUL-3 interactions. Indeed, a stronger TIM band was detected in *per⁰* flies, with TIM amount being further increased in heterozygous *cul-3* mutants compared to *cul-3⁺* flies (Figure 7A, right).

The results thus indicated that CUL-3 and hypophosphorylated TIM associate in complexes that are more abundant in the absence of PER. We then compared the properties of TIM/CUL-3 complexes and TIM/SLMB complexes. Immunoprecipitation of tagged SLMB was done in *slmb^m* flies where tagged SLMB was expressed under *tim-gal4* control, to reduce competition between FLAG-SLMB and the endogenous protein. SLMB co-immunoprecipitated more phosphorylated TIM than hypo-phosphorylated TIM in *per⁺* flies, but also co-immunoprecipitated hypo-phosphorylated TIM in a *per⁰* background (Figure 7B, left). However, the amount of TIM/SLMB complexes did not increase in *per⁰* flies, where much higher levels of TIM are observed (Figure 7B, right). This indicated that, in contrast to TIM/CUL-3 complexes, TIM/SLMB complexes mostly involve phosphorylated TIM. These complexes are favored in the presence of PER, suggesting that they involve PER-bound TIM.

Discussion

The control of PER and TIM oscillations in the *Drosophila* clock relies for a large part on post-translational modifications of the two proteins. PER stability depends on the SLMB-containing SCF ubiquitin ligase complex and requires PER phosphorylation by DBT. Although TIM stops cycling in *slmb^m* mutants, the circadian control of TIM stability is not understood. We have shown here that in addition to SLMB, CUL-3-based ubiquitin ligase complexes play a major role in the control of TIM cycling. The results show that SLMB and CUL-3 control the stability of phosphorylated TIM independently and support a different interaction of PER with the two TIM degradation pathways.

Although light-induced degradation of TIM appears unaffected in head extracts of flies with downregulated CUL-3, they display a morning anticipation defect in LD. PER and TIM are also very likely to show at least some cycling in the s-LNvs that control morning

activity, as inferred from persisting oscillations at DD2 in these cells in *pdf>cul-3RNAi* flies. A simple explanation could be that deficient protein degradation might induce the accumulation of abnormally phosphorylated forms of PER and/or TIM that are functionally crippled although their levels still oscillate. The presence of an evening peak in both *cul-3^{K717R}* and RNAi flies suggests that in the cells controlling evening activity, the decrease of CUL-3 activity is not strong enough or that light can better compensate for this decrease. Indeed, it has been recently reported that TIM degradation is more efficient in these cells than in the morning ones when light is applied in the evening (Tang et al., 2010).

In DD, flies with downregulated CUL-3 are affected for both PER and TIM protein oscillations but show a stronger defect in TIM cycling. The strong effect of CUL-3 downregulation on TIM in a *per⁰* background shows that TIM defects are not a consequence of PER defects in the mutants. A slight increase of PER phosphorylation levels were observed in *tim⁰* flies, but this change in PER phosphorylation appears marginal compared what we observed in the presence of TIM. The results thus strongly support TIM as the main target of CUL-3 circadian function, with TIM changes subsequently affecting PER.

The presence of phosphorylated TIM at all time points strongly suggests a posttranslational effect of CUL-3 downregulation on TIM. *tim>cul-3^{K717R}* flies also show *tim* mRNA changes, but the kinetics of CUL-3 effects on *tim* mRNA levels and TIM protein indicates that the protein is first affected. The strong effect of CUL-3 downregulation on TIM protein in the absence of PER also makes very unlikely the possibility that CUL-3 acts on the circadian control of CLK-CYC dependent transcription. Finally, the decrease of *per* and *tim* mRNA levels is expected to result from persisting phosphorylated PER during the subjective day. Since phosphorylated TIM accumulates in *tim>cul-3^{K717R}* flies, CUL-3 downregulation could either enhance TIM phosphorylation or stabilize phosphorylated TIM. The putative

ubiquitin ligase function of CUL-3 would favor a direct role in the control of TIM levels in the mutants. This would be in agreement with the presence of TIM and CUL-3 in protein complexes, although we cannot exclude that CUL-3 destabilizes an associated TIM kinase. Since no changes in SGG or CK2 β levels were observed in *tim>cul-3^{K717R}* flies (data not shown), more subtle modifications would have to be involved, or a yet uncharacterized TIM kinase would have to be destabilized by CUL-3.

The accumulation of phosphorylated TIM in flies with downregulated CUL-3 might indicate that CUL-3 controls the stability of such phosphorylated forms of the protein. Alternatively, CUL-3 could control the stability of hypophosphorylated TIM which would then be stabilized and subsequently phosphorylated more extensively. Accumulation of phosphorylated PER has been reported in long period *dbt* mutants (Price et al., 1998; Suri et al., 2000), where defective phosphorylation of the SLMB-binding site induces the subsequent accumulation of normally unstable phosphorylated forms (Chiu et al., 2008). Altogether, our data support CUL-3 preferentially acting on hypophosphorylated TIM with a subsequent accumulation of phosphorylated TIM in the mutants. In contrast, SLMB appears to preferentially target more phosphorylated forms of TIM. First, the Co-IP experiments indicate that CUL-3 binds to hypophosphorylated TIM whereas SLMB interact with phosphorylated TIM. In addition, TIM-CUL-3 complexes are more abundant in *per⁰* flies, where TIM is hypophosphorylated and cytoplasmic, whereas TIM-SLMB complexes are less abundant. Second, the absence of PER appears to enhance the effects of CUL-3 on TIM, suggesting that CUL-3 preferentially targets unbound TIM protein, which is mostly present in the evening when TIM is hypophosphorylated. It also indicates that CUL-3 can control TIM stability in the cytoplasm, further supporting hypophosphorylated TIM as a preferential CUL-3 target. In contrast, the absence of PER appears to reduce the accumulation of highly

phosphorylated TIM in *slmb^m* mutants. Finally, the additive effects of CUL-3 and SLMB strongly support two different pathways to control the stability of the TIM protein. *slmb^m* and double mutants accumulate higher molecular forms of TIM than in CUL-3. This again supports SLMB acting on more phosphorylated forms of TIM mutants whereas such forms are degraded in flies with downregulated CUL-3. Overall, our results support a model where CUL-3 plays a major role in the control of free hypophosphorylated and cytoplasmic TIM, whereas SLMB appears more important to control PER-bound hyperphosphorylated TIM. Since TIM appears to protect PER from degradation (Price et al., 1998; Fang et al., 2007), the delay between *per/tim* mRNA and PER/TIM protein peaks at the beginning of the cycle might largely rely on the control of TIM stability. Our results indicate that CUL-3 is an important player of this control.

CUL-3 complexes recognize substrates through a BTB-domain (Pintard et al., 2004) and the ROADKILL (RDX) protein has been shown to target the CI transcription factor (Zhang et al., 2006). Expression of several *rdx* RNAi constructs in the clock cells did not show any behavioral phenotype (data not shown), suggesting that TIM is targeted by another member of the large BTB-domain protein family. The importance of serine-rich regions as putative degrons has been revealed for the degradation of CI by the CUL-3/RDX complex (Zhang et al., 2009). Several serine rich regions are present in TIM (Meissner et al., 2008) and might thus contain target sites for CUL-3 ubiquitin ligase complexes. In *cul-3⁺* flies, the fast migration of TIM^{Δ260-292} suggests that no phosphorylation can occur on this form of TIM or that phosphorylated TIM^{Δ260-292} cannot accumulate. The absence of effect of CUL-3 downregulation supports a phosphorylation defect, that prevents the CUL-3 complex to target this form of TIM. Indeed, the molecular weight of TIM proteins observed in *per⁰* flies indicates that CUL-3 likely targets TIM forms that are at least slightly more phosphorylated

than these. It thus suggests that the 260-292 region contains priming phosphorylation sites that are required to generate CUL-3 -recognized TIM proteins. At the end of the cycle, TIM is degraded before PER (Rothenfluh et al., 2000), suggesting that TIM degradation may occur within the nuclear PER/TIM complex. Our results support SLMB as the major player of this late night nuclear degradation, as it is for PER. SLMB acts on PER through an atypical SLMB-binding site whose progressive phosphorylation during the night increases its affinity for the ubiquitin ligase (Chiu et al., 2008). No canonical SLMB recognition site were observed in TIM, but the loose conservation of such motifs (Chiu et al., 2008; Smelkinson et al., 2007) leaves room for the occurrence of non-canonical sites in the TIM protein. A detailed analysis of TIM phosphorylation sites will be required to understand how the phosphorylation of the protein determine its destabilization by CUL-3.

The preference of CUL-3 for hypophosphorylated TIM and the one of SLMB for more phosphorylated forms likely explains why two ubiquitin ligase complexes control TIM throughout a circadian cycle, in addition to the light-induced degradation that occurs under the control of the JET ubiquitin ligase. Such a double component regulation of TIM stability may allow to independently adjust the two phases of the feedback loop. By controlling the delay of protein accumulation, CUL-3 may set the beginning of the transcriptional repression, whereas SLMB would rather define the extent of the repression phase by controlling the degradation of phosphorylated PER and TIM. In the mammalian clock, CRY has a function similar to TIM by acting within PER/CRY complexes to repress CLK/BMAL1 - dependent transcription (Takahashi et al., 2008). It has been shown that the SLMB ortholog β TrCP controls PER1/2 stability (Shirogane et al., 2005; Eide et al., 2005; Reischl et al., 2007), whereas another F-box ubiquitin ligase, FBX3 controls CRY stability (Siepka et al., 2007; Godinho et al., 2007; Busino et al., 2007). It will be interesting to see whether the two

ubiquitin ligases also show preferences for different phosphorylation levels of the clock components.

Experimental procedures

Fly strains and constructs

The *UAS-cul-3RNAi* line carries two independent insertions (*CG11861-R1* and *-R2*) of the same RNAi construct that are described at <http://www.shigen.nig.ac.jp/fly/nigfly/index.jsp>. The *cul-3* allele *gft*³¹⁶⁰ is described at <http://flybase.org/>. The *slmb*^m (*slmb*⁸ *hs-slmb*) were produced by providing *hs-slmb* expression with daily heat-shock during development, as described in (Grima et al., 2002). The *UAS-cul-3*^{K717R} (Zhu et al., 2005), *UAS-cul-3*^{ΔC} (Mistry et al., 2004), *UAS-cul-3-flag* (Wu et al., 2005), *tim*^{Δ260-292} (Ousley et al., 1998), *pdf-gal4* (Renn et al., 1999), *cry-gal4-39* (Klarsfeld et al., 2004) and *tim-gal4-62* (Kaneko, 1998) have been previously reported. For generating *w¹¹¹⁸; UAS-flag-slmb* flies, the *slmb* ORF was amplified from cDNA LD08669 (<http://flybase.org/reports/FBcl0155568.html>) and cloned into the pENTR/D-TOPO vector (Invitrogen). The ORF was recombined into pTFMW (<https://dgrc.cgb.indiana.edu/vectors/store/vectors.html>) containing a UAS promoter and Nterminal 3xFLAG and 6xMyc tags using LR clonase (Invitrogen). The construct was transformed into *w¹¹¹⁸* embryos using standard procedures and inserts on chromosome 2 and 3 were selected. Line 23 was used for the anti-FLAG IP experiments.

Behavioral analysis

Experiments were carried out with 1- to 7-day-old males at 25 °C, except otherwise indicated, in *Drosophila* activity monitors (TriKinetics). Light was provided by standard, white, fluorescent low-energy bulbs. Flies were entrained in 12 h:12 h LD cycles for 4 days

and then transferred to DD. Actograms are double-plotted graphs representing the absolute activity levels for each 0.5-h interval, averaged over the total number of flies of a given genotype. LD analysis was done on days 2-4 and DD analysis on days 6-11. Data analysis was done with the FaasX software 1.5 that is derived from the Brandeis Rhythm Package (see (Klarsfeld et al., 2003), and is freely available upon request (Apple Mac OSX only). For LD data, histograms represent the distribution of the activity through 24 h, in 0.5-h intervals, averaged for the total number of flies over three LD cycles. For DD data, rhythmic flies were defined by χ^2 periodogram analysis of a six days dataset with the following criteria (filter ON): power ≥ 20 , width ≥ 2 h, with no selection on period value. Power and width are the height and width of the periodogram peak, respectively, and give the significance of the calculated period. Experiments were reproduced 2 or 3 times with very similar results.

Immunolabelings

Experiments were done on whole-mounted brains as previously described (Blanchardon et al., 2001). Primary antibodies were rabbit anti-PER (Stanewsky et al., 1997) at 1:15,000, rat anti-TIM (Grima et al., 2002) at 1:10,000, and mouse anti-PDF (Developmental Studies Hybridoma Bank) at 1:50,000. Secondary goat antibodies were FP546-conjugated anti-rabbit (Interchim) at 1:2,000, Alexa 647 -conjugated anti-rat (Molecular Probes) at 1:5,000, and Alexa 488 -conjugated anti-mouse (Molecular Probes) at 1:2,000. Fluorescence signals were analyzed with a Zeiss AxioImager microscope with an ApoTome structured illumination module. Fluorescence intensity of individual cells was quantified from digital images of single confocal plans with the NIH ImageJ software. We calculated a fluorescence index $I = 100n(S - B)/4B$, which gives the fluorescence percentage above background (where n is the number of labeled cells among the 4 PDF-expressing s-LNvs, S is fluorescence intensity and B is

average intensity of the region adjacent to the positive cell). Index values were then averaged over 12-20 brain hemispheres for each time point.

Quantitative RT-PCR

cDNA were synthesized from 1 µg of total head RNA (Promega SV total RNA isolation system). Quantitative PCR was performed with a LightCycler using the SYBR green detection protocol (Roche). cDNA samples were mixed with FastStart DNA master SYBR green I mix in 3 mM MgCl₂ and 500 nM of each primer, and were submitted to 40 cycles of PCR (95°C, 15 s; 60°C, 10 s; 72°C, 20 s). mRNA levels were normalized to the levels of *tubulin* mRNA. The primers were TCCTTGTCGCGTGTGAAACA (5', exon 1) and CCGAACGAGTGGAAGATGAG (3', exon 2) for *tubulin* (464 bp), ACCCGCATCCTTCGCTTTTCTACA (5', exon 6) and AGGTGAGCCAGTGGTGAGGACGGG (3', exon 7) for *per* (219 bp), and AGTTGGTCATGCGCAGCAAATG (5', exon 12) and TCCTTTTCGTACACAGATGCCA (3', exon 13) for *tim* (447 bp).

Western blots and immunoprecipitations

Protein extracts were made from frozen heads homogenized in ice-cold HE extraction buffer (20m M hepes pH 7.5, 0.1 M KCl, 10 mM EDTA), supplemented with 20 mM glycerophosphate, 0.1 mM DTT, phosphatase inhibitor cocktails 1 (0.5%) and 2 (1%) (Sigma) and protease inhibitor tablets (Roche) according to manufacturer's instructions. Anti-FLAG immunoprecipitations were performed using EZview Red anti-FLAG affinity gel (Sigma) according to manufacturer's instructions. For immunoprecipitations, 1mg of total head proteins were extracted in supplemented HE buffer, and DTT was replaced by 0.1% NP40. For SDS-PAGE, 50 µg of extracts (or immunoprecipitated proteins from 1 mg of extracts)

were separated on 3-8% Tris-acetate (TIM) or 4% Tris-glycine (PER) gels (Invitrogen) and transferred to PVDF membranes. Immunoblotting was performed as described previously (Grima et al., 2002). Primary antibodies were rabbit anti-PER (Stanewsky et al., 1997) at 1:10,000 and rat anti-TIM (Grima et al., 2002) at 1:2,000. HRP-conjugated secondary antibodies (Santa Cruz biotechnology) were anti-rabbit goat antibody (1:40,000) and anti-rat goat antibody (1:50,000).

Figure legends

Figure 1: Locomotor activity of *cul-3* downregulated flies in LD and DD. Control flies and flies expressing either a *cul-3* RNAi (A) or a CUL-3^{K717R} protein (B) were entrained for four days in LD 12:12 and transferred to DD. White and gray indicate lights-ON and lights-OFF, respectively. ZT is Zeitgeber Time (ZT0 corresponds to lights-ON). Top panels: averaged activity distribution of n flies in LD (see Experimental procedures). Dots indicate the s.e.m. of the activity for each 0.5-h interval. Bottom panels: averaged actograms of n flies during both LD and DD conditions (see Experimental procedures).

Figure 2: PER and TIM in the s-LNvs of *cul-3* downregulated flies. Flies were entrained for three days in LD and then transferred to DD with time points collected every 4 h in the second (A) or third (B) days of DD. Time (h) is indicated as CT (Circadian Time) where CT0 is 12h after lights-OFF of the last LD day. Gray and black bars indicate subjective day and subjective night, respectively. A (top). Optical sections of individual PDF-expressing s-LNvs are shown for flies expressing *cul-3* RNAi and control. Upper panels: red is PER, blue is TIM and green is PDF in the merged images. Lower panels: PER and TIM images of the upper panels were increased in brightness to show the distribution of the PER and TIM

immunoreactivities at time points with weak labeling. A (bottom), B. PER and TIM were quantified (see Experimental procedures) in the PDF-positive cells of controls and flies expressing either *cul-3* RNAi in the PDF cells (A) or CUL-3^{K717R} in *tim*-expressing cells (B). Error bars indicate s.e.m.

Figure 3: PER and TIM in head extracts of flies expressing CUL-3^{K717R}. Flies were entrained for three days in LD and collected every 3 h the fourth day of LD (A) or transferred to DD and collected the first and second days of DD (B). A) TIM western blots. White and black bars indicate day and night, respectively. B) TIM (top) and PER (bottom) western blots. Phosphorylated (P-) and hypophosphorylated forms of PER and TIM are indicated. Gray and black bars indicate subjective day and subjective night, respectively.

Figure 4: *per* and *tim* mRNA oscillations in flies expressing CUL-3^{K717R}. Flies were entrained for three days in LD and transferred to DD for collection every 3 h in the second (left) and third (right) days of DD. Relative *per* and *tim* mRNA levels in head extracts were determined by quantitative RT-PCR (see Experimental procedures). For each graph, values are averages of two independent experiments and were normalized to the maximum value of the *w;tim-gal4* controls. Error bars indicate s.e.m.

Figure 5: PER and TIM proteins in *cul-3*^{K717R} flies with *per* or *tim* mutant background. Flies were entrained for three days in LD, transferred to DD and collected at CT27. A) anti-PER (top) and anti-TIM (bottom) western blots of head extracts in a *tim*⁰ and *per*⁰ backgrounds, respectively. B) Optical section of an individual s-LNV immunolabeled for TIM (blue) and PDF (red) in a *per*⁰ background. C) anti-TIM western blot of head extract in a *tim*⁰ *tim*^{Δ260-292}

background. Vertical dashes indicate that the two surrounding slots were not contiguous on the gel.

Figure 6: PER and TIM proteins in flies *cul-3^{K717R}* and *slmb^m* flies. A) anti-TIM (top) and anti-PER (bottom) western blots of head extracts. Flies were entrained three days in LD and transferred to DD for collection during the first and second day of DD. The very high molecular weight PER forms in S and KS mutants are quite variable in size and intensity between experiments (not shown), thus the stronger band in KS at CT 39 does not seem to reflect significantly higher forms in KS versus S. B, C) anti-PER (B) and anti-TIM (C) western blots of head extracts *tim⁰* and *per⁰* backgrounds, respectively. Flies were entrained for three days in LD and transferred to DD for collection at CT27.

Figure 7: TIM interactions with CUL-3 and SLMB. A) anti-CUL-3-FLAG immunoprecipitation from head extracts followed by anti-TIM immunoblotting in *per⁺* (left) and *per⁰* (right) backgrounds. Slots 1 and 3 are negative controls and I2, 5 indicate input extracts (50 µg of total proteins) for *per⁺* and *per⁰* backgrounds, respectively. Flies were entrained three days in LD and transferred to DD for collection at CT15. B) Left: anti-SLMB-FLAG immunoprecipitation from head extracts collected at different time points, followed by anti-TIM immunoblotting. Two consecutive time points were pooled for IPs in a *per⁺* background. Slot 7 is the negative control, I1 is the *per⁺* input. Right: anti-TIM western blot of head extracts of *w; tim-gal4* (50 µg) and *per⁰ w; tim-gal4* (25 µg) indicate that TIM levels are much higher in a *per⁰* background.

Acknowledgements

We thank C.T. Chien, H. Mistry, A. Sehgal and the Bloomington stock center for fly strains, as well as R. Stanewsky for anti-PER antibody. We address special thanks to R. Ueda and T.D. Murphy for the generous gift of unpublished material and to M. Boudinot for the FaasX software. We also thank J-P. Bouillot for his help with digital imaging, and S. Bouleau, A. Klarsfeld and A. Lamaze for their critical reading of the manuscript. This work was supported by Agence Nationale de la Recherche "DrosoClock", "Equipe FRM" program of Fondation pour la Recherche Médicale, European Union 6th Framework Programme "EUCLOCK" and Université Paris Sud. AD was supported by Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and FR by Institut National de la Santé et des Etudes et Recherches Médicales.

References

- Akten, B., Jauch, E., Genova, G. K., Kim, E. Y., Edery, I., Raabe, T., and Jackson, F. R. (2003). A role for CK2 in the *Drosophila* circadian oscillator. *Nat Neurosci* 16, 251-257.
- Allada, R., and Chung, B. Y. (2010). Circadian organization of behavior and physiology in *Drosophila*. *Annu Rev Physiol* 72, 605-624.
- Bell-Pedersen, D., Cassone, V. M., Earnest, D. J., Golden, S. S., Hardin, P. E., Thomas, T. L., and Zoran, M. J. (2005). Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat Rev Genet* 6, 544-556.
- Blanchardon, E., Grima, B., Klarsfeld, A., Chélot, E., Hardin, P. E., Prémat, T., and Rouyer, F. (2001). Defining the role of *Drosophila* lateral neurons in the control of circadian activity and eclosion rhythms by targeted genetic ablation and PERIOD protein overexpression. *Eur J Neurosci* 13, 871-888.
- Busino, L., Bassermann, F., Maiolica, A., Lee, C., Nolan, P. M., Godinho, S. I., Draetta, G. F., and Pagano, M. (2007). SCFFbxl3 controls the oscillation of the circadian clock by directing the degradation of cryptochrome proteins. *Science* 316, 900-904.

Chiu, J. C., Vanselow, J. T., Kramer, A., and Edery, I. (2008). The phospho-occupancy of an atypical SLIMB-binding site on PERIOD that is phosphorylated by DOUBLETIME controls the pace of the clock. *Genes Dev* 22, 1758-1772.

Eide, E. J., Woolf, M. F., Kang, H., Woolf, P., Hurst, W., Camacho, F., Vielhaber, E. L., Giovanni, A., and Virshup, D. M. (2005). Control of Mammalian Circadian Rhythm by CKI $\{\epsilon\}$ -Regulated Proteasome-Mediated PER2 Degradation. *Mol Cell Biol* 25, 2795-2807.

Fang, Y., Sathyanarayanan, S., and Sehgal, A. (2007). Post-translational regulation of the *Drosophila* circadian clock requires protein phosphatase 1 (PP1). *Genes Dev* 21, 1506-1518.

Godinho, S. I., Maywood, E. S., Shaw, L., Tucci, V., Barnard, A. R., Busino, L., Pagano, M., Kendall, R., Quwailid, M. M., Romero, M. R., O'Neill, J., Chesham, J. E., Brooker, D., Lallane, Z., Hastings, M. H., and Nolan, P. M. (2007). The after-hours mutant reveals a role for Fbxl3 in determining mammalian circadian period. *Science* 316, 897-900.

Grima, B., Chélot, E., Xia, R., and Rouyer, F. (2004). Morning and evening peaks of activity rely on different clock neurons of the *Drosophila* brain. *Nature* 431, 869-873.

Grima, B., Lamouroux, A., Chélot, E., Papin, C., Limbourg-Bouchon, B., and Rouyer, F. (2002). The F-box protein SLIMB controls the levels of clock proteins PERIOD and TIMELESS. *Nature* 429, 178-182.

Hooper, J. E., and Scott, M. P. (2005). Communicating with Hedgehogs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 306-317.

Jiang, J. (2006). Regulation of Hh/Gli Signaling by Dual Ubiquitin Pathways. *Cell Cycle* 5, 2457.

Jiang, J., and Struhl, G. (1998). Regulation of the Hedgehog and Wingless signaling pathways by the F-box/WD40-repeat protein Slimb. *Nature* 391, 493-496.

Kaneko, M. (1998). Neural substrates of *Drosophila* rhythms revealed by mutants and molecular manipulations. *Curr Opin Neurobiol* 8, 652-658.

Kent, D., Bush, E. W., and Hooper, J. E. (2006). Roadkill attenuates Hedgehog responses through degradation of Cubitus interruptus. *Development* 133, 2001-2010.

- Kim, E. Y., and Edery, I. (2006). Balance between DBT/CKI{varepsilon} kinase and protein phosphatase activities regulate phosphorylation and stability of *Drosophila* CLOCK protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 6178-6183.
- Kim, E. Y., Ko, H. W., Yu, W., Hardin, P. E., and Edery, I. (2007). A DOUBLETIME kinase binding domain on the *Drosophila* PERIOD protein is essential for its hyperphosphorylation, transcriptional repression, and circadian clock function. *Mol Cell Biol* *27*, 5014-5028.
- Klarsfeld, A., Leloup, J. C., and Rouyer, F. (2003). Circadian rhythms of locomotor activity in *Drosophila*. *Behav Processes* *64*, 161-175.
- Klarsfeld, A., Malpel, S., Michard-Vanhée, C., Picot, M., Chélot, E., and Rouyer, F. (2004). Novel features of cryptochrome-mediated photoreception in the brain circadian clock of *Drosophila*. *J Neurosci* *24*, 1468-1477.
- Kloss, B., Price, J. L., Saez, L., Blau, J., Rothenfluh, A., Wesley, C. S., and Young, M. W. (1998). The *Drosophila* clock gene double-time encodes a protein closely related to human casein kinase Iepsilon. *Cell* *94*, 97-107.
- Kloss, B., Rothenfluh, A., Young, M. W., and Saez, L. (2001). Phosphorylation of period is influenced by cycling physical associations of double-time, period, and timeless in the *drosophila* clock. *Neuron* *30*, 699-706.
- Knowles, A., Koh, K., Wu, J. T., Chien, C. T., Chamovitz, D. A., and Blau, J. (2009). The COP9 signalosome is required for light-dependent timeless degradation and *Drosophila* clock resetting. *J Neurosci* *29*, 1152-1162.
- Ko, H. W., Jiang, J., and Edery, I. (2002). A role for Slimb in the degradation of *Drosophila* PERIOD protein phosphorylated by DOUBLETIME. *Nature* *420*, 673-678.
- Koh, K., Zheng, X., and Sehgal, A. (2006). JETLAG resets the *Drosophila* circadian clock by promoting light-induced degradation of TIMELESS. *Science* *312*, 1809-1812.
- Lin, J.-M., Kilman, V., Keegan, K., Paddock, B., Emery-Le, M., Rosbash, M., and Allada, A. (2002). A role for casein kinase 2a in the *Drosophila* circadian clock. *Nature* *420*, 816-820.

Martinek, S., Inonog, S., Manoukian, A. S., and Young, M. W. (2001). A Role for the Segment Polarity Gene *shaggy*/GSK-3 in the *Drosophila* Circadian Clock. *Cell* *105*, 769-779.

Meissner, R. A., Kilman, V. L., Lin, J. M., and Allada, R. (2008). TIMELESS is an important mediator of CK2 effects on circadian clock function in vivo. *J Neurosci* *28*, 9732-9740.

Menet, J. S., Abruzzi, K. C., Desrochers, J., Rodriguez, J., and Rosbash, M. (2010). Dynamic PER repression mechanisms in the *Drosophila* circadian clock: from on-DNA to off-DNA. *Genes Dev* *24*, 358-367.

Mistry, H., Wilson, B. A., Roberts, I. J., O'Kane, C. J., and Skeath, J. B. (2004). Cullin-3 regulates pattern formation, external sensory organ development and cell survival during *Drosophila* development. *Mech Dev* *121*, 1495-1507.

Muskus, M. J., Preuss, F., Fan, J. Y., Bjes, E. S., and Price, J. L. (2007). *Drosophila* DBT Lacking Protein Kinase Activity Produces Long-Period and Arrhythmic Circadian Behavioral and Molecular Rhythms. *Mol Cell Biol* *27*, 8049-8064.

Myers, M. P., Wager-Smith, K., Rothenfluh-Hilfiker, A., and Young, M. W. (1996). Lightinduced degradation of TIMELESS and entrainment of the *Drosophila* circadian clock. *Science* *271*, 1736-1740.

Nakayama, K. I., and Nakayama, K. (2005). Regulation of the cell cycle by SCF-type ubiquitin ligases. *Semin Cell Dev Biol* *16*, 323-333.

Nawathean, P., and Rosbash, M. (2004). The doubletime and CKII kinases collaborate to potentiate *Drosophila* PER transcriptional repressor activity. *Mol Cell* *13*, 213-223.

Nawathean, P., Stoleru, D., and Rosbash, M. (2007). A small conserved domain of *Drosophila* PERIOD is important for circadian phosphorylation, nuclear localization, and transcriptional repressor activity. *Mol Cell Biol* *27*, 5002-5013.

Ou, C. Y., Lin, Y. F., Chen, Y. J., and Chien, C. T. (2002). Distinct protein degradation mechanisms mediated by Cul1 and Cul3 controlling Ci stability in *Drosophila* eye development. *Genes Dev* *16*, 2403-2414.

Ousley, A., Zafarullah, K., Chen, Y. F., Emerson, M., Hickman, L., and Sehgal, A. (1998). Conserved regions of the timeless (tim) clock gene in *Drosophila* analyzed through phylogenetic and functional studies. *Genetics* 148, 815-825.

Peschel, N., Chen, K. F., Szabo, G., and Stanewsky, R. (2009). Light-dependent interactions between the *Drosophila* circadian clock factors cryptochrome, jetlag, and timeless. *Curr Biol* 19, 241-247.

Peschel, N., Veleri, S., and Stanewsky, R. (2006). Veela defines a molecular link between Cryptochrome and Timeless in the light-input pathway to *Drosophila*'s circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 17313-17318.

Pintard, L., Willems, A., and Peter, M. (2004). Cullin-based ubiquitin ligases: Cul3-BTB complexes join the family. *Embo J* 23, 1681-1687.

Price, J. L., Blau, J., Rothenfluh, A., Abodeely, M., Kloss, B., and Young, M. W. (1998). double-time is a novel *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell* 94, 83-95.

Price, J. L., Dembinska, M. E., Young, M. W., and Rosbash, M. (1995). Suppression of PERIOD protein abundance and circadian cycling by the *Drosophila* clock mutation *timeless*. *EMBO J* 14, 4044-4049.

Reischl, S., Vanselow, K., Westermarck, P. O., Thierfelder, N., Maier, B., Herzel, H., and Kramer, A. (2007). {beta}-TrCP1-Mediated Degradation of PERIOD2 Is Essential for Circadian Dynamics. *J Biol Rhythms* 22, 375-386.

Renn, S. C., Park, J. H., Rosbash, M., Hall, J. C., and Taghert, P. H. (1999). A pdf neuropeptide gene mutation and ablation of PDF neurons each cause severe abnormalities of behavioral circadian rhythms in *Drosophila*. *Cell* 99, 791-802.

Rothenfluh, A., Young, M. W., and Saez, L. (2000). A TIMELESS-independent function for PERIOD proteins in the *Drosophila* clock. *Neuron* 26, 505-514.

Sathyanarayanan, S., Zheng, X., Xiao, R., and Sehgal, A. (2004). Posttranslational regulation of *Drosophila* PERIOD protein by protein phosphatase 2A. *Cell* 116, 603-615.

Shirogane, T., Jin, J., Ang, X. L., and Harper, J. W. (2005). SCF β -TRCP controls clock-dependent transcription via casein kinase 1-dependent degradation of the mammalian period-1 (Per1) protein. *J Biol Chem* 280, 26863-26872.

Siepkka, S. M., Yoo, S. H., Park, J., Song, W., Kumar, V., Hu, Y., Lee, C., and Takahashi, J. S. (2007). Circadian Mutant Overtime Reveals F-box Protein FBXL3 Regulation of Cryptochrome and Period Gene Expression. *Cell* 129, 1011-1023.

Smelkinson, M. G., Zhou, Q., and Kalderon, D. (2007). Regulation of Ci-SCF(Slimb) Binding, Ci Proteolysis, and Hedgehog Pathway Activity by Ci Phosphorylation. *Dev Cell* 13, 481-495.

Stanewsky, R., Frisch, B., Brandes, C., Hamblen-Coyle, M. J., Rosbash, M., and Hall, J. C. (1997). Temporal and spatial expression patterns of transgenes containing increasing amounts of the *Drosophila* clock gene *period* and a *lacZ* reporter: mapping elements of the PER protein involved in circadian cycling. *J Neurosci* 17, 676-696.

Suri, V., Hall, J. C., and Rosbash, M. (2000). Two novel doubletime mutants alter circadian properties and eliminate the delay between RNA and protein in drosophila. *J Neurosci* 20, 7547-7555.

Takahashi, J. S., Hong, H. K., Ko, C. H., and McDearmon, E. L. (2008). The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nat Rev Genet* 9, 764-775.

Tang, C. H., Hinteregger, E., Shang, Y., and Rosbash, M. (2010). Light-Mediated TIM Degradation within *Drosophila* Pacemaker Neurons (s-LNvs) Is Neither Necessary nor Sufficient for Delay Zone Phase Shifts. *Neuron* 66, 378-385.

Weber, F. (2009). Remodeling the clock: coactivators and signal transduction in the circadian clockworks. *Naturwissenschaften* 96, 321-337.

Wu, J. T., Lin, H. C., Hu, Y. C., and Chien, C. T. (2005). Neddylation and deneddylation regulate Cul1 and Cul3 protein accumulation. *Nat Cell Biol* 7, 1014-1020.

Yu, W., Zheng, H., Price, J. L., and Hardin, P. E. (2009). DOUBLETIME plays a noncatalytic role to mediate CLOCK phosphorylation and repress CLOCK-dependent transcription within the *Drosophila* circadian clock. *Mol Cell Biol* 29, 1452-1458.

Yu, W., Zheng, H., Houl, J. H., Dauwalder, B., and Hardin, P. E. (2006). PER-dependent rhythms in CLK phosphorylation and E-box binding regulate circadian transcription. *Genes Dev* 20, 723-733.

Zeng, H. K., Qian, Z. W., Myers, M. P., and Rosbash, M. (1996). A light-entrainment mechanism for the *Drosophila* circadian clock. *Nature* 380, 129-135.

Zhang, Q., Shi, Q., Chen, Y., Yue, T., Li, S., Wang, B., and Jiang, J. (2009). Multiple Ser/Thr-rich degrons mediate the degradation of Ci/Gli by the Cul3-HIB/SPOP E3 ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 21191-21196.

Zhang, Q., Zhang, L., Wang, B., Ou, C. Y., Chien, C. T., and Jiang, J. (2006). A hedgehog-induced BTB protein modulates hedgehog signaling by degrading Ci/Gli transcription factor. *Dev Cell* 10, 719-729.

Zhu, S., Perez, R., Pan, M., and Lee, T. (2005). Requirement of Cul3 for axonal arborization and dendritic elaboration in *Drosophila* mushroom body neurons. *J Neurosci* 25, 4189-4197.

Table 1

Genotype	Total Flies	Rhythmic Flies (%)	Period (h)	Power
<i>w ; pdf-gal4</i>	28	100	25.0 ± 0.2	145 ± 10
<i>w ; pdf-gal4 ; UAS-cul-3RNAi</i>	47	55	25.1 ± 1.2	57 ± 5
<i>w ; cry-gal4-39</i>	20	90	24.6 ± 0.1	159 ± 7
<i>w ; cry-gal4-39 ; UAS-cul-3RNAi</i>	28	30	26.5 ± 2.0	43 ± 5
<i>w ; tim-gal4</i>	96	89	25.3 ± 0.2	113 ± 7
<i>w ; tim-gal4 ; UAS-cul-3^{K717R}</i>	96	40	26.8 ± 0.9	56 ± 7
<i>w ; tim-gal4 ; UAS-cul-3^{NC}</i>	48	29	25.4 ± 0.7	73 ± 12

Table 1: Locomotor activity rhythms of *cul-3* downregulated flies in constant darkness.

The mean values of period and associated power (see Experimental Procedures) are given ± s.e.m. In all *cul-3* affected genotypes, rhythmic flies display weak rhythms as indicated by the large s.e.m. of the period and the low associated power.

Figure 1

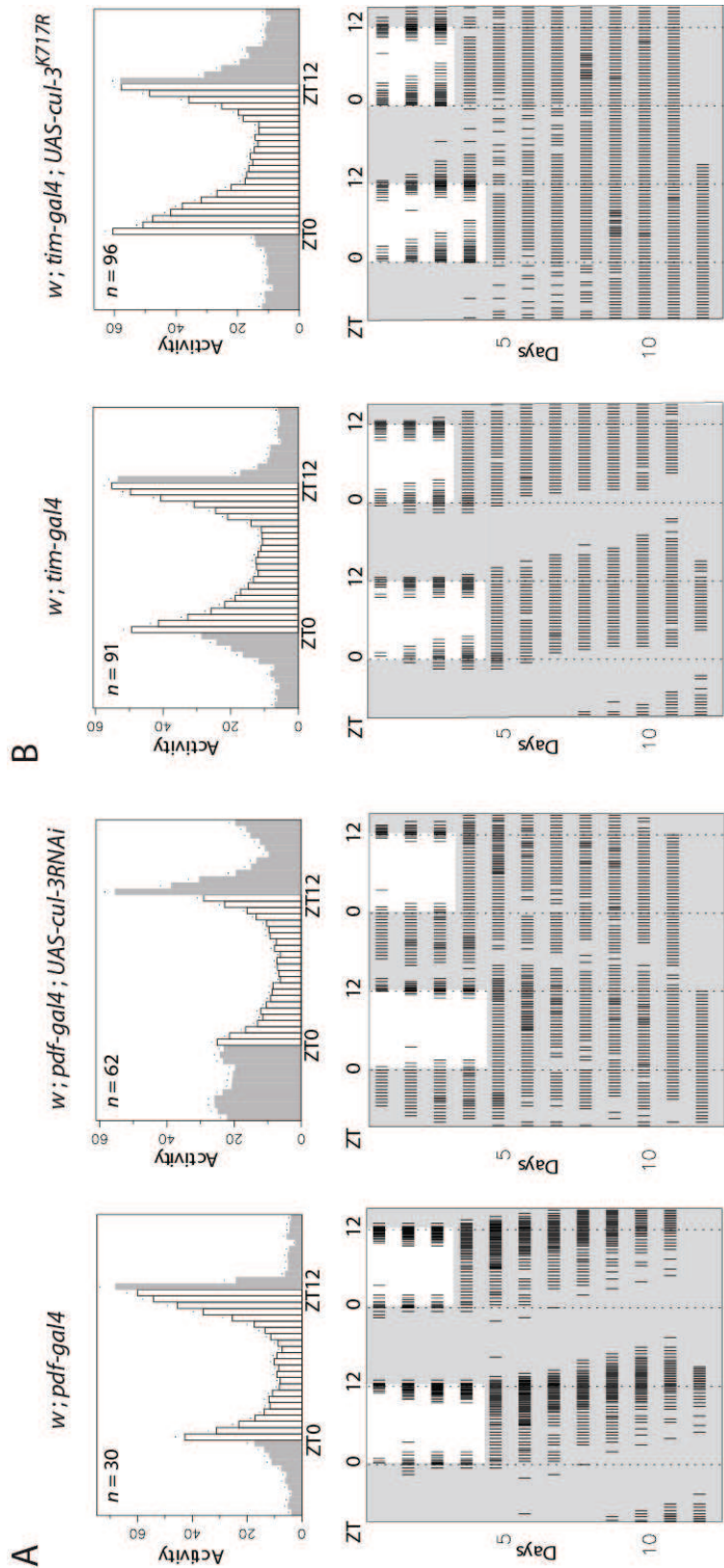


Figure 2

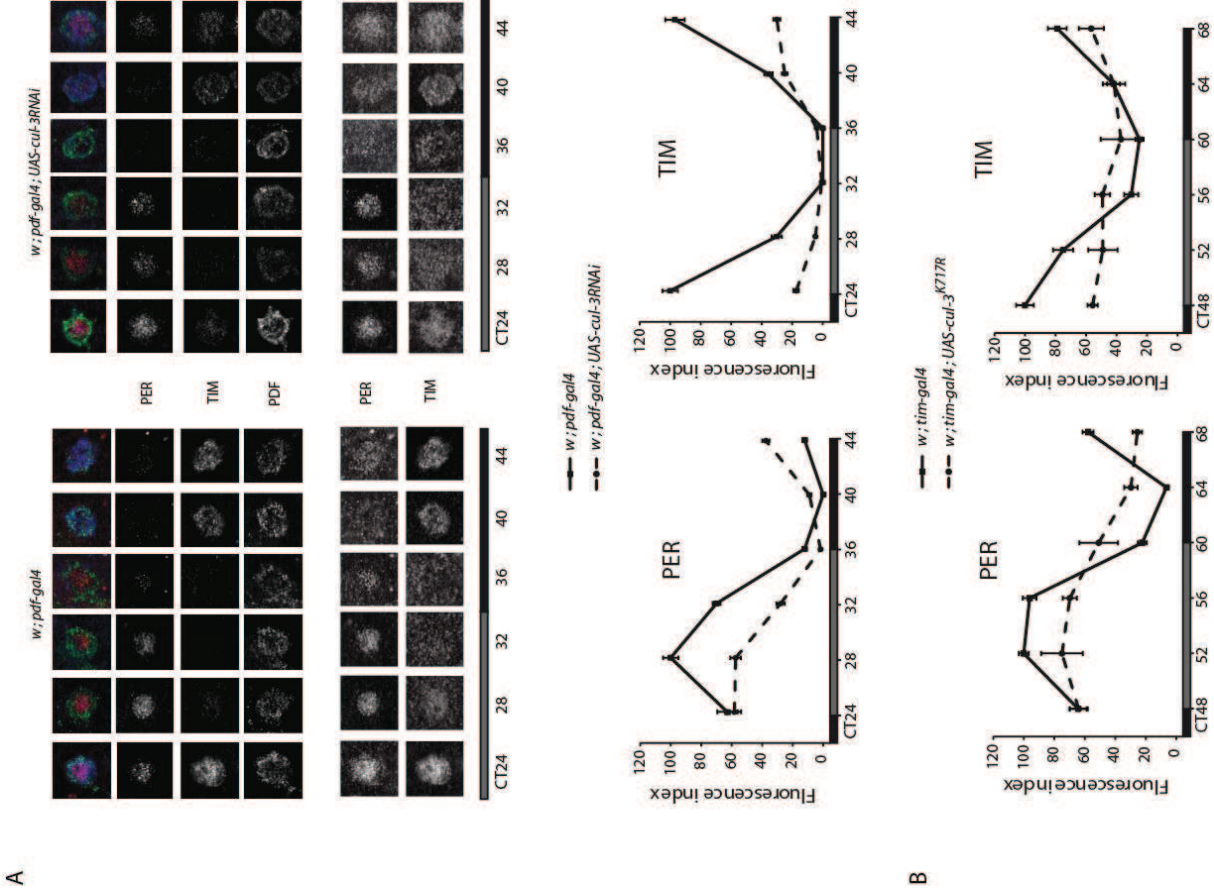


Figure 3

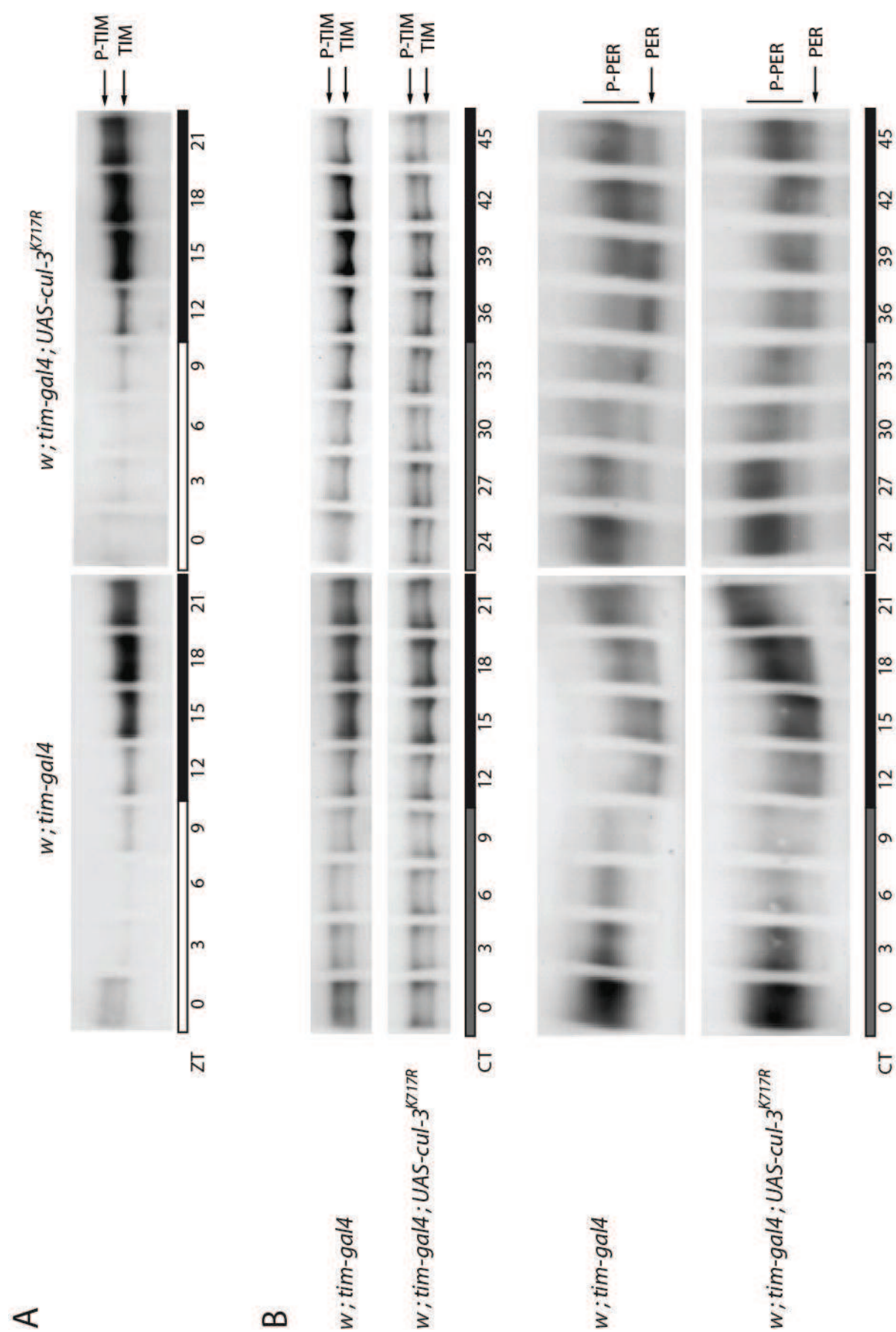


Figure 4

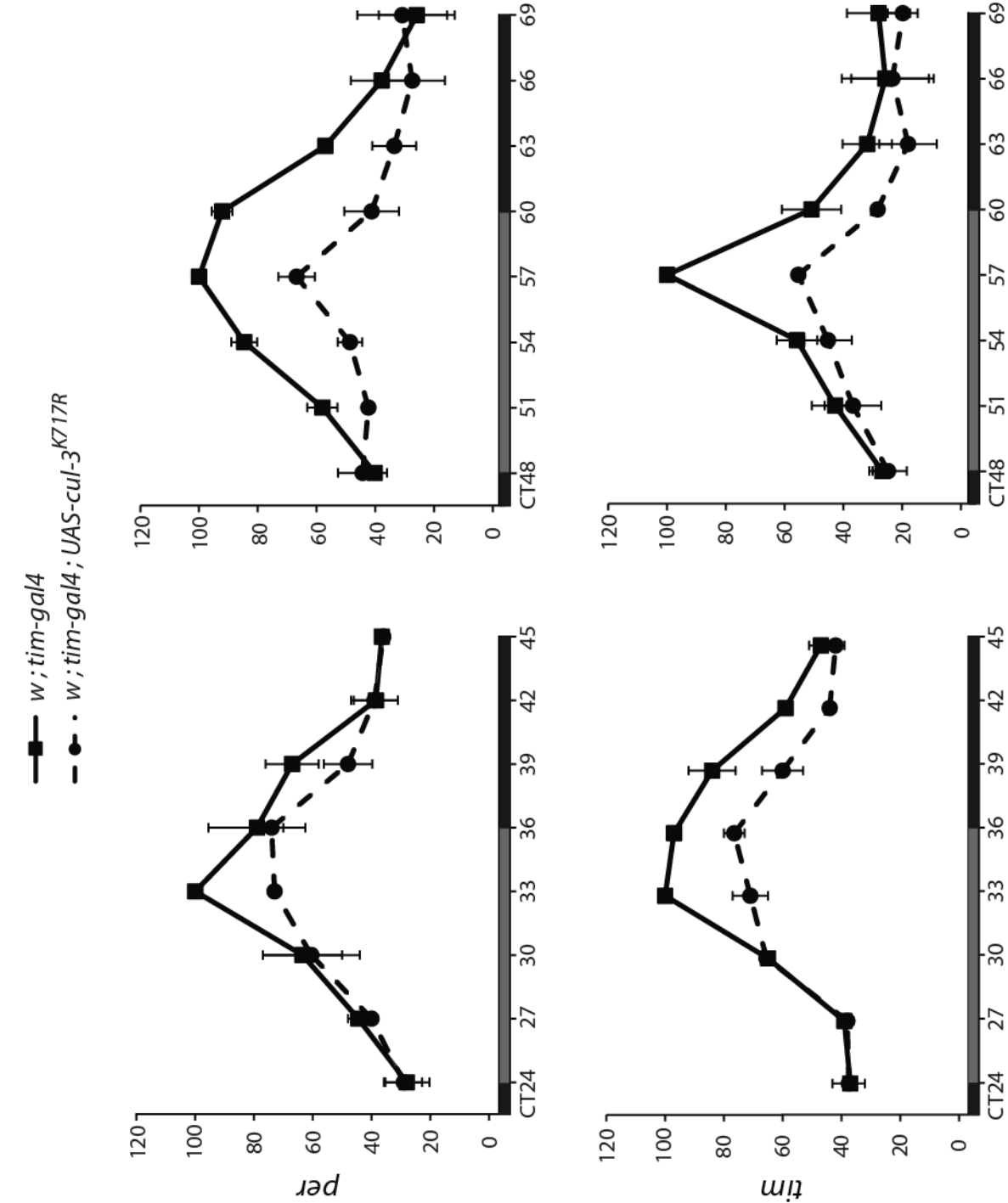


Figure 5

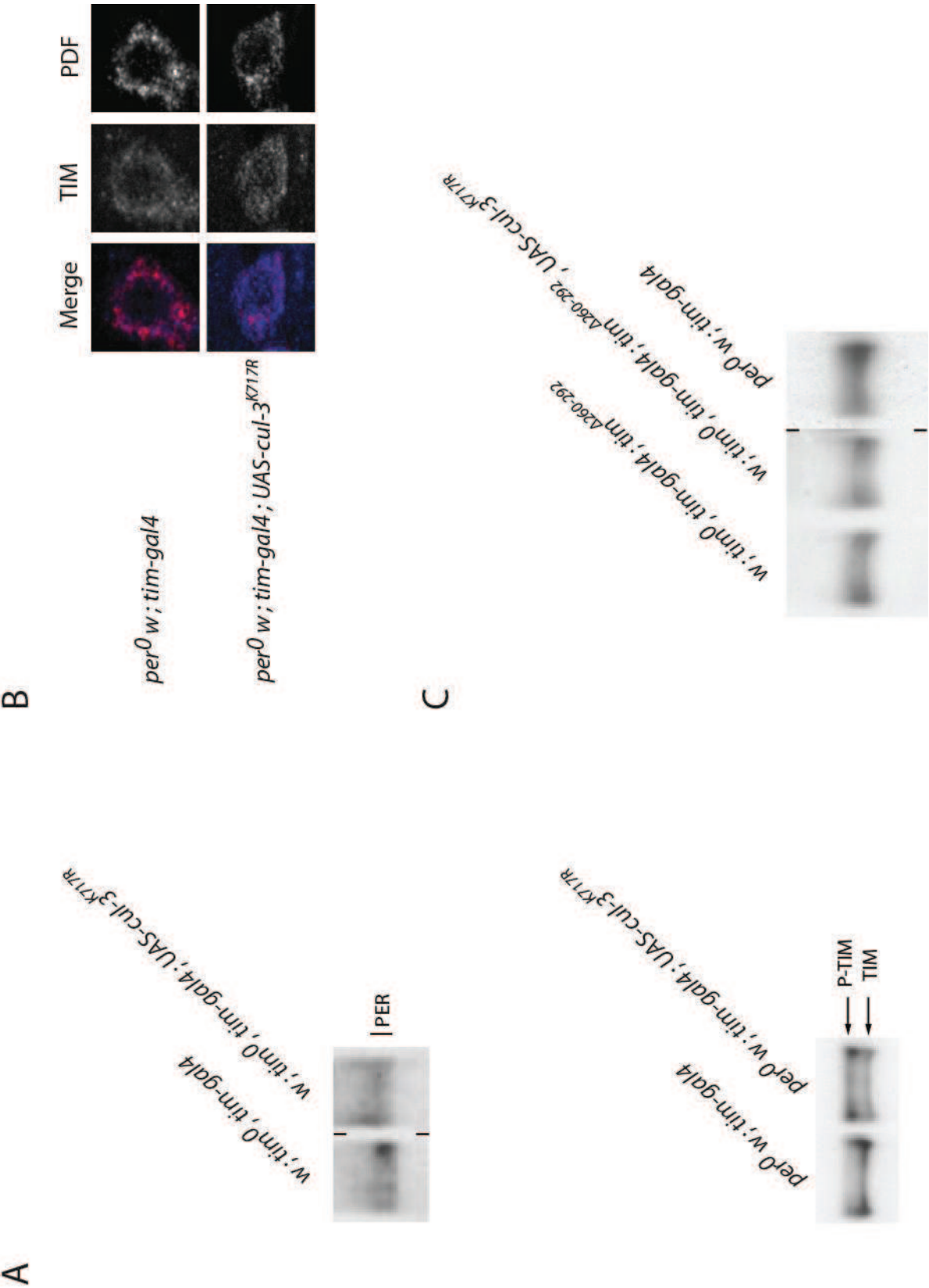


Figure 6

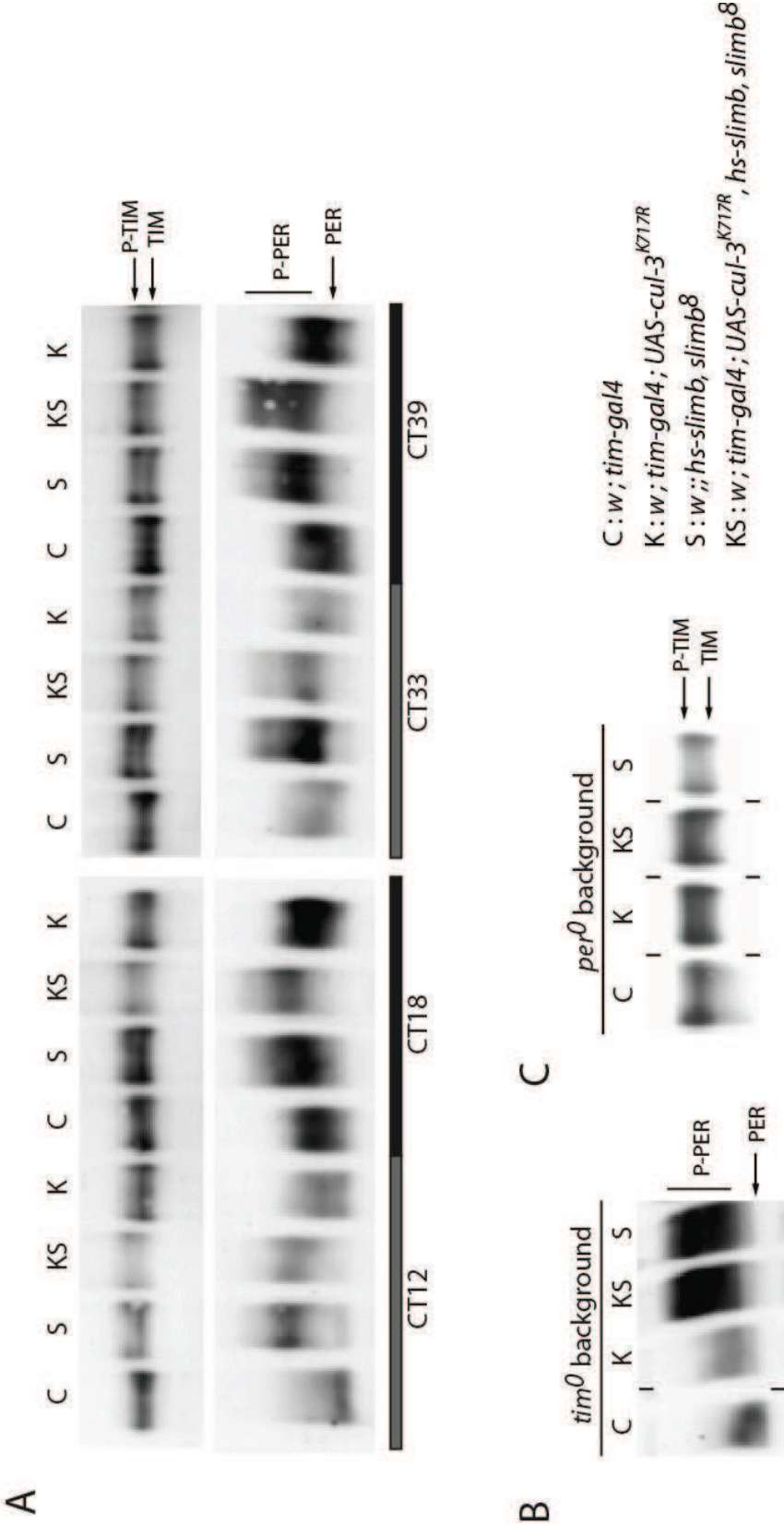
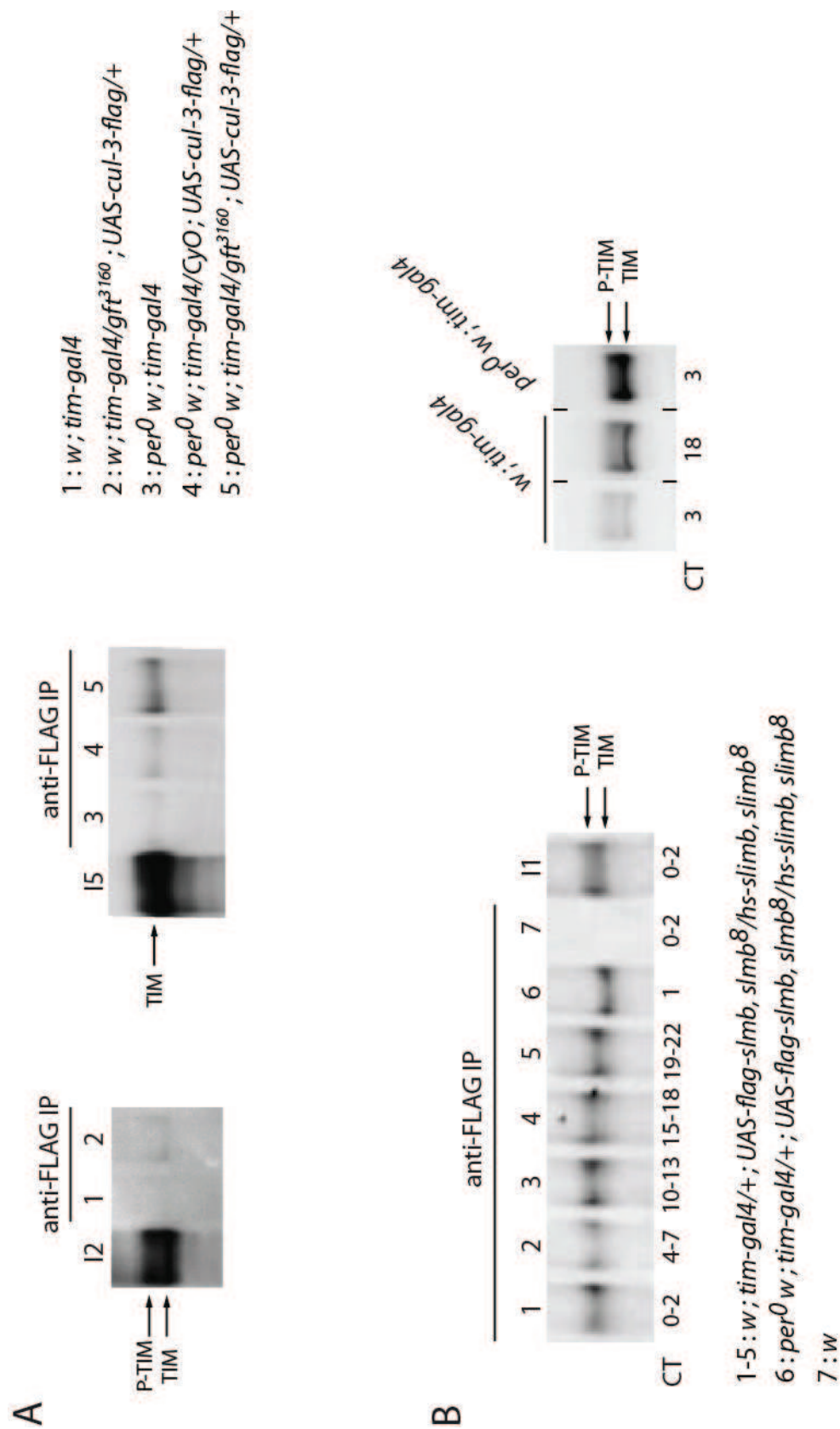
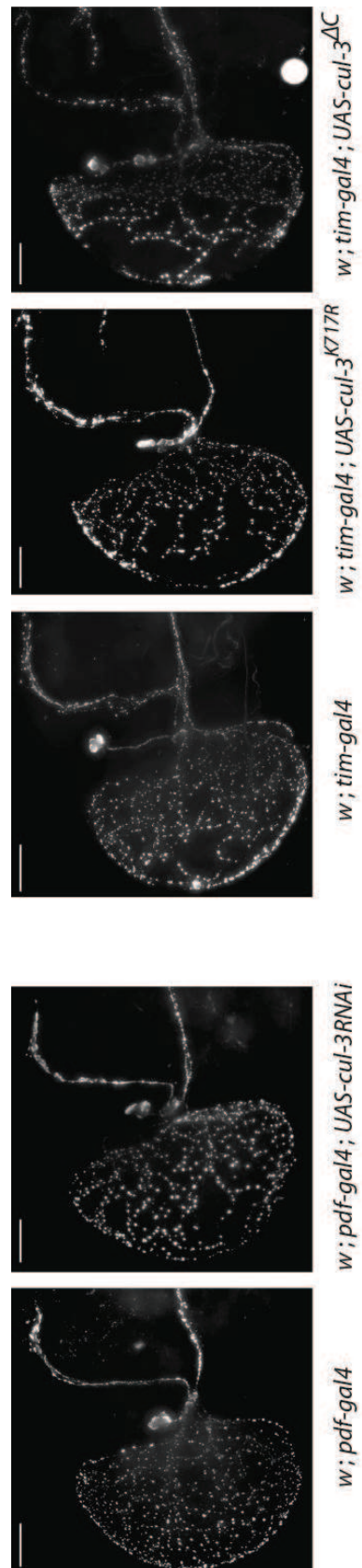


Figure 7



Supplemental Figure 1



Supplemental Figure 1 : Morphology of PDF-positive s-LNvs in *cul-3* mutants.
Stacks of optical sections from adult brains immunolabeled with anti-PDF. Scale bars: 50 μM

III – RESULTATS SUPPLEMENTAIRES

A – Rôle de la *culline-3* dans l’horloge larvaire

Lors de notre étude du rôle de la *culline-3* dans la régulation de l’horloge circadienne, nous avons utilisé des souches de drosophile avec différentes mutations de ce gène. Cependant, ce sont des mutations hypomorphes (formes dominant-négatives, RNAi) qui n’entraînent donc pas une absence complète de la fonction. Nous avons essayé d’utiliser des mutations nulles de la *culline-3*, mais elles engendrent une létalité à l’état homozygote, alors que les mutants hétérozygotes ne présentent aucun phénotype comportemental (période comparable aux mouches sauvages). Dans la littérature, un rôle de la *cullin-3* dans le développement a été montré (Mistry et al., 2004), impliquant donc que l’inhibition complète de ce gène engendre une létalité développementale. Cependant, on peut retrouver une certaine proportion d’individus à différents stades larvaires (principalement L1 et L2) mais ils n’atteignent jamais la pupaison.

Nous avons donc décidé d’étudier les mutants nuls aux stades précoces chez la larve. Afin de distinguer les larves homozygotes pour la mutation, nous avons utilisées des lignées balancées par un chromosome balanceur exprimant la GFP (CyO,Kr-gal4,UAS-GFP). Nous pouvons donc facilement repérer les larves homozygotes pour la mutation de la *culline-3*, par l’absence d’expression de la GFP. Ces lignées proviennent du laboratoire de C.T. Chien à Taiwan. Elles ont été générées par mutagénèse EMS et sont toutes létales à l’état homozygote. Avec ces mutants, aucune analyse comportementale ne pourra être réalisée, mais nous pourrions analyser les oscillations des protéines d’horloge dans les neurones larvaires.

Pour commencer, nous avons dû choisir les mutants de la *cullin-3* que nous allions étudier. Il faut qu’il y ait assez d’individus homozygotes pour que l’analyse des oscillations de PER et TIM soit cohérente. De plus, il faut que le tri des larves exprimant ou non la GFP se fasse assez rapidement pour respecter les temps (CT) et exposer le moins possible les larves à la fluorescence de la loupe. Au final, nous avons choisi deux lignées parmi les 9 qui répondaient aux critères requis : des larves homozygotes et en nombre suffisant pour

l'analyse. Il s'agit des lignées *cul-3^{B1-3}* et *cul-3^{B3-2}*. Dans ces lignées, on trouve essentiellement des larves de stade 1 et 2 (L1 et L2) et aucune larve de stade 3 (L3).

Premièrement, nous avons regardé la morphologie des neurones d'horloge par marquage immunohistochimique dirigé contre le neuropeptide PDF. Dans chacun de ces génotypes, les LNvs sont présents et leurs projections normales (Fig. 1). Il n'y a donc pas de défauts majeurs et on va pouvoir analyser les oscillations de PER et TIM dans ces neurones.

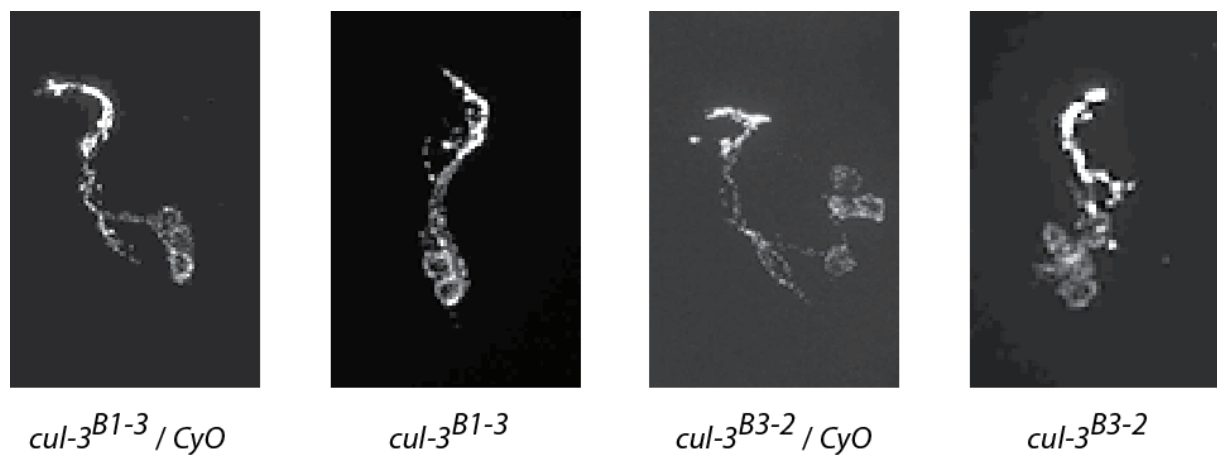


Figure 1 : Morphologie des LNvs PDF-positifs chez les mutants *cul-3*.

Stacks de sections optiques de cerveaux larvaires immunomarkés avec un anticorps dirigé contre le PDF.

L'analyse des oscillations des protéines PER et TIM dans les LNvs au 2^{ème} jour d'obscurité constante (DD2) après entraînement en LD(12-12) a donné les résultats présentés ci-après (Fig. 2). En ce qui concerne le mutant *cul-3^{B1-3}* (Fig. 2-A), TIM oscille de la même manière que le témoin avec une diminution de la quantité de TIM en début de journée subjective jusqu'à CT28-CT32. Les niveaux remontent ensuite jusqu'en fin de nuit subjective à CT44. Concernant, la protéine PER, il n'y a pas une différence significative. PER continue à osciller avec un pic de quantité en début de journée subjective (CT24) et une diminution jusqu'à CT36. Il y a certes une différence de quantité entre le témoin et le mutant mais PER garde de bonnes oscillations, ce qui reflète un bon fonctionnement de l'horloge.

Quand on observe ensuite les oscillations de PER et TIM dans le mutant *cul-3^{B3-2}* (Fig. 2-B), on arrive à peu près aux mêmes conclusions. Les oscillations de PER sont quasi superposables entre le témoin et le mutant avec un pic de PER en début de journée subjective à CT24 et un creux vers CT36. Concernant les oscillations de TIM, elles sont assez similaires avec une diminution de la quantité de TIM en début de journée jusqu'à CT28-CT32, puis une remontée de TIM pendant la nuit subjective. Il y a une différence à CT44 mais il doit y avoir un problème avec le témoin à ce temps. En effet, TIM ne devrait pas chuter entre CT38 et CT44 mais plutôt continuer à augmenter jusqu'en fin de nuit. Dans tous les cas, PER et TIM oscillent bien chez le mutant et le témoin, reflétant un bon fonctionnement de l'horloge.

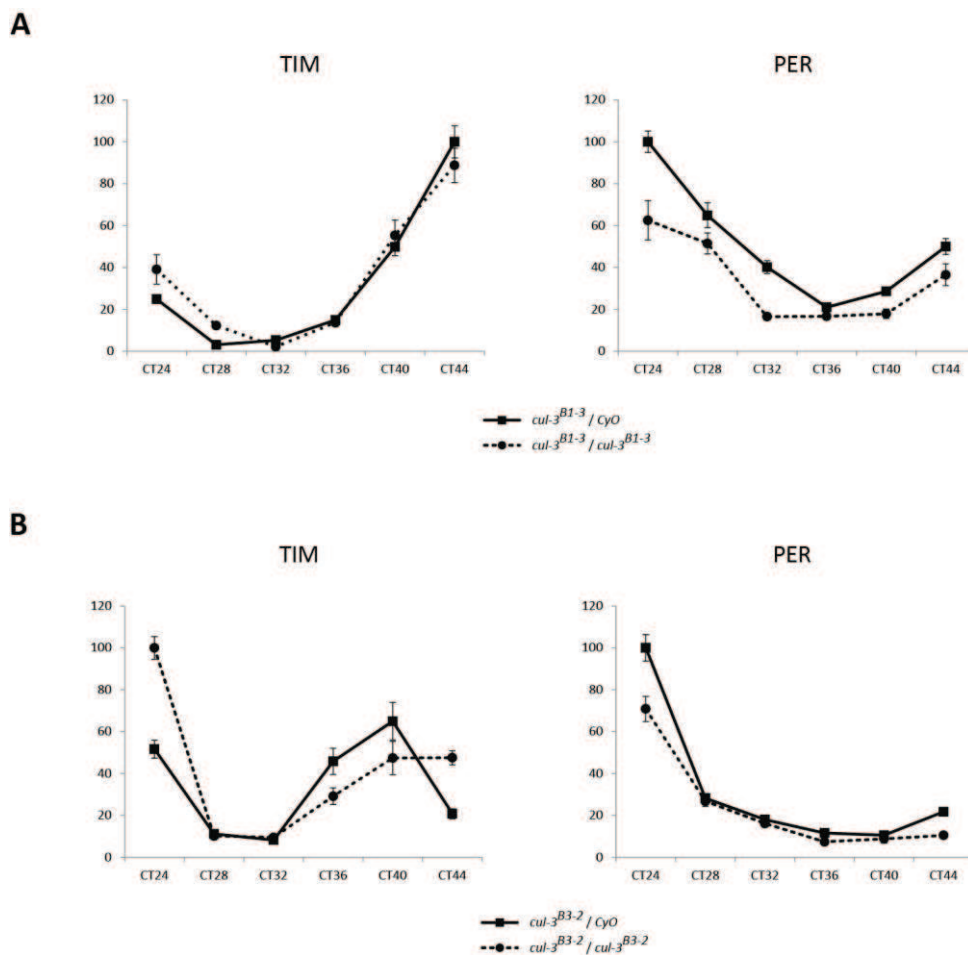


Figure 2 : Oscillations de PER et TIM dans les LNvs des larves mutantes pour la *cullin-3*

Les larves ont été entraînées 3 jours en LD avant d'être placées en DD. Elles ont été disséquées toutes les 4 h à DD2. Les temps sont indiqués en CT (Circadian Time) où CT0 correspond à 12h après l'extinction de la lumière, le dernier jour de LD. PER and TIM ont été quantifiées (voir mat. et méth. article) dans les neurones PDF+ des larves contrôles et des mutants pour la *cullin-3* (A : *cul-3^{B1-3}* ; B : *cul-3^{B3-2}*). Les barres d'erreur représentent la s.e.m.

Au vu des résultats obtenus, les mutations *cul-3*^{B1-3} et *cul-3*^{B3-2} n'affectent pas les oscillations de PER et TIM dans les LNvs chez la larve. Cependant, on peut se demander si ces mutations sont bien des mutations nulles pour la *culline-3*. En effet, nous avons sélectionné ces mutants car il y avait assez d'individus homozygotes pour analyser les oscillations de PER et TIM dans les neurones. Sachant que ces mouches n'atteignent pas la pupaison lors de leur développement, et au vu de l'effet létal plus important dans les autres lignées, on peut penser qu'il y a une expression réduite dans ces souches. L'analyse par Western Blot de l'expression de la *culline-3* a montré une expression réduite dans ces lignées. Cette expression résiduelle doit être suffisante pour leur développement jusqu'au stade L2 et doit permettre à l'horloge de fonctionner. On ne peut cependant pas exclure que le rôle de la *culline-3* dans la régulation de l'horloge est restreint à l'horloge adulte, ce qui expliquerait l'absence d'altération des oscillations de PER et TIM chez la larve.

B – Implication de la *culline-3* dans la régulation de l'horloge par la lumière

Pendant ma thèse, je me suis plus particulièrement intéressé au rôle de la *culline-3* dans la régulation de l'horloge indépendante de la lumière. Cependant, ce gène semble également être impliqué dans une régulation dépendante de la lumière. Comme je l'ai décrit dans l'introduction, la lumière joue un rôle important dans le fonctionnement de l'horloge puisqu'elle permet de la remettre à l'heure. La lumière intervient notamment dans la dégradation de TIM par le protéasome, en impliquant le CRYPTOCHROME et l'ubiquitine ligase SCF^{jetlag}. De plus, nous avons vu que les mouches pourvues de l'allèle *ls-tim* de *tim* étaient moins sensibles à la dégradation par la lumière, du fait de la faible affinité de la protéine L-TIM avec CRY.

En conditions de lumière constante (LL), l'horloge est altérée et les mouches sont arythmiques. Cependant, les mouches mutantes pour *jetlag* et exprimant l'allèle *ls-tim* de *tim* deviennent rythmiques en LL. De notre côté, nous avons remarqué que la dérégulation de la *culline-3*, par différentes mutations dominant-négatives (*cul-3*^{K717R} et *cul-3*^{ΔC}), rendait les mouches rythmiques en LL (Tableau 1). Il faut préciser que cette rythmicité n'est observée que lorsque les mouches possèdent au moins un allèle *ls-tim*. Au vu de ces

résultats comportementaux, la *culline-3* pourrait être impliquée dans la réponse de l'horloge à la lumière.

Génotype	Nombre de mouches	Rythmicité (%)	Période (h)	Puissance
; <i>cry</i> ^b	16	83,3	24,2 ± 0,19	68,5
; <i>ls-tim</i> , <i>jet</i> ^c	16	100	23,1 ± 0,12	144
; <i>tim-gal4 (s-tim) / ls-tim</i>	32	37,5	22,1 ± 0,55	41
; <i>tim-gal4 (s-tim) / ls-tim</i> ; UAS- <i>cul-3</i> ^{K717R} / +	28	93,8	24,4 ± 0,3	65
; <i>tim-gal4 (s-tim) / ls-tim</i> ; UAS- <i>cul-3</i> ^{ΔC} / +	26	91,7	25,5 ± 0,5	108

Tableau 1 : Rythmes d'activité locomotrice des mouches mutantes pour la *culline-3* en LL

Les valeurs de la période sont indiquées avec leur s.e.m.

Nous avons ensuite regardé si les oscillations de PER et TIM étaient restaurées dans les LNd, neurones impliqués dans l'oscillateur du soir et donc la rythmicité en LL (Fig. 3). Au quatrième jour de LL (LL4), à la fois chez le témoin sauvage arythmique et chez le mutant de la *cullin-3*, *cul-3*^{ΔC}, les protéines PER et TIM n'oscillent plus dans les LNd. En voyant les courbes, on pourrait penser qu'il y a oscillations, mais l'amplitude est très faible et ne ressemblent pas aux oscillations de PER et TIM chez le mutant *cry*^b, rythmique en LL.

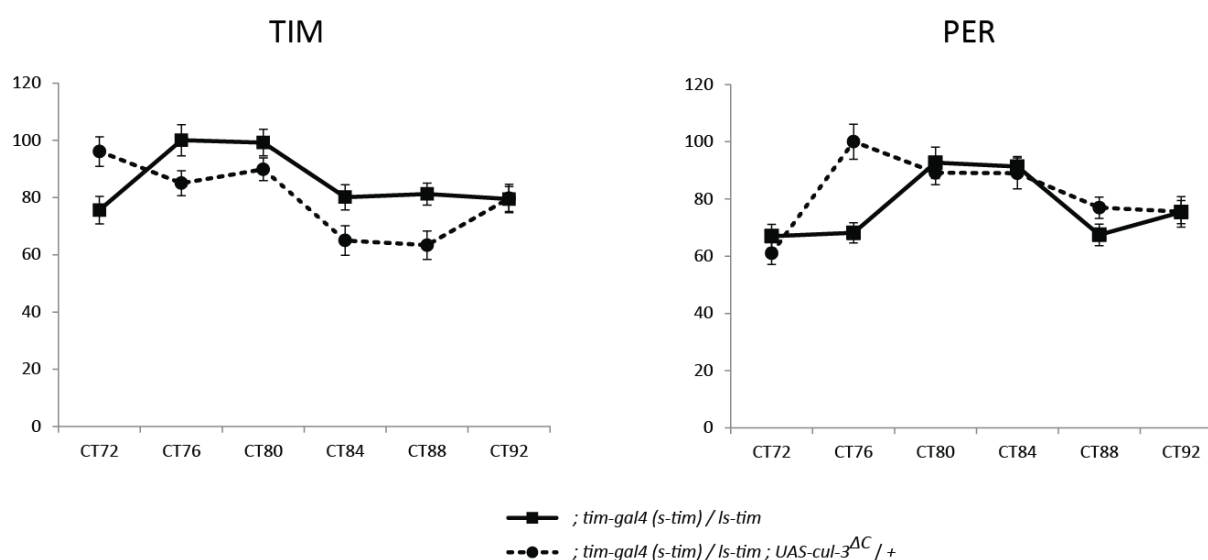


Figure 3 : Oscillations de PER et TIM dans les LNd des mouches mutantes pour la *culline-3*

Les mouches ont été entraînées 3 jours en LD avant d'être placées en LL. Elles ont été disséquées toutes les 4 h au 4^{ème} jour de LL. Les temps sont indiqués en CT (Circadian Time) où CT0 correspond à 12h après l'extinction de la lumière, le dernier jour de LD. PER and TIM

ont été quantifiées (voir matériels méthodes de l'article) dans les LNDs des mouches contrôle et des mutants *cullin-3^{ΔC}*. Les barres d'erreur représentent la s.e.m.

Chez des mouches sauvages, un pulse de lumière de 10 minutes entraîne la dégradation de TIM et le rephasage de l'horloge. Si *la culline-3* est impliquée dans la photoréception, sa dérégulation pourrait altérer la dégradation de TIM suite à un pulse de lumière. Nous avons donc regardé par Western Blot l'effet d'un pulse sur les mutants de la *culline-3* rythmiques en LL (Fig. 4). Le pulse a été effectué à ZT18 et l'effet du pulse sur TIM a été regardé à ZT19. On peut voir une baisse des niveaux de TIM après le pulse aussi bien chez le témoin que chez le mutant *cul-3^{ΔC}*.

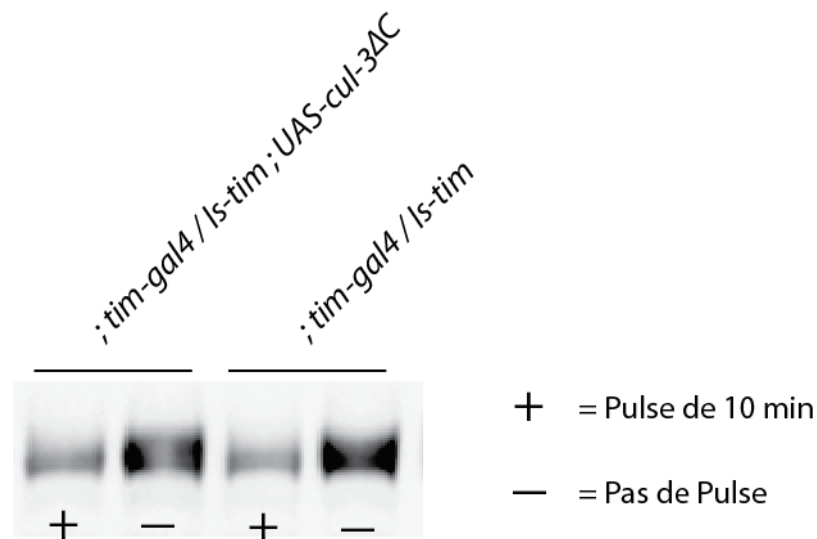


Figure 4 : Effet d'un pulse de lumière sur la dégradation de TIM

Les mouches ont été entraînées 3 jours en LD avant de subir (+) ou non (-) un pulse de lumière de 10 minutes à ZT18. La dégradation de TIM a été observée dans des extraits de tête à ZT19, dans des mouches contrôle et le mutant pour la *culline-3* (*cul-3^{ΔC}*).

Au vu de ces résultats, la dérégulation de ce gène ne restaure pas les oscillations de PER et TIM dans les LND en LL et n'affecte pas la dégradation de TIM suite à un pulse de lumière. La rythmicité en LL pourrait être due à une simple augmentation de la stabilité de TIM avec l'allèle *Is-tim*. Cette stabilisation permettrait d'avoir des niveaux suffisants de TIM pour générer cette rythmicité.

C – Recherche de la(les) protéine(s) à domaine BTB impliquée(s) dans l’horloge

Comme je l’ai signalé dans l’introduction, la *culline-3* est la protéine centrale d’un complexe E3 ubiquitine ligase. Dans ce complexe multiprotéique, la protéine qui va lier le substrat à réguler est une protéine possédant le domaine BTB. La spécificité de ce complexe est donc conférée par cette protéine. Son identification permettrait de mieux caractériser le rôle de ce complexe dans la régulation de l’horloge. Par exemple, ceci nous permettrait d’obtenir une plus grande spécificité pour déterminer exactement la ou les protéines régulées par la *culline-3*. En effet, des expériences de GST-Pull Down avec la protéine à domaine BTB permettrait de trouver la cible directe de ce complexe.

1 – Crible RNAi des protéines à domaine BTB de drosophile

Afin d’identifier la protéine à domaine BTB impliquée dans la régulation de l’horloge, nous avons mis en place un crible RNAi des différentes protéines à domaine BTB de drosophile. Il existe une centaine de ces protéines et nous avons commandé les lignées disponibles (86) dans la banque de RNAi VDRC (Vienna Drosophila RNAi Center).

Ce crible consiste à exprimer les différents RNAi dans les neurones d’horloge avec les pilotes d’expression *tim-gal4* (dans tous les neurones d’horloge) et *gal1118* (dans les LN PDF+ et les LNd CRY-). On analyse ensuite l’activité locomotrice de ces mouches en conditions constantes (DD et LL) afin de déterminer s’il y a une altération de leur comportement (rythmicité et période). Lors d’un premier tour, on analyse le comportement des drosophiles en double hétérozygote (1 copie du pilote d’expression et 1 copie du RNAi). Si on observe un phénotype comportemental, il faudra confirmer ce premier résultat et regarder le phénotype en double homozygote (si la construction n’est pas létale) qui pourrait être plus spectaculaire. En ce qui concerne l’analyse en LL, les mouches sont placées en contexte hétérozygote pour l’allèle *Is-tim* du gène *timeless*. Ces mouches sont placées dans ce contexte puisque le rôle de la *culline-3* dans la régulation de l’horloge par la lumière dépend de cet allèle.

Les résultats ont été assez décevants car nous n’avons obtenu aucun candidat qui aurait pu être impliqué dans la rythmicité en LL. En ce qui concerne une régulation

indépendante de la lumière, peu de candidats ont été trouvés. Parmi ceux-ci, un seul s'est révélé positif après une deuxième analyse et passage en double homozygote. Ce gène est le CG12052 qui correspond au gène *lola* dont je vous parlerai dans la suite des résultats. Les résultats obtenus pour ce gène lors du crible sont présentés dans le tableau 2.

Génotype	Nombre de mouches	Rythmicité (%)	Période (h)	Puissance
<i>; tim-gal4 / +</i>	15	100	23,8 ± 0,07	189
<i>; tim-gal4 / UAS-RNAi-CG12052(12574)</i>	10	80	24,8 ± 0,13	122
<i>; tim-gal4 / + ; UAS-RNAi-CG12052(12573) / +</i>	8	87,5	24,3 ± 0,16	137
<i>;; gal1118 / +</i>	12	100	24,3 ± 0,07	215
<i>; UAS-RNAi-CG12052(12574) ; gal1118 / +</i>	6	100	25,2 ± 0,21	142
<i>;; gal1118 / UAS-RNAi-CG12052(12573)</i>	6	100	24,8 ± 0,17	212
<i>;; gal1118</i>	32	100	24,6 ± 0,05	199
<i>; UAS-RNAi-CG12052 (12574) ; gal1118</i>	48	93,5	25,5 ± 0,17	92,6

Tableau 2 : Rythmes d'activité locomotrice des mouches mutantes pour CG12052 en DD

Les valeurs de la période sont indiquées avec leur s.e.m.

Au vu des résultats peu concluants de ce crible, il faudrait le refaire dans d'autres conditions. Il existe une autre banque RNAi située à Kyoto : la banque NIG-FLY (Fly Stocks of National Institute of Genetics). Les RNAi issus de cette banque semblent avoir une expression plus forte que ceux issus de VDRC, au vu des résultats obtenus au laboratoire. L'utilisation de ces RNAi dans un crible pourrait permettre d'obtenir de nouveaux résultats pour identifier la protéine à domaine BTB. Dans une approche complémentaire, ce crible pourrait également être réalisé en co-exprimant Dicer. Dicer est une enzyme impliqué dans le fonctionnement des RNAi. De manière simplifiée, Dicer coupe l'ARN double brin, exprimé par la construction RNAi, en petits fragments qui vont reconnaître l'ARN à « neutraliser ». Il a été montré que la co-expression de Dicer et d'un RNAi augmentait l'effet inhibiteur du RNAi. L'utilisation de Dicer dans un tel crible permettrait également d'obtenir de meilleurs résultats.

2 – Etude du gène *kelch*

Comme décrit précédemment, *la culline-3* pourrait jouer un rôle dans la dégradation par la lumière. Nous avons donc essayé de trouver la protéine à domaine BTB impliquée dans cette régulation, en testant des candidats déjà décrits comme impliqués dans une dégradation dépendante de Cul-3.

Dans la voie Wnt chez les mammifères, il a été montré que KLHL12 faisait partie d'un complexe Cul-3 impliqué dans la dégradation de Dishevelled (Angers et al., 2006). Chez la *Drosophile*, *kelch* présente de grandes similarités de séquences avec KLHL12. L'analyse comportementale montrait que la mutation de *kelch* (*kelch^{DE1}*) induisait une rythmicité des mouches en conditions de lumière constante (LL) (Tableau 3).

Génotype	Nombre de mouches	Rythmicité (%)	Période (h)
<i>w¹¹¹⁸;;cry^b</i>	16	93,8	24,3 ± 0,15
<i>;; kelch^{DE1} / CyO</i>	13	38,5	30,1 ± 1,96
<i>;; kelch^{DE1}</i>	17	88,2	24,1 ± 0,58

Tableau 3 : Rythmes d'activité locomotrice de mutants *kelch* et de la *culline-3* en LL

Les valeurs de la période sont indiquées avec leur s.e.m.

D'autre part, l'analyse de PER et TIM dans les LNds et le 5^{ème} s-LNV PDF-négatif (neurones impliqués dans l'oscillateur du soir) montrait des oscillations de ces protéines en LL. Kelch pourrait donc être impliqué dans la stabilité de TIM en LL.

Comme je l'ai présenté dans l'introduction, il a été montré, ultérieurement aux expériences que nous avons réalisé avec Kelch, que différents allèles de *tim* étaient retrouvés dans la nature. Parmi ces allèles, *ls-tim* permet de générer une forme courte (S-TIM) et une forme longue (L-TIM) de TIM. La forme longue est moins sensible à la lumière et son association à la mutation *jet^c* de *jetlag* rend les mouches rythmiques en LL. Tout phénotype rythmique en LL doit donc prendre en compte ces données et la vérification des allèles de *tim* et *jetlag* doit être effectuée. Nous avons alors regardé ces allèles chez le mutant *kelch^{DE1}* et nous avons trouvé qu'il possédait les allèles *ls-tim* et *jet^c*. La rythmicité en

LL pouvait donc être liée à la présence de ces allèles. Nous avons donc récupéré d'autres mutants de *kelch* afin de confirmer ou non le rôle de ce gène dans une régulation de l'horloge dépendante de la lumière. Certains de ces mutants étaient rythmiques et d'autres arythmiques en LL. Nous avons alors génotypé ces différents mutants pour les allèles *tim* et *jetlag*. Tous les mutants rythmiques possédaient la combinaison *ls-tim, jet^c*. De plus, nous avons effectué des outcross sur le mutant *kelch^{DE1}* pour le mettre en contexte *s-tim, jet⁺*. Ce mutant s'est révélé arythmique en LL. Kelch n'est donc pas la protéine à domaine BTB participant à la régulation de l'horloge par la lumière.

3 – Etude du gène *lola*

Suite au crible des protéines à domaine BTB, le seul candidat restant, après vérification des quelques positifs, est le *CG12052*. Ce gène est connu sous le nom de *lola* (*longitudinals lacking*). Ce gène a été étudié dans différents processus physiologiques et est notamment impliqué dans le guidage axonal (Goeke et al., 2003), le développement des projections cellulaires (Spletter et al., 2007) ou bien encore la locomotion (Yamamoto et al., 2008).

La vérification des résultats du crible a confirmé un léger allongement de période (+ 0,5 h) en double hétérozygote. En double homozygote pour le pilote d'expression et le RNAi, les mouches présentent un allongement de période d'une heure (Tableau 4).

Génotype	Nombre de mouches	Rythmicité (%)	Période (h)	Puissance
<i>;; gal1118 / +</i>	19	89,5	24,6 ± 0,12	218
<i>; UAS-lola-RNAi / + ; gal1118 / +</i>	12	100	25,2 ± 0,13	141
<i>;; gal1118</i>	32	100	24,6 ± 0,05	199
<i>; UAS-lola-RNAi ; gal1118</i>	48	93,5	25,5 ± 0,17	92,6

Tableau 4 : Rythmes d'activité locomotrice pour les mouches mutantes pour *lola* en DD

Les valeurs de la période sont indiquées avec leur s.e.m.

Du fait du rôle connu de *lola* dans le guidage axonal et le développement des projections cellulaires, nous avons regardé la morphologie des neurones PDF-positifs (Fig. 5).

Les s-LNvs et les l-LNvs sont présents avec des projections normales. La dérégulation de *lola* n'entraîne pas de défauts de développement qui auraient pu être responsables de cet allongement de période.

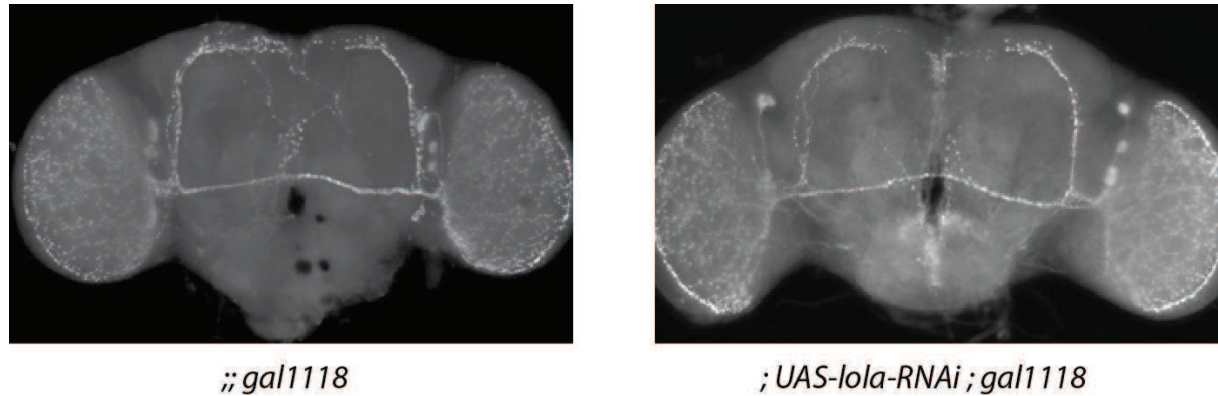


Figure 5 : Morphologie des LNvs PDF-positifs chez un mutant de *lola*

Stacks de sections optiques de cerveaux adultes immunomarkés avec un anticorps dirigé contre le PDF.

Nous avons ensuite regardé s'il existait une interaction entre Lola et TIM par co-immunoprécipitation. Il faut préciser qu'il existe un épissage alternatif de *lola* générant 19 transcrits différents (Goeke et al., 2003). Nous avons récupéré un anticorps dirigé contre Lola qui reconnaît une partie des produits de ces 19 transcrits. Pour cette expérience, nous avons immunoprécipité TIM, étiquetée HA, afin de voir si TIM interagissait avec l'une des formes de Lola. Nous n'avons pas pu observer de signal caractéristique d'une interaction Lola-TIM, puisque le signal observé avec les mouches *tim⁰*, *tim-HA* en contexte *per⁺* (pistes B) ou *per⁰* (pistes C) est le même que le témoin négatif (lignes A) (Fig. 6).

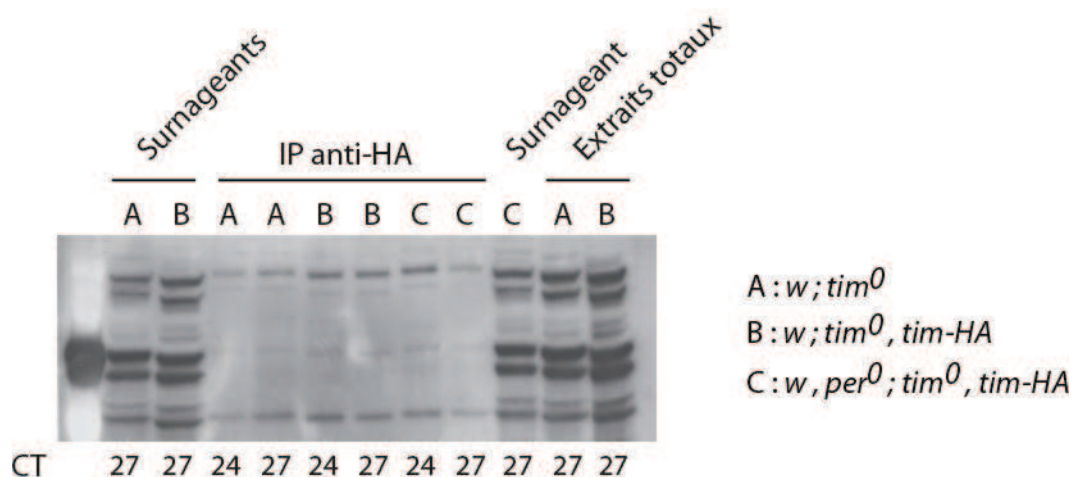


Figure 6 : Interactions entre TIM et Lola

Immunoprécipitation anti-TIM-HA dans des extraits de tête, suivie de la révélation de Lola. Les puits A représentent les contrôles négatifs et les puits B et C sont respectivement en contexte *per⁺* et *per⁰*. Les mouches ont été entraînées 3 jours en LD avant d'être placées en DD pour être collectées à CT24 et CT27.

Au vu des résultats obtenus, *lola* ne semble pas coder la protéine à domaine BTB impliquée putativement dans la régulation de TIM. Cependant, du fait du grand nombre de transcrits de *lola*, on peut se demander si l'anticorps utilisé reconnaît ou non la forme de Lola qui pourrait être impliqué dans la régulation de l'horloge. Nous ne pouvons pas expliquer l'allongement de période dû à la dérégulation de *lola* par RNAi. Il est possible qu'elle régule TIM mais que son rôle dans le développement neuronal engendre des défauts responsables de ce phénotype.

4 – Etude du gène CG3571

Un des projets développé au laboratoire par A. Szabo est la recherche de nouveaux partenaires de TIMELESS. Cette recherche consiste à immunoprécipiter en grande quantité la protéine TIM, étiquetée HA, afin d'identifier ses partenaires par spectrométrie de masse. Parmi les candidats obtenus, l'un d'entre eux est une protéine à domaine BTB: CG3571 (aussi nommée dKLHL18). En 2009, il a d'ailleurs été montré que CG3571 interagissait avec la Culline-3 et servait donc d'adaptateur dans ce type d'ubiquitine ligase (Fujiyama-Nakamura et al., 2009).

L'étude comportementale des mouches transgéniques exprimant différents RNAi dirigés contre le CG3571 montre un allongement de période (RNAi de la banque VDRC : 43777 et 43778) ou une arythmicité des drosophiles (RNAi de la banque NIG-FLY : R1 et R4) (Tableau 5).

Génotype	Nombre de mouches	Rythmicité (%)	Période (h)	Puissance
<i>; tim-gal4</i>	16	100	24,6 ± 0,15	93
<i>; tim-gal4, UAS-RNAi-CG3571(43778) / tim-gal4</i>	8	87,5	25,4 ± 0,28	163
<i>; tim-gal4 ; UAS-RNAi-CG3571(43777)</i>	16	100	25,1 ± 0,18	134
<i>; tim-gal4,UAS-RNAi-CG3571R4</i>	17	47,1	24,3 ± 0,21	89
<i>; tim-gal4,UAS-RNAi-CG3571R4 ; UAS-RNAi-CG3571R1 / +</i>	12	33,3	24,1 ± 0,47	91

Tableau 5 : Rythmes d'activité locomotrice pour les mutants du gène CG3571 en DD

Les valeurs de période sont indiquées avec leur s.e.m.

Nous avons ensuite utilisé le phénotype le plus fort, induisant une arythmicité avec la combinaison des deux RNAi de NIG-FLY (*; tim-gal4, UAS-RNAi-CG3571R4 ; UAS-RNAi-CG3571R1 / +*), afin de regarder si les oscillations de PER et TIM, dans les s-LNvs, étaient affectées (Fig. 7). Les résultats obtenus ne montrent pas de réelles différences entre le témoin et le mutant pour les oscillations de PER et TIM au deuxième jour d'obscurité constante (DD2).

De manière surprenante, PER et TIM ne semblent pas être affectées dans les s-LNvs. Cependant, ces mouches mutantes pour CG3571 semblent mettre plusieurs jours avant de devenir vraiment arythmiques. L'analyse des oscillations de ces protéines au cinquième jour de DD, lorsque les mouches sont bien arythmiques, serait donc plus intéressante (expérience en cours).

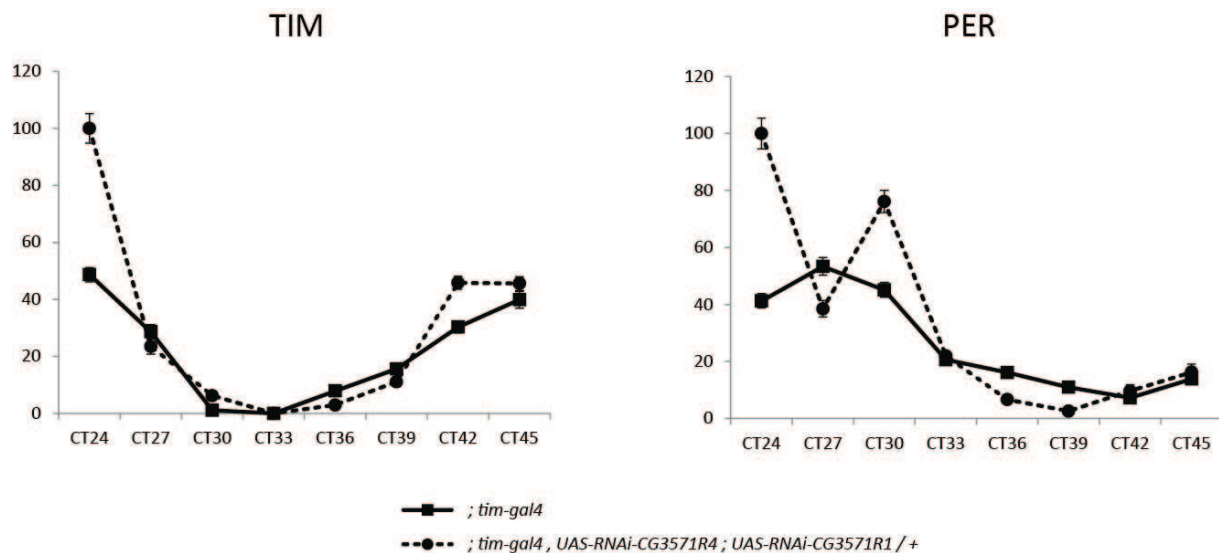


Figure 7 : Oscillations de PER et TIM dans les s-LNvs des mouches mutantes pour CG3571

Les mouches ont été entraînées 3 jours en LD avant d'être placées en DD. Elles ont été disséquées toutes les 3 h au 2^{ème} jour de DD. Les temps sont indiqués en CT (Circadian Time) où CT0 correspond à 12h après l'extinction de la lumière, le dernier jour de LD. PER and TIM ont été quantifiées (voir matériels méthodes de l'article) dans les s-LNvs des mouches contrôle et des mutants pour CG3571. Les barres d'erreur représentent la s.e.m.

Nous avons ensuite regardé si la protéine CG3571 pouvait être impliquée dans la régulation de TIM par co-immunoprécipitation. Pour se faire, nous avons récupéré des mouches transgéniques exprimant une version étiquetée FLAG de CG3571 du laboratoire de S. Kato à Tokyo (il n'y a pas encore d'anticorps dirigés contre CG3571). Nous n'avons pas pu mettre en évidence d'interactions entre CG3571 et TIM par co-immunoprécipitation (Fig. 8).

Il faut quand même noter que l'expression de ce transgène n'est pas très forte : il faut généralement des temps d'exposition plus courts pour vérifier la surexpression d'une protéine étiquetée (Fig. 8). D'autre part, l'interaction entre Cul-3 et TIM, montrée dans le papier, est plus visible en contexte mutant hétérozygote pour la *cullin-3* (diminuant ainsi la compétition avec la Culline-3 endogène), et en se mettant en contexte *per*⁰ (la fonction de la *cullin-3* sur TIM étant indépendante de PER). Pour conclure à une éventuelle interaction entre CG3571 et TIM, il faudrait donc refaire l'expérience en diminuant les niveaux endogènes de CG3571 et en se mettant en contexte mutant pour *per* (en cours). Pour cela,

Western blot analysis of TIM and FLAG protein levels. The left blot shows TIM levels across lanes B₁, B₁, A₁, B₁, A₂, B₂, and A₁. The right blot shows FLAG levels across lanes B₂, A, B, B₁, and A₁. Both blots include 'Extrait total' and 'IP anti-FLAG' sections.

A: *w; tim-gal4/+*
 B: *w; tim-gal4/+; UAS-CG3571-FLAG*

Immunoprécipitation anti-CG3571-FLAG dans des extraits de tête, suivie de la révélation de TIM (à gauche) et FLAG (à droite). Les puits A représentent les contrôles négatifs. Les mouches ont été entraînées 3 jours en LD avant d'être placées en DD pour être collectées à CT24 (A1, B1) et CT30 (A2, B2).

111

DISCUSSION

DISCUSSION

La régulation fine des oscillations de PER et TIM est nécessaire au bon fonctionnement de l'horloge et à la génération d'une période de 24 heures. La dégradation de ces protéines est donc un mécanisme indispensable. Il a déjà été publié que SCF^{Slmb} contrôle la dégradation de PER, mais également de TIM. TIM est principalement dégradée à la lumière via le cryptochrome et le complexe SCF^{Jetlag}. Cependant, Slmb et Jetlag ne régulent pas tous les aspects du contrôle de la stabilité de PER et TIM.

Les voies de signalisation Wnt/Wingless et Hedgehog partagent de nombreux points communs avec l'horloge. On retrouve notamment certaines kinases et l'ubiquitine ligase SCF^{Slmb}. Dans ces deux voies, un complexe Cul-3 contrôle également la stabilité des effecteurs de ces voies. Au vu des mécanismes conservés entre ces différentes voies, nous nous sommes demandé si la *culline-3* ne pourrait pas également réguler la stabilité des protéines d'horloge et ainsi mettre en avant de nouveaux aspects dans la régulation de PER et TIM.

1 – La Culline-3 est impliquée dans la régulation de l'horloge

Les mutations nulles de la *culline-3* engendrent une létalité développementale en homozygote et les mutants hétérozygotes n'ont aucun phénotype comportemental. Nous avons donc utilisé des mutations hypomorphes (RNAi et formes dominant-négatives) dont l'expression dans les neurones d'horloge permet l'obtention de mouches adultes viables. L'expression de ces différents transgènes dans les neurones d'horloge conduit à une arythmicité des mouches en obscurité constante. D'autre part, la morphologie des neurones à PDF, responsable de la rythmicité en DD, ne présente pas de défauts majeurs qui auraient pu être responsables du comportement arythmique en DD. La *culline-3* régule donc un composant de l'horloge.

2 – Régulation circadienne de TIM par Cul-3

A quel niveau de l'horloge agit Cul-3 ? Quels composants sont altérés chez ces mutants, conduisant à cette arhythmicité ? Pour répondre à ces questions, nous avons regardé si PER et TIM, deux acteurs principaux de l'horloge, étaient altérés chez ces mutants. Dans des extraits de tête, la phosphorylation de PER et TIM est modifiée en DD. Ces défauts sont plus importants pour TIM, dont l'état phosphorylé persiste à tous les temps en DD. Dans les s-LN_v, neurones responsables de la rythmicité en conditions constantes (DD), les oscillations de PER et TIM sont touchées. TIM est également plus affecté : TIM n'oscille plus et les oscillations de PER sont réduites. TIM semble donc être plus touché que PER. D'autre part, en absence de PER, TIM reste également phosphorylé chez les mutants *cul-3^{K717R}*. En ce qui concerne PER en *tim⁰*, la protéine est légèrement plus phosphorylée mais l'effet reste mineur en comparaison de l'effet sur TIM en *per⁰*.

TIM semble donc être la cible principale de Cul-3 et cet effet sur TIM est indépendant de PER. On peut donc penser que Cul-3 contrôle la stabilité de TIM, directement ou indirectement, quand il n'est pas lié à PER. De plus, PER et TIM étant partenaires, on peut penser que les effets sur PER ne sont, au moins en partie, qu'une conséquence de l'altération de TIM.

La Culline-3 fait partie de la famille des RING ubiquitine ligases dont le rôle est de contrôler la stabilité des protéines. Le fait que TIM ne cycle plus et soit phosphorylé à tous les temps en DD en absence de Cul-3 suggère que Cul-3 agit sur TIM post-traductionnellement. Si Cul-3 jouait sur la transcription de PER et TIM, on devrait observer des défauts au niveau des ARN avant les effets sur les protéines. Or ce n'est pas le cas, TIM n'oscille plus dès le deuxième jour de DD (DD2) alors que ses ARN oscillent toujours bien à DD2. La diminution d'amplitude des oscillations des ARN *per* et *tim* observée ultérieurement est donc une conséquence de l'effet sur les protéines : PER et TIM phosphorylées s'accumulent pendant la journée subjective (au lieu d'être dégradées) et répriment donc un peu plus la transcription dépendante de CLK-CYC.

Au vu de ces résultats, Cul-3 doit contrôler la stabilité de TIM. On ne peut pas encore dire si ce contrôle est direct ou indirect. Cul-3 pourrait très bien être responsable de la dégradation de TIM mais pourrait également jouer sur une protéine contrôlant sa stabilité. Si Cul-3 contrôlait la dégradation d'une kinase de TIM, l'absence de Cul-3 pourrait expliquer la persistance de phosphorylation de TIM et l'altération de l'horloge. Aujourd'hui, on sait que SGG et CK2 phosphorylent TIM. La phosphorylation de TIM par SGG est nécessaire à son entrée dans le noyau et CK2 contrôle sa stabilité et son entrée dans le noyau. Cependant, la dérégulation de Cul-3 n'engendre aucun changement de la quantité de ces kinases en Western blot. Si Cul-3 joue sur une kinase de TIM, il se pourrait que ce soit au niveau de son activité et non sa dégradation, ou bien qu'il existe une autre kinase de TIM, encore non identifiée, qui soit régulée par Cul-3. De manière similaire, on ne peut pas exclure que l'activité d'une kinase ne soit pas régulée par Cul-3 : en absence de Cul-3, cette phosphatase ne serait pas activée et ne contrebalancerait plus la phosphorylation de TIM. PP1 pourrait d'ailleurs être un bon candidat puisque PP1 stabilise TIM en début de nuit (Fang et al., 2007).

3 – Cul-3 reconnaît les formes hypophosphorylées de TIM

En DD, on observe une accumulation de formes phosphorylées de TIM chez les mutants pour la *culline-3*. Cependant, au cours des expériences d'immunoprécipitation, nous avons pu observer que les formes de TIM qui ont été co-immunoprécipitées avec Cul-3 sont des formes hypophosphorylées. On peut penser que les formes hypophosphorylées de TIM sont stabilisées en absence de Cul-3. Ces formes seraient ensuite phosphorylées, expliquant les observations en Western blot où TIM est phosphorylé à tous les temps.

4 – Nouveau contrôle de TIM à la lumière ?

La Cullin-3 contrôle donc la stabilité de TIM en absence de lumière. Dans la littérature, la dégradation de TIM par la lumière a été plus largement décrite. En réponse à la lumière, CRY est activé et interagit avec TIM, ce qui conduit à sa dégradation via l'ubiquitine ligase SCF^{Jetlag}. Les mutants *cry* et *jetlag* sont rythmiques en LL. Le fait que la dérégulation de la *culline-3* (*cul-3*^{K717R} et *cul-3*^{ΔC}) rende également les mouches rythmiques en LL, cela

suggère que Cul-3 participe également à la dégradation de TIM par la lumière. Cependant, la dégradation de TIM, après des pulses de lumière, n'est pas affectée chez les mutants *cul-3*, et TIM oscille bien en LD, aussi bien en Western blot que dans les s-LNV. En revanche, l'analyse des éductions en LD, chez les mutants *cul-3*, montre l'absence de pic d'anticipation du matin, généré par les oscillations de PER et TIM dans les s-LNV, alors que la dérégulation de *cul-3* (RNAi et *cul-3*^{K717R}) n'altère ces oscillations qu'à partir de DD2. Il se pourrait que les protéines TIM aient un défaut de phosphorylation, ne les empêchant pas d'osciller et d'être dégradées par SCF^{Jetlag}, bien que leur fonction soit altérée, ce qui expliquerait l'absence de pic du matin en LD.

Si Cul-3 est impliqué dans le contrôle de la stabilité de TIM à la lumière, il se pourrait que sa fonction soit seulement redondante avec SCF^{Jetlag}, qui reste le principal acteur. La rythmicité en LL serait essentiellement provoquée par de légères variations de la quantité de TIM, stabilisé par l'absence de Cul-3 et l'allèle *ls-tim*. Cependant, rien ne nous permet de conclure à un effet direct sur TIM. Il se pourrait que Cul-3 joue à un autre niveau.

5 – La place de Cul-3 dans l'horloge

Le contrôle de la stabilité de TIM en DD fait donc intervenir deux ubiquitine ligases : SCF^{Slmb}, centré autour de la Culline-1, et un complexe centré autour de la Culline-3. Ce dernier joue sur des formes hypophosphorylées de TIM, alors que Slmb contrôle la stabilité des formes phosphorylées de TIM. L'interaction entre Cul-3 et TIM augmente en *per*⁰, c'est-à-dire quand TIM est cytoplasmique et hypophosphorylé. De plus, l'effet de Cul-3 sur TIM est augmenté quand PER est absent. On peut donc penser que Cul-3 contrôle la stabilité de TIM dans le cytoplasme et que ce contrôle s'exerce sur les protéines TIM libres, c'est-à-dire quand TIM n'est pas liée à PER. Il faut noter que les formes hypophosphorylées de TIM sont cytoplasmiques et non liées à PER le soir. Cul-3 pourrait donc réguler TIM à ce moment du cycle. Il faut toutefois noter que nous n'observons pas une forte accumulation de TIM cytoplasmique chez les mutants *cul-3* : TIM pourrait être dégradée par une autre ubiquitine ligase ou Cul-3 pourrait avoir une autre fonction. Le contrôle cytoplasmique de TIM reflète mieux les résultats obtenus mais tout n'est pas encore clair.

Le contrôle de la stabilité de PER et TIM permet de contrôler le délai d'accumulation entre les ARN *per/tim* et leurs protéines le soir en début de nuit. De plus, on sait que TIM protège PER de la dégradation. Le contrôle de la stabilité de TIM par un complexe Cul-3 pourrait donc jouer à ce niveau, en retardant l'accumulation des protéines PER et TIM dans le cytoplasme (Fig. 26).

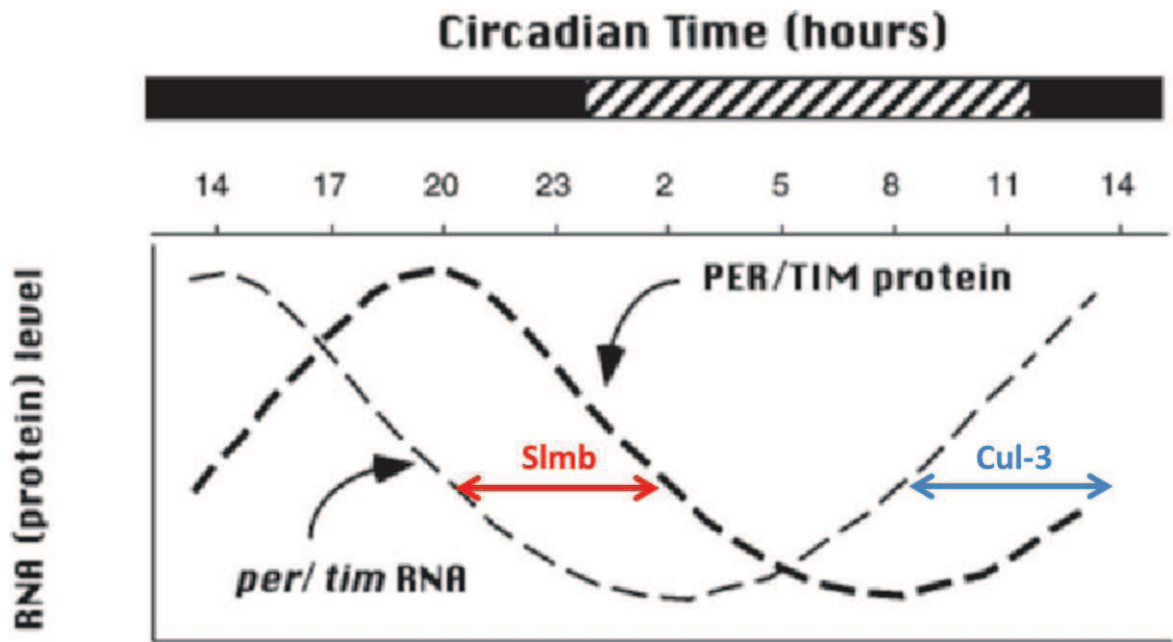


Figure 26 : Contrôle du délai d'accumulation entre les ARN et les protéines PER/TIM par Slmb et Cul-3.

Cul-3 retarde l'accumulation de PER et TIM, et Slmb contrôle la fin de la répression de la transcription de *per* et *tim*.

En ce qui concerne Slmb, son interaction avec TIM est plus faible en *per*⁰. D'autre part, chez les mutants *slmb* en *per*⁰, l'accumulation des formes phosphorylées de TIM est réduite en comparaison avec les mutants *slmb* en *per*⁺. Slmb contrôle donc la stabilité des formes phosphorylées de TIM liées à PER. Slmb agirait donc plus tard que Cul-3, c'est-à-dire pendant la nuit, lorsque les complexes PER-TIM se forment.

En fin de cycle, TIM est dégradé avant PER, suggérant donc que la dégradation de TIM se déroule lorsque PER et TIM sont liés dans le noyau. Slmb pourrait donc être

responsable de la dégradation de TIM à ce moment du cycle. PER serait alors libre, pourrait continuer à réprimer la transcription dépendante de CLK-CYC avant d'être dégradé par Slmb. Ce contrôle permettrait donc de contrôler la fin de la répression de CLK-CYC (Fig. 26).

Dans ce modèle, on a donc deux ubiquitine ligases qui régulent la dégradation de TIM à deux moments bien distincts du cycle. L'intérêt d'un tel système est de pouvoir bien réguler et ajuster les différentes phases du cycle. D'une part, Cul-3 contrôle l'accumulation de PER et TIM dans le cytoplasme et participe donc à définir l'entrée dans le noyau de ces protéines et le début de la répression de CLK-CYC. D'autre part, Slmb va contrôler la fin de répression de CLK-CYC (Fig. 27).

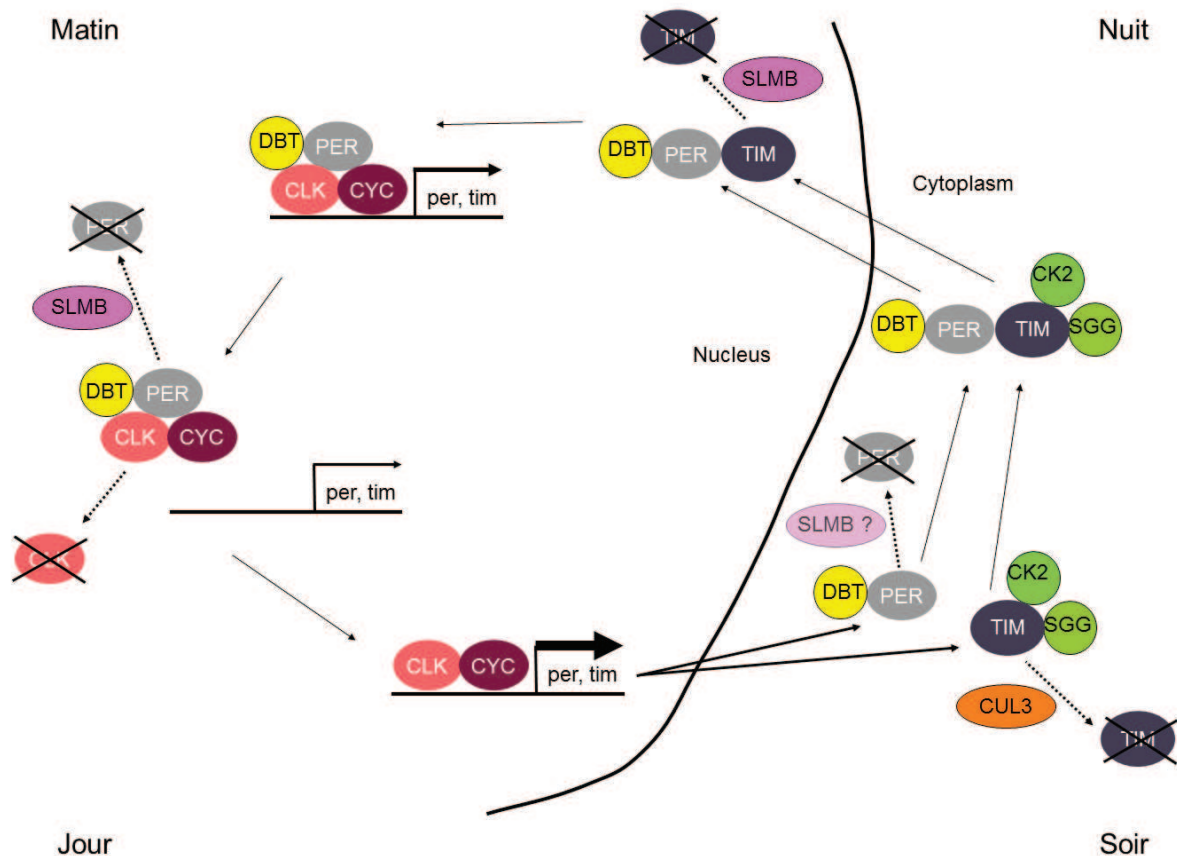


Figure 27 : La dégradation de PER et TIM par Slmb et Cul-3 tout au long du cycle circadien.

Cul-3 dégrade TIM dans le cytoplasme pour retarder l'accumulation de TIM le soir : PER n'est pas stable et est dégradée par Slmb. Dans le noyau, TIM est dégradée par Slmb, PER alors libre et réprime CLK-CYC, avant d'être dégradée à son tour par Slmb.

La régulation de TIM par Slmb et Cul-3 rappelle fortement la dégradation de Ci dans la voie Hedgehog. En effet, la stabilité des formes hypophosphorylées de TIM et Ci sont régulées par un complexe Cul-3, alors que Slmb contrôle la stabilité des formes phosphorylées de ces protéines. Dans la voie Hedgehog, Slmb permet de générer la forme répressive de Ci et Cul-3 induit la dégradation de Ci afin de stopper la transcription des gènes cible. Quant au contrôle de la stabilité de TIM, elle permet d'induire le début et la fin de la répression de la transcription de PER et TIM. On a donc un autre mécanisme conservé entre ces deux voies qui régule les phases de transcription des effecteurs de ces voies.

6 – Perspectives

La dégradation des protéines d'horloge est très importante pour déterminer les différentes phases du cycle circadien. Cul-3 semble jouer un rôle important en retardant l'accumulation des protéines PER et TIM peu phosphorylées. Cependant, son mécanisme d'action reste encore incertain.

La stabilité de TIM dépend de Cul-3 mais est-ce un contrôle direct ? Il se pourrait qu'une kinase de TIM soit la cible directe : en absence de Cul-3, cette kinase pourrait phosphoryler TIM constitutivement. Bien que les profils de SGG et CK2 (deux kinases connues pour phosphoryler TIM) ne bougent pas en absence de Cul-3, il se pourrait que l'une ou l'autre soit responsable de cette persistance de phosphorylation. La perte de fonction de *sgg* ou *ck2* engendre une létalité des mouches. En présence ou non d'un RNAi-*sgg*, la phosphorylation de TIM persiste chez les mutants *cul-3*^{K717R}. Cet effet semble donc être indépendant de SGG, mais une titration du RNAi ne peut être exclue. Pour étudier une éventuelle implication de CK2, nous avons utilisé un transgène de *tim* délété d'une région riche en Sérines (*tim*^{Δ260-292}). Cette forme de TIM n'est pas phosphorylé et il lui manque notamment des sites de phosphorylation par CK2. Que ce soit en contexte sauvage ou *cul-3*^{K717R}, TIM^{Δ260-292} n'est pas phosphorylée. L'absence d'effet de Cul-3 suggère que cette région de TIM contient des sites de phosphorylation nécessaires à la reconnaissance de TIM par Cul-3. CK2 pourrait donc phosphoryler TIM pour contrôler sa stabilité.

Afin d'élucider l'implication ou non de ces kinases, des expériences dans des cellules S2 (cellules de drosophile) nous permettraient de nous affranchir de la létalité des mutants. L'inhibition par RNAi de ces kinases permettrait notamment de déterminer si TIM est phosphorylée par SGG ou CK2 et si ces phosphorylations sont nécessaires à la dégradation de TIM par Cul-3. Nous pourrions également déterminer si la Culline-3 est impliquée dans la régulation des kinases.

La spécificité des complexes Cul-3 est conférée par la protéine à domaine BTB. Nous n'avons pas encore identifié cette protéine, mais il serait tout à fait envisageable que Cul-3 ait une fonction indépendante de la BTB. *CG3571* est un candidat intéressant mais rien ne permet encore de dire s'il est impliqué dans la régulation de TIM. Les IP et l'analyse des oscillations de PER et TIM en DD nous permettront de valider ou non son implication dans cette régulation. D'autre part, refaire le crible dans de meilleures conditions (RNAi DGRC et utilisation d'un UAS-*dicer*) pourrait permettre d'identifier de nouveaux candidats. Récemment, une protéine à domaine BTB, Chinmo (Chronologically inappropriate morphogenesis), a été identifiée dans un crible (Kula-Eversole et al., 2010). Les ARN de *chinmo* sont enrichis dans les s-LNV et les l-LNV, par rapport à leur expression dans des neurones non d'horloge. De plus, ces ARN cyclent dans ces neurones en LD, avec un très fort enrichissement à ZT12 dans les s-LNV. Les oscillations des ARN rejoignent celles de TIM et pourraient donc contrôler TIM en début de cycle. Des mutants pour ce gène ont été commandés et vont bientôt être analysés.

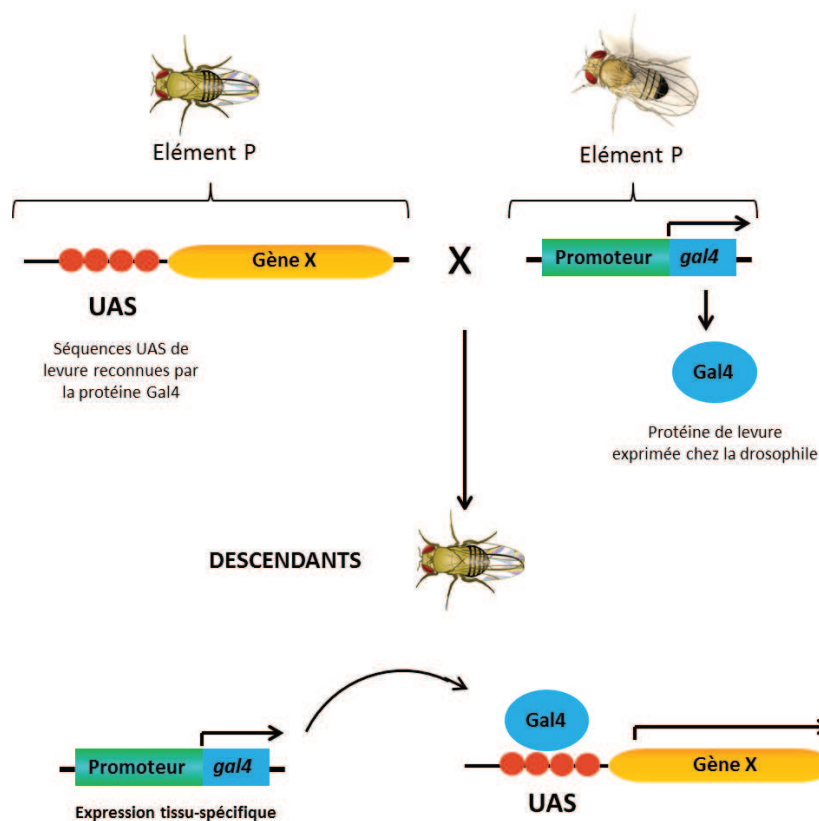
L'identification de la protéine à domaine BTB est une étape clé pour comprendre le mécanisme d'action de Cul-3. Elle permettrait la réalisation d'expériences plus spécifiques, notamment en culture de cellules S2. Ces expériences nous permettraient notamment d'identifier la cible de Cul-3 en regardant si la cible putative est toujours dégradée en absence de la BTB. De plus, la co-transfection de Cul-3 et d'une forme étiquetée de la BTB avec la cible putative (TIM, CK2 ou encore SGG), permettrait de déterminer si cette cible interagit avec la BTB. Si une cible est identifiée, nous pourrions regarder si Cul-3 induit son ubiquitination et sa dégradation. L'utilisation d'une forme étiquetée d'ubiquitine (HA-Ub) nous permettra de regarder si des formes ubiquitinylées de cette cible s'accumulent en inhibant le protéasome (utilisation de MG132 par exemple). D'autre part, nous pourrions observer si l'inhibition de *cul-3* par RNAi empêche cette cible d'être ubiquitinylée.

La dérégulation de la *culline-3* induit une rythmicité des mouches en LL, suggérant une fonction dans la photoréception. TIM joue un rôle essentiel puisqu'il est dégradé à la lumière. Cependant, rien ne nous permet de conclure à un contrôle exercé par Cul-3 sur TIM dans ces conditions. En utilisant le système de cellules S2, nous pourrions regarder si Cul-3 induit la dégradation de TIM à la lumière, en absence de Jetlag, et ainsi déterminer un quelconque contrôle sur TIM. D'autre part, l'identification de la protéine à domaine BTB nous permettrait également de mieux comprendre ce rôle. Elle nous permettrait d'identifier la cible de ce complexe, en regardant notamment les différentes protéines connues pour réguler l'horloge circadienne.

ANNEXES

ANNEXE 1 : LE SYSTEME UAS-GAL4

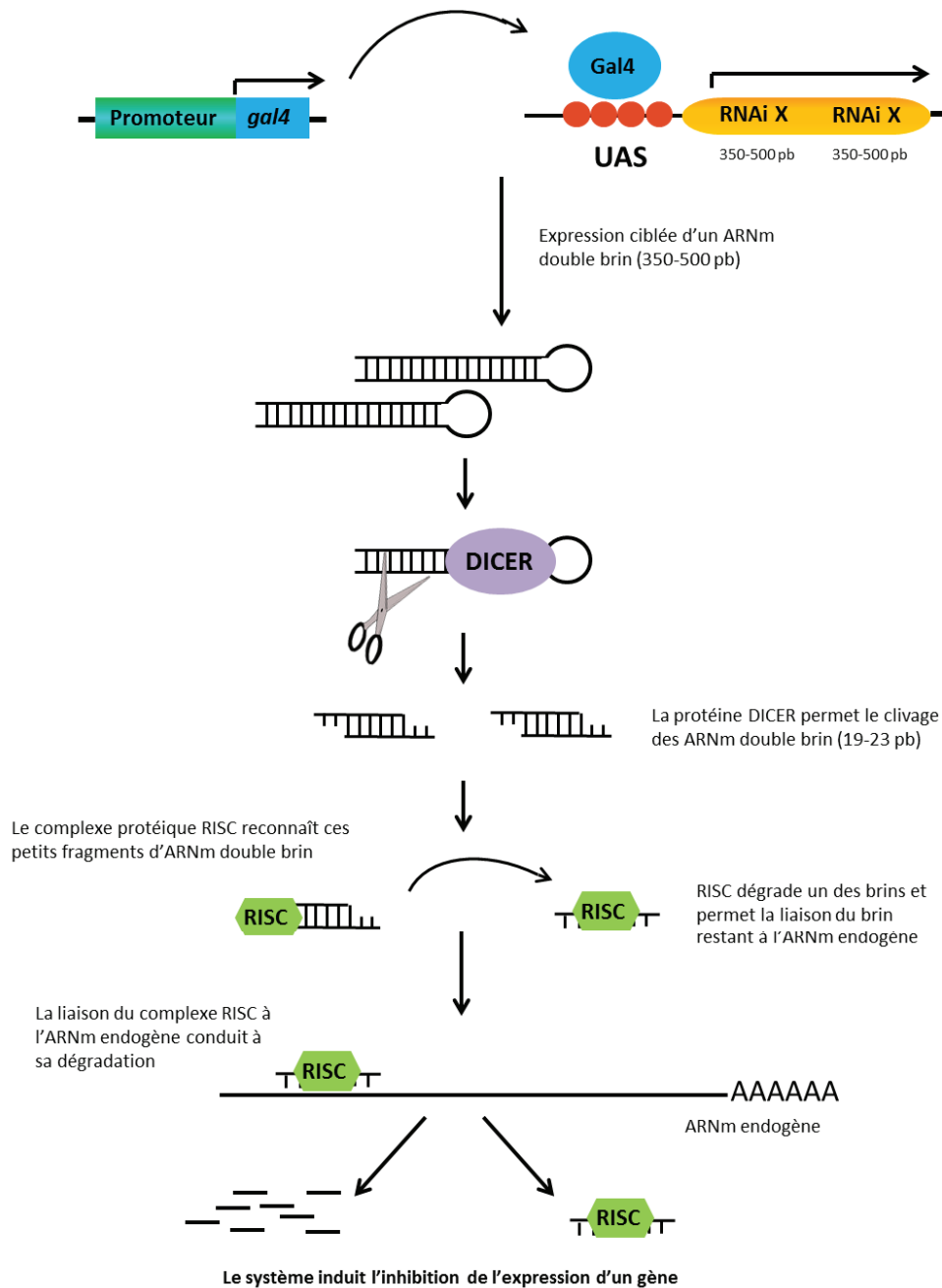
Le système binaire *gal4/UAS* est issu de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Chez la levure, le facteur de transcription GAL4 active des gènes cibles qui possèdent la séquence cible UAS (Upstream Activating Sequence) à leur extrémité 5'. Ce système permet d'agir directement au niveau transcriptionnel et d'exprimer de manière ciblée un gène d'intérêt. Dans les cas des lignées *gal4* utilisées, des séquences régulatrices spécifiques ont été insérées en amont du gène *gal4* dans le vecteur de transposition. Une fois le transposon inséré, le gène *gal4* s'exprime sous le contrôle de ces séquences. Un transgène cible de GAL4 peut être construit en clonant le gène d'une protéine X en aval d'une séquence UAS sur laquelle se fixe le GAL4. Cette séquence cible est silencieuse en l'absence de GAL4. La lignée de mouches portant la séquence cible (UAS-gène X) peut être croisée avec la lignée exprimant le GAL4. Dans la descendance de ce croisement, la séquence cible est activée dans les cellules où GAL4 est exprimé. Il est alors possible d'observer l'effet de cette expression ciblée sur le phénotype comportementale ou développemental.



Représentation schématique du système *gal4/UAS* dans lequel l'activateur *gal4* est placé sous contrôle de séquences régulatrices avant l'insertion dans le génome de la drosophile.

ANNEXE 2 : La technique d'interférence ARN (RNAi)

Le système *gal4/UAS* permet d'exprimer des ARNm double brin d'environ 350 à 500 paires de bases (pb) dans certains neurones de l'horloge cérébrale de la drosophile. Cette technique permet d'inhiber l'expression de certains gènes et de créer des drosophiles mosaïques mutantes pour un gène donné spécifiquement dans les neurones voulus.



Représentation schématique du système d'ARN-interférence dans lequel un ARNm double brin du gène X est exprimé dans les tissus grâce au système *gal4/UAS*.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Akashi, M., Tsuchiya, Y., Yoshino, T. and Nishida, E. (2002) Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase I epsilon (CKIepsilon) and CKIdelta in cultured cells. *Mol Cell Biol*, **22**, 1693-1703.

Akten, B., Jauch, E., Genova, G.K., Kim, E.Y., Edery, I., Raabe, T. and Jackson, F.R. (2003) A role for CK2 in the Drosophila circadian oscillator. *Nat Neurosci*, **16**, 251-257.

Allada, R., White, N.E., So, W.V., Rosbach, M. and Hall, J.C. (1998) A Mutant Drosophila Homolog of Mammalian Clock Disrupts Circadian Rhythms and Transcription of period and timeless. *Cell*, **93**, 791-804.

Angers, S., Thorpe, C.J., Biechele, T.L., Goldenberg, S.J., Zheng, N., MacCoss, M.J., Moon, R.T. (2006) The KLHL12-Cullin-3 ubiquitin ligase negatively regulates the Wnt- β -catenin pathway by targeting Dishevelled for degradation. *Nat Cell Biol*, **8**, 348-357.

Antle, M.C. and Silver, R. (2005) Orchestrating time: arrangements of the brain circadian clock. *Trends Neurosci*, **28**, 145-151.

Bae, K., Lee, C., Sidote, D., Chuang, K.Y., and Edery, I. (1998) Circadian regulation of a Drosophila homolog of the mammalian Clock gene: PER and TIM function as positive regulators. *Mol Cell Biol*, **18**, 6142-6151.

Bae, K., Jin, X., Maywood, E.S., Hastings, M.H., Reppert, S.M. and Weaver, D.R. (2001) Differential functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN circadian clock. *Neuron*, **30**, 525-536.

Benito, J., Houl, J.H., Roman, G.W. and Hardin, P.E. (2008) The Blue-Light Photoreceptor CRYPTOCHROME Is Expressed in a Subset of Circadian Oscillator Neurons in the Drosophila CNS. *J Biol Rhythms*, **23**, 296-307.

Blanchardon, E., Grima, B., Klarsfeld, A., Chélot, E., Hardin, P.E., Pr  at, T. and Rouyer, F. (2001) Defining the role of Drosophila lateral neurons in the control of circadian activity and

eclosion rhythms by targeted genetic ablation and PERIOD protein overexpression. *Eur J Neurosci*, **13**, 871-888.

Busino, L., Bassermann, F., Maiolica, A., Lee, C., Nolan, P.M., Godhino, S.I.H., Draetta, G.F. and Pagano, M. (2007) SCF^{Fbxl3} Controls the Oscillation of the Circadian Clock by Directing the Degradation of Cryptochrome Proteins. *Science*, **316**, 900-904.

Busza, A., Emery-Le, M., Rosbach, M. and Emery P. (2004) Roles of the two Drosophila CRYPTOCHROME structural domains in circadian photoreception. *Science*, **304**, 1503-1506.

Camacho, F., Cilio, M., Guo, Y., Virshup, D.M., Patel, K., Khorkova, O., Styren, S., Morse, B., Yao, Z. and Keesler, G.A. (2001) Human casein kinase Idelta phosphorylation of human circadian clock proteins period 1 and 2. *FEBS Lett*, **489**, 159-165.

Cardozo, T. and Pagano, M. (2004) The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 739-751.

Ceriani, M.F., Darlington, T.K., Staknis, D., Mäs, P., Petti, A.A., Weitz, C.J. and Kay, S.A. (1999) Light-Dependent Sequestration of TIMELESS by CRYPTOCHROME. *Science*, **285**, 553-556.

Chamovitz, D.A., Wei, N., Osterlund, M.T., von Arnim, A.G., Staub, J.M., Matsui, M. and Deng, X.W. (1996) The COP9 complex, a novel multisubunit nuclear regulator involved in light control of a plant developmental switch. *Cell*, **86**, 115-121.

Chang, D.C. and Reppert, S.M. (2003) A Novel C-Terminal Domain of Drosophila PERIOD Inhibits dCLOCK:CYCLE-Mediated Transcription. *Current Biology*, **13**, 758-762.

Chiu, J.C., Vanselow, J.T., Kramer, A., and Edery, I. (2008) The phospho-occupancy of an atypical SLIMB-binding site on PERIOD that is phosphorylated by DOUBLETIME controls the pace of the clock. *Genes Dev*, **22**, 1758-1772.

Collins, B., Mazzoni, E.O., Stanewsky, R. and Blau, J. (2006) Drosophila CRYPTOCHROME Is a Circadian Transcriptional Repressor. *Curr Biol*, **16**, 441-449.

Collins, B. and Blau, J. (2007) Even a stopped clock tells the right time twice a day: circadian timekeeping in Drosophila. *Eur J Physiol*, **454**, 857-867.

Cope, G.A., Suh, G.S., Aravind, L., Schwarz, L., Zipursky, S.L., Koonin, E.V. and Deshaies, R.J. (2002) Role of predicted metalloprotease motif of Jab/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cul1. *Science*, **298**, 608-611.

Cusumano, P., Klarsfeld, A., Chélot, E., Picot, M., Richier, B., and Rouyer, F. (2009) PDF-modulated visual inputs and Cryptochrome define diurnal behavior in *Drosophila*. *Nat Neurosci*, **12**, 1427-1433.

Cyran, S.A., Yiannoulos, G., Buchsbaum, A.M., Saez, L., Young, M.W., and Blau, J. (2005) The double-time protein kinase regulates the subcellular localization of the *Drosophila* clock protein period. *J Neurosci*, **25**, 5430-5437.

Darlington, T.K., Wager-Smith, K., Ceriani, M.F., Staknis, D., Gekakis, N., Steeves, T.D.L., Weitz, C.J., Takahashi, J.S. and Kay, S.A. (1998) Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors *per* and *tim*. *Science*, **280**, 1599-1603.

de la Iglesia, H.O., Meyer, J., Carpino, A. and Schwartz, W.J. (2000) Antiphase oscillation of the left and right suprachiasmatic nuclei. *Science*, **290**, 799-801.

Di Marcotullio, L., Ferretti, E., Greco, A., De Smaele, E., Screpanti, I. and Gulino, A. (2007) Multiple ubiquitin-dependent processing pathways regulate hedgehog/gli signaling: implications for cell development and tumorigenesis. *Cell Cycle*, **6**, 390-393.

Dunlap, J.C. (2004) Kinases and Circadian Clocks: PER Goes It Alone. *Dev Cell*, **6**, 260-261.

Eide, E.J., Vielhaber, E.L., Hinz, W.A., and Virshup, D.M. (2002) The Circadian Regulatory Proteins BMAL1 and Cryptochromes Are Substrates of Casein Kinase I ϵ . *J Biol Chem*, **277**, 17248-17254.

Eide, E.J., Woolf, M.F., Kang, H., Woolf, P., Hurst, W., Camacho, F., Vielhaber, E.L., Giovanni, A., and Virshup, D.M. (2005) Control of Mammalian Circadian Rhythm by CKI ϵ -Regulated Proteasome-Mediated PER2 Degradation. *Mol Cell Biol*, **25**, 2795-2807.

Emery, P., So, W.V., Kaneko, M., Hall, J.C. and Rosbach, M. (1998) CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell*, **95**, 669-679.

Emery, P., Stanewsky, R., Hall, J.C. and Rosbach, M. (2000) A unique circadian-rhythm photoreceptor. *Nature*, **404**, 456-457.

Emery, P., Stanewsky, R., Helfrich-Förster C., Emery-Le, M., Hall, J.C. and Rosbach, M. (2000) Drosophila CRY Is a Deep Brain Circadian Photoreceptor. *Neuron*, **26**, 493-504.

Emery, P. and Reppert, S.M. (2004) A rhythmic Ror. *Neuron*, **43**, 443-446.

Fang, Y., Sathyanarayanan, S., and Sehgal, A. (2007) Post-translational regulation of the Drosophila circadian clock requires protein phosphatase 1 (PP1). *Genes Dev*, **21**, 1506-1518.

Fujiyama-Nakamura, S., Ito, S., Sawatsubashi, S., Yamauchi, Y., Suzuki, E., Tanabe, M., Kimura, S., Murata, T., Isobe, T., Takeyama, K. and Kato, S. (2009) BTB protein, dKLHL18/CG3571, serves as an adaptor subunit for a dCul3 ubiquitin ligase complex. *Genes Cells*, **14**, 965-973.

Gallego, M., Kang, H. and Virshup, D.M. (2006) Protein phosphatase 1 regulates the stability of the circadian protein PER2. *Biochem J*, **399**, 169-175.

Gallego, M. and Virshup, D.M. (2007) Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 139-148.

Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H.B., Davis, F.C., Wilsbacher, L.D., King, D.P., Takahashi, J.S. and Weitz, C.J. (1998) Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science*, **280**, 1564-1569.

Giebultovicz, J.M. (1997) Circadian clock in Malpighian tubules. *Nature*, **386**, 664.

Godinho, S.I.H., Maywood, E.S., Shaw, L., Tucci, V., Barnard, A.R., Busino, L., Pagano, M., Kendall, R., Quwailid, M.M., Romero, M.R., O'Neill, J., Chesham, J.E., Brooker, D., Lallanne, Z., Hastings, M.H. and Nolan, P.M. (2007) The After-Hours Reveals a Role for Fbxl3 in Determining Mammalian Circadian Period. *Science*, **316**, 897-900.

Goeke, S., Greene, E.A., Grant, P.K., Gates, M.A., Crowner, D., Agak, T. and Giniger, E. (2003) Alternative splicing of *lola* generates 19 transcription factors controlling axon guidance in Drosophila. *Nat Neurosci*, **9**, 917-924.

Goldberg, A.L. (2000) Probing the proteasome pathway. *Nat Biotechnol*, **18**, 494-496.

Green, P., Hartenstein, A.Y. and Hartenstein, V. (1993) The embryonic development of the *Drosophila* visual system. *Cell Tissue Res*, **273**, 583-598.

Griffin, E.A. Jr, Staknis D. and Weitz, C.J. (1999) Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock. *Science*, **286**, 768-771.

Grima, B., Lamouroux, A., Chélot, E., Papin, C., Limbourg-Bouchon, B., and Rouyer, F. (2002) The F-box protein SLIMB controls the levels of clock proteins PERIOD and TIMELESS. *Nature*, **429**, 178-182.

Grima, B., Chélot, E., Xia, R., and Rouyer, F. (2004) Morning and evening peaks of activity rely on different clock neurons of the *Drosophila* brain. *Nature*, **431**, 869-873.

Harada, Y., Sakai, M., Kurabayashi, N., Hirota, T., and Fukada, Y. (2005) Ser-557-phosphorylated mCRY2 Is Degraded upon Synergistic Phosphorylation by Glycogen Synthase Kinase-3 β . *J Biol Chem*, **280**, 31714-31721.

Harari-Steinberg, O. and Chamovitz, D.A. (2004) The COP9 signalosome: mediating between kinase signaling and protein degradation. *Curr Protein Pept Sci*, **5**, 185-189.

Hardin, P.E. (2005) The Circadian Timekeeping System of *Drosophila*. *Current Biology*, **15**, 714-722.

Hatakeyama, S., Jensen, J.P. and Weissman, A.M. (1997) Subcellular localization and ubiquitin-conjugating enzyme (E2) interactions of mammalian HECT family ubiquitin protein ligases. *J Biol Chem*, **272**, 15085-15092.

Hatakeyama, S., Yada, M., Matsumoto, M., Ishida, N. and Nakayama, K.I. (2001) U-box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. *J Biol Chem*, **276**, 33111-33120.

Hege, D.M., Stanewsky, R., Hall, J.C. and Giebultowicz, J.M. (1997) Rhythmic Expression of a PER-Reporter in the Malpighian Tubules of Decapitated *Drosophila*: Evidence for a Brain-Independent Circadian Clock. *J Biol Rhythms*, **12**, 300-308.

Helfrich-Förster, C., Winter, C., Hofbauer, A., Hall, J.C., and Stanewsky, R. (2001) The circadian clock of fruit flies is blind after elimination of all known photoreceptors. *Neuron*, **30**, 249-261.

Helfrich-Förster, C., Edwards, T., Yasuyama, K., Wisotzky, B., Schneuwly, S., Stanewsky, R., Meinertzhagen, I.A., and Hofbauer, A. (2002) The extraretinal eyelet of *Drosophila*: development, ultrastructure and putative circadian function. *J Neurosci*, **22**, 9255-9266.

Helfrich-Förster, C. (2003) The neuroarchitecture of the circadian clock in the brain of *Drosophila melanogaster*. *Microsci Res Tech*, **62**, 94-102.

Helfrich-Förster, C., Shafer, O.T., Wülbeck, C., Grieshaber, E., Rieger, D. and Taghert, P. (2007) Development and Morphology of the Clock-Gene-Expressing Lateral Neurons of *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol*, **500**, 47-70.

Hofbauer, A., and Buchner, E. (1989) Does *Drosophila* have seven eyes? *Z Naturforsch [C]*, **76**, 335-336.

Hyun, S., Lee, Y., Hong, S.T., Bang, S., Paik, D., Kang, J., Shin, J., Lee, J., Jeon, K., Hwang, S, Bae, E. and Kim, J. (2005) *Drosophila* GPCR Han Is a Receptor for the Circadian Clock Neuropeptide PDF. *Neuron*, **48**, 267-278.

Ivanchenko, M., Stanewsky, R. and Giebultowicz, J.M. (2001) Circadian photoreception in *Drosophila*: functions of cryptochrome in peripheral and central clocks. *J Biol Rhythms*, **16**, 205-215.

Jia, J., Amanal, K., Wang, G., Tang, J., Wang, B. and Jiang, J. (2002) Shaggy/GSK3 antagonizes Hedgehog signaling by regulating Cubitus interruptus. *Nature*, **416**, 548-552.

Jia, J., Zhang, L., Zhang, Q., Tong, C., Wang, B., Hou, F., Amanal, K. and Jiang, J. (2005) Phosphorylation by Double-Time/CKI ϵ and CKI α Targets Cubitus Interruptus for Slimb/ β -TRCP-Mediated Proteolytic Processing. *Dev Cell*, **9**, 819-830.

Jiang, J. and Struhl G. (1998) Regulation of the Hedgehog and Wingless signalling pathways by the F-box/WD40-repeat protein Slimb. *Nature*, **391**, 493-496.

Johnson, E.S., Ma, P.C., Ota, I.M. and Varshavsky, A. (1995) A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *J Biol Chem*, **270**, 17442-17456.

Kaiser, P., and Huang, L. (2005) Global approaches to understanding ubiquitination. *Genome Biol*, **6**, 233.

- Kaneko, M., Helfrich-Förster, C., and Hall, J.C. (1997) Spatial and temporal expression of the period and timeless genes in the developing nervous system of drosophila: newly identified pacemaker candidates and novel features of clock gene product cycling. *J Neurosci*, **17**, 6745-6760.
- Keesler, G.A., Camacho, F., Guo, Y., Virshup, D., Mondadori, C., and Yao, Z. (2000) Phosphorylation and destabilization of human period I clock protein by human casein kinase Iepsilon. *Neuroreport*, **11**, 951-955.
- Kent, D., Bush, E.W. and Hooper, J.E. (2006) Roadkill attenuates Hedgehog responses through degradation of Cubitus interruptus. *Development*, **133**, 2001-2010.
- Kim, E.Y. and Edery, I. (2006) Balance between DBT/CKI{varepsilon} kinase and protein phosphatase activities regulate phosphorylation and stability of Drosophila CLOCK protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 6178-6183.
- Klarsfeld, A., Malpel, S., Michard-Vanhée, C., Picot, M., Chélot, E. and Rouyer, F. (2004) Novel features of cryptochrome-mediated photoreception in the brain circadian clock of Drosophila. *J Neurosci*, **24**, 1468-1477.
- Kloss, B., Rothenfluh, A., Young, M.W., and Saez, L. (2001) Phosphorylation of period is influenced by cycling physical associations of double-time, period, and timeless in the drosophila clock. *Neuron*, **30**, 699-706.
- Knowles, A., Koh, K., Wu, J.T., Chien, C.T., Chamovitz, D.A. and Blau, J. (2009) The COP9 Signalosome is required for light-dependent TIM degradation and Drosophila clock resetting. *J Neurosci*, **29**, 1152-1162.
- Ko, H.W., Jiang, J., and Edery, I. (2002) A role for Slimb in the degradation of *Drosophila* PERIOD protein phosphorylated by DOUBLETIME. *Nature*, **420**, 673-678.
- Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H.D., Mayer, T.U. and Jentsch, S. (1999) A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell*, **96**, 635-644.
- Koh, K., Zheng, X., and Sehgal, A. (2006) JETLAG resets the Drosophila circadian clock by promoting light-induced degradation of TIMELESS. *Science*, **312**, 1809-1812.

Konopka, R.J. and Benzer, S. (1971) Clock mutants in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **68**, 2112-2116.

Krishnan, B., Levine, J.D., Lynch, K.S., Dowse, H.B., Funes, P., Hall, J.C., Hardin, P.E. and Dryer, S.E. (2001) A new role for cryptochrome in a *Drosophila* circadian oscillator. *Nature*, **411**, 313-317.

Kula-Eversole, E., Nagoshi, E., Shang, Y., Rodriguez, J., Allada, R. and Rosbash, M. (2010) Surprising gene expression patterns within and between PDF-containing circadian neurons in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 13497-13502.

Kume, K., Zylka, M.J., Sriram, S., Shearman, L.P., Weaver, D.R., Jin, X., Maywood, E.S., Hastings, M.H. and Reppert, S.M. (1999) mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell*, **98**, 193-205.

Latres, E., Chiaur, D.S. and Pagano, M. (1999) The human F box protein β -Trcp associates with the Cul1/Skp1 complex and regulates the stability of β -catenin. *Oncogene*, **18**, 849-854.

Lear, B.C., Merrill, E., Lin, J.M., Schroeder, A., Zhang, L. and Allada, R. (2005) A G Protein-Coupled Receptor, groom-of-PDF, Is Required for PDF Neuron Action in Circadian Behavior. *Neuron*, **48**, 221-227.

Lee, C.G., Parikh, V., Itsukaichi, T., Bae, K. and Edery, I. (1996) Resetting the *Drosophila* clock by photic regulation of PER and a PER-TIM complex. *Science*, **271**, 1740-1744.

Lee, C., Etchegaray, J.P., Cagampang, F.R.A., Loudon, A.S.I. and Reppert, S.M. (2001) Posttranslational Mechanisms Regulate the Mammalian Circadian Clock. *Cell*, **107**, 855-867.

Levine, J.D., Funes, P., Dowse, H.B. and Hall, J.C. (2002) Advanced analysis of a cryptochrome mutation's effects on the robustness and phase of molecular cycles in isolated peripheral tissues of *Drosophila*. *BMC Neurosci*, **3**, 5-21.

Lin, J.M., Kilman, V., Keegan, K., Paddock, B., Emery-Le, M., Rosbash, M., and Allada, R. (2002) A role for casein kinase 2alpha in the *Drosophila* circadian clock. *Nature*, **420**, 816-820.

- Lin, Y., Stormo, G.D. and Taghert, P.H. (2004) The Neuropeptide Pigment-Dispersing Factor Coordinates Pacemaker Interactions in the *Drosophila* Circadian System. *J Neurosci*, **24**, 7951-7957.
- Lin, J.M., Schroeder, A. and Allada, R. (2005) In Vivo Circadian Function of Casein Kinase 2 Phosphorylation Sites in *Drosophila* PERIOD. *J Neurosci*, **25**, 11175-11183.
- Iitaka, C., Miyazaki, K., Akaike, T. and Ishida, N. (2005) A role for glycogen synthase kinase-3 β in the mammalian circadian clock. *J Biol Chem*, **280**, 29397-23402.
- Liu, X., Lorenz, L., Yu, Q.N., Hall, J.C. and Rosbach, M. (1988) Spatial and temporal expression of the period gene in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev*, **2**, 228-238.
- Im, S.H. and Taghert, P.H. (2010) PDF receptor expression reveals direct interactions between circadian oscillators in *Drosophila*. *J Comp Neurol*, **518**, 1925-1945.
- Lyapina, S., Cope, G., Shevchenko, A., Serino, G., Tsuge, T., Zhou, C., Wolf, D.A., Wei, N., Shevchenko, A. and Deshaies, R.J. (2001) Promotion of NEDD-CUL1 conjugate cleavage by COP9 signalosome. *Science*, **292**, 1382-1385.
- Maier, B., Wendt, S., Vanselow, J.T., Wallach, T., Reischl, S., Oehmke, S., Schlosser, A. and Kramer, A. (2009) A large-scale functional RNAi screen reveals a role for CK2 in the mammalian circadian clock. *Genes Dev*, **23**, 708-718.
- Malpel, S., Klarsfeld, A. and Rouyer, F. (2002) Larval optic nerve and adult extra-retinal photoreceptors sequentially associate with the clock neurons during *Drosophila* brain development. *Development*, **129**, 1443-1453.
- Martinek, S., Inonog, S., Manoukian, A.S. and Young, M.W. (2001) A Role for the Segment Polarity Gene shaggy/GSK-3 in the *Drosophila* Circadian Clock. *Cell*, **105**, 769-779.
- Meissner, R.A., Kilman, V.L., Lin, J.M., and Allada, R. (2008) TIMELESS is an important mediator of CK2 effects on circadian clock function in vivo. *J Neurosci*, **28**, 9732-9740.
- Menet, J.S., Abruzzi, K.C., Desrochers, J., Rodriguez, J. and Rosbach, M. (2010) Dynamic PER repression mechanisms in the *Drosophila* circadian clock: from on-DNA to off-DNA. *Genes Dev*, **24**, 358-367.

- Merlet, J., Burger, J., Gomes, J.E. and Pintard, L. (2009) Regulation of cullin-RING E3 ubiquitin-ligases by neddylation and dimerization. *Cell Mol Life Sci*, **66**, 1924-1938.
- Mertens, I., Vandingenen, A., Johnson, E.C., Shafer, O.T., Li, W., Trigg, J.S., De Loof, A., Schoofs, L. and Taghert, P.H. (2005) PDF Receptor Signaling in *Drosophila* Contributes to Both Circadian and Geotactic Behaviors. *Neuron*, **48**, 213-219.
- Meyer, P., Saez, L. and Young, M.W. (2006) PER-TIM Interactions in Living *Drosophila* Cells: An Interval Timer for the Circadian Clock. *Science*, **311**, 226-229.
- Milétich, I. and Limbourg-Bouchon, B. (2000) *Drosophila* null *slimb* clones transiently deregulate Hedgehog-independent transcription of *wingless* in all limb discs, and induce decapentaplegic transcription linked to imaginal disc regeneration. *Mech Dev*, **93**, 15-26.
- Mistry, H., Wilson, B.A., Roberts, I.J.H., O’Kane, C.J. and Skeath, J.B. (2004) Cullin-3 regulates pattern formation, external sensory organ development and cell survival during *Drosophila* development. *Mech of Dev*, **121**, 1495-1507.
- Miyasako, Y., Umezaki, Y. and Tomioka, K. (2007) Separate sets of cerebral clock neurons are responsible for light and temperature entrainment of *Drosophila* circadian locomotor rhythms. *J Biol Rhythms*, **22**, 115-126.
- Moses, K., Ellis, M.C. and Rubin, G.M. (1989) The glass gene encodes a zinc-finger protein required by *Drosophila* photoreceptor cells. *Nature*, **340**, 531-536.
- Myers, M.P., Wager-Smith, K., Rothenfluh-Hilfiker, A. and Young M.W. (1996) Light-Induced Degradation of TIMELESS and Entrainment of the *Drosophila* Circadian Clock. *Science*, **271**, 1736-1740.
- Naidoo, N., Song, W., Hunter-Ensor, M. and Sehgal, A. (1999) A Role for the Proteasome in the Light Response of the Timeless Clock Protein. *Science*, **285**, 1737-1741.
- Nawathean, P. and Rosbach, M. (2004) The Doubletime and CKII Kinases Collaborate to Potentiate *Drosophila* PER Transcriptional Repressor Activity. *Mol Cell*, **13**, 213-223.
- Ohta, H., Yamazaki, S. and McMahon, D.G. (2005) Constant light desynchronizes mammalian clock neurons. *Nat Neurosci*, **8**, 267-269.

Ou, C.Y., Lin, Y.F., Chen, Y.J. and Chien, C.T. (2002) Distinct protein degradation mechanisms mediated by Cul1 and Cul3 controlling Ci stability in *Drosophila* eye development. *Genes Dev*, **16**, 2403-2414.

Ousley, A., Zafarullah, K., Chen, Y.F., Emerson, M., Hickman, L. and Sehgal, A. (1998) Conserved regions of the timeless (tim) clock gene in *Drosophila* analysed through phylogenetic and functional studies. *Genetics*, **148**, 815-825.

Park, J.H., Helfrich-Förster, C., Lee, G., Liu, L., Rosbach, M. and Hall, J.C. (2000) Differential regulation of circadian pacemaker output by separate clock genes in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 3608-3613.

Pearn, M.T., Randall, L.L., Shortridge, R.D., Burg, M.G. and Pak, W.L. (1996) Molecular, biochemical, and electrophysiological characterization of *Drosophila* norpA mutants. *J Biol Chem*, **271**, 4937-4945.

Peschel, N., Veleri, S. and Stanewsky, R. (2006) Veela defines a molecular link between Cryptochrome and Timeless in the light-input pathway to *Drosophila*'s circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 17313-17318.

Peschel, N., Chen, K.F., Szabo, G., and Stanewsky, R. (2009) Light-dependent interactions between the *Drosophila* circadian clock factors cryptochrome, jetlag, and timeless. *Curr Biol*, **19**, 241-247.

Petroski, M.D., and Deshaies, R.J. (2005) Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 9-20.

Pintard, L., Willems, A. and Peter, M. (2004) Cullin-based ubiquitin ligases: Cul3-BTB complexes join the family. *EMBO J*, **23**, 1681-1687.

Plautz, J.D., Kaneko, M., Hall, J.C. and Kay, S.A. (1997) Independent Photoreceptive Circadian Clocks Throughout *Drosophila*. *Science*, **278**, 1632-1635.

Preitner, N., Damiola, F., Luis Lopez, M., Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U. and Schibler, U. (2002) The Orphan Nuclear Receptor REV-ERB α Controls Circadian Transcription within the Positive Limb of the Mammalian Circadian Oscillator. *Cell*, **110**, 251-260.

Price, J.L., Blau, J., Rothenfluh, A., Abodeely, M., Kloss, B., and Young, M.W. (1998) double-time is a novel *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell*, **94**, 83-95.

Price, M.A. and Kalderon, D. (2002) Proteolysis of the Hedgehog Signaling Effector Cubitus interruptus Requires Phosphorylation by Glycogen Synthase Kinase 3 and Casein Kinase 1. *Cell*, **108**, 823-835.

Price, A.M. (2006) CKI, there's more than one: casein kinase I family members in Wnt and Hedgehog signaling. *Genes Dev*, **20**, 399-410.

Renn, S.C.P., Park, J.H., Rosbach, M., Hall, J.C. and Taghert, P.H. (1999) A pdf Neuropeptide Gene Mutation and Ablation of PDF Neurons Each Cause Severe Abnormalities of Behavioral Circadian Rhythms in *Drosophila*. *Cell*, **99**, 791-802.

Reppert, S.M., Artman, H.G., Swaminathan, S. and Fisher, D.A. (1981) Vasopressin exhibits a rhythmic daily pattern in cerebrospinal fluid but not in blood.

Reppert, S.M. and Weaver, D.R. (2001) Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol*, **63**, 647-676.

Rosato, E., Trevisan, A., Sandrelli, F., Zordan, M., Kyriacou, C.P. and Costa, R. (1997) Conceptual translation of timeless reveals alternative initiating methionines in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res*, **25**, 455-458.

Rosato, E., Tauber, E. and Kyriacou, C.P. (2006) Molecular genetics of the fruit-fly circadian clock. *Eur J Hum Genet*, **14**, 729-738.

Rothenfluh, A., Young, M.W. and Saez, L. (2000) A TIMELESS-independent function for PERIOD proteins in the *Drosophila* clock. *Neuron*, **26**, 505-514.

Rotin, D. and Kumar, S. (2009) Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **10**, 398-409.

Rutila, J.E., Suri, S., Le, M., So, W.V., Rosbach, M. and Hall, J.C. (1998) CYCLE is a Second bHLH-PAS Clock Protein Essential for Circadian Rhythmicity and Transcription of *Drosophila* period and timeless. *Cell*, **93**, 805-814.

- Sahar, S., Zocchi, L., Kinoshita, C., Borrelli, E. and Sassone-Corsi, P. (2010) Regulation of BMAL1 protein stability and circadian function by GSK3 β -mediated phosphorylation. *Plos One*, **5**, e8561.
- Sandrelli, F., Tauber, E., Pegoraro, M., Mazzotta, G., Cisotto, P., Landskron, J., Stanewsky, R., Piccin, A., Rosato, E., Zordan, M., Costa, Rodolfo and Kyriacou, C.P. (2007) A Molecular Basis for Natural Selection at the timeless Locus in *Drosophila melanogaster*. *Science*, **316**, 1898-1900.
- Sathyanarayanan, S., Zheng, X., Xiao, R., and Sehgal, A. (2004) Posttranslational regulation of *Drosophila* PERIOD protein by protein phosphatase 2A. *Cell*, **116**, 603-615.
- Sato, T.K., Panda, S., Miraglia, L.J., Reyes, T.M., Rudic, R.D., McNamara, P., Naik, K.A., FitzGerald, G.A., Kay, S.A. and Hogenesch, J.B. (2004) A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron*, **43**, 527-537.
- Sehgal, A., Price, J.L., Man, B. and Young, M.W. (1994) Loss of circadian behavioral rhythms and per RNA oscillations in the *Drosophila* mutant timeless. *Science*, **263**, 1603-1606.
- Shafer, O.T., Rosbach, M. and Truman, J.W. (2002) Sequential Nuclear Accumulation of the Clock Proteins Period and Timeless in the Pacemaker Neurons of *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci*, **22**, 5946-5954.
- Shafer, O.T., Helfrich-Forster, C., Renn, S.C., and Taghert, P. H. (2006) Reevaluation of *Drosophila melanogaster*'s neuronal circadian pacemakers reveals new neuronal classes. *J Comp Neurol*, **498**, 180-193.
- Shafer, O.T., Kim, D.J., Dunbar-Yaffe, R., Nikolaev, V.O., Lohse, M.J. and Taghert, P.H. (2008) Widespread receptivity to neuropeptide PDF throughout the neuronal circadian clock network of *Drosophila* revealed by real-time cyclic AMP imaging. *Neuron*, **58**, 223-237.
- Shearman, L.P., Sriram, S., Weaver, D.R., Maywood, E.S., Chaves, I., Zheng, B., Kume, K., Lee, C.C., von der Horst, G.T., Hastings, M.H. and Reppert S.M. (2000) Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science*, **288**, 1013-1019.

- Shirogane, T., Jin, J., Ang, X.L. and Harper J.W. (2005) SCF β -TRCP controls clock-dependent transcription via casein kinase 1-dependent degradation of the mammalian period-1 (Per1) protein. *J Biol Chem*, **280**, 26863-26872.
- Siepkka, S.M., Yoo, S.H., Song, W., Kumar, V., Hu, Y., Lee, C. and Takahashi, J.S. (2007) Circadian Mutant Overtime Reveals F-box Protein FBXL3 Regulation of Cryptochrome and Period Gene Expression. *Cell*, **129**, 1011-1023.
- Siwicki, K.K., Eastman, C., Petersen, G., Rosbach, M. and Hall, J.C. (1988) Antibodies to the period gene product of *Drosophila* reveal Diverse Tissue Distribution and Rhythmic Changes in the Visual System. *Neuron*, **1**, 141-150.
- Smith, E.M., Lin, J.L., Meissner, R.A. and Allada, R. (2008) Dominant-negative CK2 α induces potent effects on circadian rhythmicity. *PLoS Genetics*, **4**, 99-109.
- Sorokin, A.V., Kim, E.R. and Ovchinnikov, L.P. (2009) Proteasome System of Protein Degradation and Processing. *Biochemistry*, **74**, 1411-1442.
- Spletter, M.L., Liu, J., Su, H., Giniger, E., Komiyama, T., Quake, S. and Luo, L. (2007) Lola regulates *Drosophila* olfactory projection neuron identity and targeting specificity. *Neural Dev*, **2**, 14.
- Stanewsky, R., Kaneko, M., Emery, P., Beretta, B., Wager-Smith, K., Kay, S.A., Rosbach, M. and Hall, J.C. (1998) The cry^b Mutation Identifies Cryptochrome as a Circadian Photoreceptor in *Drosophila*. *Cell*, **95**, 681-692.
- Stoleru, D., Peng, Y., Agosto, J. and Rosbach, M. (2004) Coupled oscillators control morning and evening locomotor behavior of *Drosophila*. *Nature*, **431**, 862-868.
- Sullivan, J.A., Shirasu, K. and Deng, X.W. (2003) The diverse roles of ubiquitin and the 26S proteasome in the life of plants. *Nat Rev Genet*, **4**, 948-958.
- Suzuki, G., Yanagawa, Y., Kwok, S.F., Matsui, M. and Deng, X.W. (2002) Arabidopsis COP10 is a ubiquitin-conjugating enzyme variant that acts together with COP1 and the COP9 signalosome in repressing photomorphogenesis. *Genes Dev*, **16**, 554-559.

- Takano, A., Isojima, Y., and Nagai, K. (2004) Identification of mPer1 phosphorylation sites responsible for the nuclear entry. *J Biol Chem*, **279**, 32578-32585.
- Tamaru, T., Hirayama, J., Isojima, Y., Nagai, K., Norioka, S., Takamatsu, K., and Sassone-Corsi, P. (2009) CK2alpha phosphorylates BMAL1 to regulate the mammalian clock. *Nat Struct Mol Biol*, **16**, 446-448.
- Tauber, E., Zordan, M., Sandrelli, F., Pegoraro, M., Osterwalder, N., Breda, C., Daga, A., Selmin, A., Monger, K., Benna, C., Rosato, E., Kyriacou, C.P. and Costa, R. (2007) Natural Selection Favors a Newly Derived timeless Allele in *Drosophila melanogaster*. *Science*, **316**, 1895-1898.
- Vielhaber, E., Eide, E., Rivers, A., Gao, Z.H., and Virshup, D.M. (2000) Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian casein kinase I epsilon. *Mol Cell Biol*, **20**, 4888-4899.
- Wei, N., Chamovitz, D.A. and Deng, X.W. (1994) Arabidopsis COP9 is a component of a novel signaling complex mediating light control of development. *Cell*, **78**, 117-124.
- Wolf, D.A, Zhu, C. and Wee, S. (2003) The COP9 signalosome: an assembly and maintenance platform for cullin ubiquitin ligases? *Nat Cell Biol*, **12**, 1029-1033.
- Wu, J.T., Lin, H.C., Hu, Y.C. and Chien, C.T. (2005) Neddylation and deneddylation regulate Cul1 and Cul3 protein accumulation. *Nat Cell Biol*, **7**, 1014-1020.
- Xu, L., Wei, Y., Reboul, J., Vaglio, P., Shin, T.H., Vidal, M., Elledge, S.J. and Harper, J.W. (2003) BTB proteins are substrate-specific adaptors in an SCF-like modular ubiquitin ligase containing CUL-3. *Nature*, **425**, 316-321.
- Xu, C., Kim, N.G. and Gumbiner, B.M. (2009) Regulation of protein stability GSK3 mediated phosphorylation. *Cell Cycle*, **8**, 4032-4039.
- Xue, F. and Cooley, L. (1993) kelch Encodes a Component of Intercellular Bridges in *Drosophila* Egg Chambers. *Cell*, **72**, 681-693.

- Yagita, K., Yamanaka, I., Koinuma, S., Shigeyoshi, Y. and Uchiyama, Y. (2009) Mini screening of kinase inhibitors affecting period-length of mammalian cellular circadian clock. *Acta Histochem Cytochem*, **42**, 89-93.
- Yamamoto, A., Zwartz, L., Callaerts, P., Norga, K., Mackay, T.F. and Anholt, R.R. (2008) Neurogenetic networks for startle-induced locomotion in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **34**, 12393-12398.
- Yang, Z. and Sehgal, A. (2001) Role of molecular oscillations in generating behavioral rhythms in *Drosophila*. *Neuron*, **29**, 453-467.
- Yin, L., Wang, J., Klein, P.S. and Lazar, M.A. (2006) Nuclear receptor Rev-erb α is a critical lithium-sensitive component of the circadian clock. *Science*, **311**, 1002-1005.
- Yoshii, T., Heshiki, Y., Ibuki-Ishibashi, T., Matsumoto, A., Tanimura, T., and Tomioka, K. (2005) Temperature cycles drive *Drosophila* circadian oscillation in constant light that otherwise induces behavioural arrhythmicity. *Eur J Neurosci*, **22**, 1176-1184.
- Yoshii, T., Todo, T., Wulbeck, C., Stanewsky, R., and Helfrich-Förster, C. (2008) Cryptochrome is present in the compound eye and a subset of *Drosophila*'s clock neurons. *J Comp Neurol*, **508**, 952-966.
- Young, M.W. (1998) The molecular control of circadian behavioral rhythms and their entrainment in *Drosophila*. *Annu Rev Biochem*, **67**, 135-152.
- Yu, W., Zheng, H., Houl, J.H., Dauwalder, B. and Hardin, P.E. (2006) PER-dependent rhythms in CLK phosphorylation and E-box binding regulate circadian transcription. *Genes Dev*, **20**, 723-733.
- Yu, W., Zheng, H., Price, J.L. and Hardin, P.E. (2009) DOUBLETIME plays a noncatalytic role to mediate CLOCK phosphorylation and repress CLOCK-dependent transcription within the *Drosophila* circadian clock. *Mol Cell Biol*, **29**, 1452-1458.
- Zhang, Q., Zhang, L., Wang, B., Ou, C.Y., Chien, C.T. and Jiang, J. (2006) A Hedgehog-Induced BTB Protein Modulates Hedgehog Signaling by Degrading Ci/Gli Transcription Factor. *Dev Cell*, **10**, 719-729.

Zhu, S., Perez, R., pan, M. and Lee, T. (2005) Requirement of Cul3 for axonal arborization and dendritic elaboration in *Drosophila* mushroom body neurons. *J Neurosci*, **25**, 4189-4197.

RESUME

La plupart des êtres vivants possèdent une horloge circadienne (période de 24 heures). Elle leur permet notamment d'anticiper les changements quotidiens (lumière, température) imposés par la rotation de la terre et d'y adapter leur comportement et leur physiologie. L'horloge est présente dans la plupart des cellules et repose sur deux boucles de régulation transcriptionnelle négative qui génèrent des oscillations d'ARNm des gènes d'horloge. Un délai entre l'accumulation des ARNm et celle des protéines assure le fonctionnement de la boucle de rétroaction. Ce délai est dû à des modifications post-traductionnelles des protéines PERIOD et TIMELESS. Les oscillations protéiques sont notamment contrôlées par leur phosphorylation, l'ubiquitination et la dégradation via le protéasome. L'ubiquitine ligase SCF^{Slmb} induit la dégradation circadienne de PER et de TIM. SCF^{Jetlag} contrôle la dégradation de TIM par la lumière, cette dernière intervenant dans la synchronisation de l'oscillateur.

Au cours de notre étude, nous avons identifié une nouvelle ubiquitine ligase, un complexe Cul-3, qui contrôle principalement la stabilité de TIM. Nos résultats indiquent que Cul-3 contrôle surtout la stabilité de TIM peu phosphorylé, de façon indépendante de PER, tandis que Slmb contrôle principalement la stabilité de TIM phosphorylé. Nous proposons un modèle dans l'oscillation de TIM régie par deux systèmes d'ubiquitination: Cul-3 pour retarder l'accumulation nocturne de la protéine, et Slmb pour précipiter sa disparition en fin de nuit.

Mots clés: horloge biologique, rythmes d'activité-repos, ubiquitine ligase, phosphorylation, boucle de régulation transcriptionnelle

Control of TIMELESS stability by the Cul-3 ubiquitin ligase complex in the *Drosophila* circadian clock

Most living organisms possess a circadian clock (24 hours period). This internal clock allows them to anticipate the daily changes (light, temperature) due to the rotation of the earth and consequently adapt their behavior and physiology. The molecular clock relies on two negative feedback loops that generate oscillations of the clock gene mRNA. A delay between the accumulation of the mRNAs and the proteins is required for the feedback loop, and is generated by post-translational modifications of PERIOD and TIMELESS. The protein oscillations are controlled by their phosphorylation, ubiquitination and proteasome-dependent degradation. The ubiquitin ligase SCF^{Slmb} induces the circadian degradation of PER and TIM. SCF^{Jetlag} controls the light-dependent degradation of TIM, which is involved in the resetting of the clock.

In our study, we have identified Cul-3, as a new clock ubiquitin ligase that controls TIM stability. Our results indicate that Cul-3 mostly controls the stability of hypophosphorylated TIM, independently of PER, whereas SLMB controls the stability of phosphorylated TIM. We propose a model where TIM oscillations are regulated by two ubiquitination process. Cul-3 delays the night accumulation of TIM, whereas Slmb precipitates its degradation at the end of the night.

Keywords: biological clock, rest-activity rhythms, ubiquitin ligase, protein phosphorylation, transcriptional feedback loop