



HAL
open science

Stabilité du rythme circadien des cyanobactéries : Investigation d'un couplage entre oscillateurs

Malika Amdaoud

► **To cite this version:**

Malika Amdaoud. Stabilité du rythme circadien des cyanobactéries : Investigation d'un couplage entre oscillateurs. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT: . tel-00178482

HAL Id: tel-00178482

<https://theses.hal.science/tel-00178482>

Submitted on 11 Oct 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER - GRENOBLE

N° attribué par la bibliothèque

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UJF

Spécialité : Physique

préparée au Laboratoire de Spectrométrie Physique

dans le cadre de l'**École Doctorale de Physique**

par

Malika AMDAOUD

Soutenance le 21 mai 2007

**Stabilité du rythme circadien des cyanobactéries :
Investigation d'un couplage entre oscillateurs**

Directrice de thèse :

Irina MIHALCESCU

Co-directeur de thèse :

Marcel VALLADE

JURY

M. Albert GOLDBETER	Rapporteur
M. Hervé ISAMBERT	Rapporteur
Mme Irina MIHALCESCU	Directrice de Thèse
M. Marcel VALLADE	Co-Directeur de Thèse
M. Vincent HAKIM	Examineur
M. Hans GEISELMANN	Examineur

Merci, Mulțumesc !!!

Voilà, mes (presque) 4 ans de thèse s'achèvent, et je me dois de mettre un beau point final à mon histoire avec le laboratoire de Spectrométrie Physique. Et pourtant, ce n'est pas sans un petit pincement au cœur que je quitterai le bureau 346, et toutes les personnes qui ont partagé mon quotidien au LSP.

Avant toute chose, je voudrais remercier mes deux directeurs de thèse. Irina Mihalcescu, pour m'avoir permis de mettre un pied dans le monde du vivant et de travailler sur un sujet aussi captivant qu'original. Je remercie ma « chef » pour son encadrement justement dosé : toujours présente pour discuter, répondre à mes questions (existentielles ou non), tout en me laissant la liberté indispensable à la gestion de mon projet de thèse. J'ai appris grâce à elle la rigueur expérimentale et théorique qui doit accompagner toute démarche scientifique. Je tiens enfin à remercier Irina pour son écoute, sa présence et son investissement lors de nos nombreuses discussions (scientifiques et/ou légèrement en marge des cyanobactéries). Un grand merci à Marcel Vallade, non seulement pour sa précieuse aide concernant l'aspect théorique de mon travail, la patience dont il a fait preuve lors des relectures (au moins 10 !) de ce manuscrit mais aussi pour son calme, sa sérénité, si apaisant dans les moments où le stress commençait à prendre le dessus...

Un grand merci aux membres du jury ; en particulier à Albert Goldbeter et Hervé Isambert, pour l'intérêt qu'ils ont témoigné pour mon travail en acceptant les rôles de rapporteur. Vifs remerciements également à Vincent Hakim et Hans Geiselman pour avoir examiné mon travail avec attention.

Les nombreux échanges avec le groupe BIOP (anciennement BOM, ex-PHAS, et qui sait un jour peut-être IDC ?) ont été très enrichissant et ont toujours aiguisé ma curiosité. J'ai vraiment apprécié l'ambiance dans laquelle j'ai travaillé ces 4 années (pas si longues que ça finalement...).

Merci à toutes les personnes qui animent les services du labo : l'atelier, le secrétariat notamment. Une mention particulière à Jessie Sitbon pour sa capacité à se couper en quatre pour résoudre les soucis de tout un chacun.

Et puis je voudrais adresser mes remerciements à toutes les personnes qui ont partagé mes doutes, mes sauts d'humeur plus que mensuels, bref, tous ces gens sans qui les choses auraient été réellement différentes :

Un grand grand merci à Patrice pour sa précieuse aide en cas de pépins expérimentaux en tout genre, pour tous nos échanges de pause café-apéro. Merci pour son soutien, ses judicieux conseils (meuh non !! tu n'est pas si « moisi » que ça...), et son humour à la Ballet.

Merci à tous les thésards (passés et présents) du 3^{ème} (non, je ne suis pas sectaire !) : Cyrille, mon ex-cobureau Julien, deuxième plus belle blonde du LSP après Jos, Jan-Paul, Christophe (à ne pas confondre avec Christoph !), Benjamin (oui, c'est vrai, je suis « un peu dég » de partir !!), et les anciens anciens : Marguerite, Hélène. Merci pour tous ces cafés, ces déjeuners sur l'herbe, toutes ces discussions pour finir par comprendre que finalement, la thèse c'est une belle aventure, surtout quand on est bien entouré !

Une mention très spéciale aux deux filles les plus rock'n roll du 3^{ème} étage (que dis-je, de tous le LSP) : Maud et Catherine, sans qui les choses aurait été vraiment vraiment différentes. Merci beaucoup pour tous les fous rires, les discussions métaphysico-psychologiques sur tout et n'importe quoi (non, on ne met pas de nom sur ...). Merci pour votre soutien. Merci pour ta présence réconfortante Maud, pour toujours avoir eu un kleenex quand il le fallait, pour avoir réveillé la « rock'n roll attitude » qui sommeillait en moi. Et merci à Jan-Paul, Gwennou et Maud pour avoir joué les Paul Bocuse pour moi (à coté de vos préparations culinaires, la Tour d'Argent n'a qu'à bien se tenir.. !).

J'aimerais aussi remercier toutes les personnes qui, hors labo, m'ont soutenu et ont cru en moi. Avec, par distance géographique croissante : Ma copine Cécile pour tous et le reste, Jérémy, Julie, Anne, Julien Audrey, Cyril K. et LN (merci les mails, le téléphone, les visites impromptues aux représentations de théâtre).

Enfin, mille mercis à mes parents sur qui j'ai pu compter à chaque instant de ce long périple, qui n'ont jamais cessé de croire que non seulement je pouvais le faire, mais en plus BIEN le faire. Merci à Mourad, Nadia et Farida pour avoir cru en moi, pour leur soutien inébranlable, bref, pour avoir été là.

Grenoble, le 18 juin 2007.

À mes parents,

Avant-propos

Jusqu'au XIX^{ème} siècle, la pensée scientifique était principalement gouvernée par le déterminisme. C'est-à-dire par l'idée que la connaissance des lois d'interaction gouvernant un système dynamique, ainsi que de ses conditions initiales, permettaient de déterminer complètement l'évolution de ce système.

A la fin du XIX^{ème} et au début du XX^{ème} siècle, le concept de stochasticité a fait son entrée, décrivant la nature probabiliste des interactions régissant un système. Ainsi, deux systèmes strictement identiques sont susceptibles d'avoir des évolutions différentes du fait de la probabilité qu'a une molécule de changer d'état, ou d'interagir avec d'autres molécules. Par conséquent, l'état d'un tel système est caractérisé par l'existence de fluctuations dont l'amplitude relative est d'autant plus grande que le nombre de molécules en jeu est petit [1].

Ces fluctuations peuvent jouer un rôle déterminant aussi bien pour les systèmes vivants que non vivants. Ainsi, en électronique nanométrique, l'élaboration de composants à quelques électrons fonctionnels doit tenir compte du bruit stochastique [2]. En ce qui concerne la matière vivante, la stochasticité est tout autant présente, et les organismes orchestrent les mécanismes des différentes fonctions cellulaires en gérant les effets des fluctuations stochastiques [3].

Les organismes les moins évolués sujets à ces fluctuations sont les bactéries, qui sont les êtres vivants les plus simples capables d'une vie autonome. Elles sont caractérisées par une absence de noyau et d'organites, et sont délimitées par une ou deux membranes cellulaires, pour un volume généralement égal à 3-10 μm^3 . L'organisation cellulaire permet d'assurer la reproduction, la nutrition, le déplacement, la défense de l'organisme.

Dans l'espace délimité par la membrane, on trouve les éléments indispensables à la vie : l'ADN, qui contient l'information génétique, l'ARN qui traduit cette information, et les protéines, qui sont les « acteurs » de la vie cellulaire. Du fait du nombre limité de ces molécules dans une cellule, l'environnement intracellulaire est soumis à un fort bruit stochastique, car la réplication de l'ADN, sa transcription en ARNm, l'élaboration des protéines, les interactions entre ces molécules, sont autant de processus s'effectuant avec certaines probabilités. Pour autant, les cellules s'accommodent de ces fluctuations, et peuvent développer des fonctions cellulaires particulières.

Nous nous intéressons en particulier au rythme circadien de la régulation génétique chez la cyanobactérie : c'est un oscillateur auto-entretenu programmé génétiquement. Ces horloges circadiennes sont une propriété d'une majorité d'organismes vivants, leur permettant notamment de s'adapter aux changements environnementaux quotidiens auxquels ils sont soumis, du fait de la rotation de la Terre sur elle-même. Nous verrons que l'oscillateur circadien chez la cyanobactérie présente des propriétés de stabilité et de résistance au bruit stochastique remarquables, comparées à certains organismes eucaryotes. Cette stabilité peut soit être le

résultat d'une communication intercellulaire, ou être une propriété intrinsèque de cet oscillateur biochimique.

Dans ce contexte, ce travail de thèse s'est attaché à l'investigation de la première hypothèse : nous nous sommes penchés sur l'existence d'un couplage potentiel entre oscillateurs, permettant d'expliquer les propriétés de robustesse observées. Notre recherche d'un couplage s'appuie à la fois sur des observations expérimentales des oscillations circadiennes chez la cyanobactérie et sur un modèle théorique complété par des simulations numériques.

Le premier chapitre de cette thèse est une introduction aux rythmes circadiens : après avoir défini cette notion, en nous appuyant sur des exemples généraux, nous développerons en détail le cas de la cyanobactérie, et développerons les raisons qui ont motivé cette investigation d'un couplage pour expliquer la stabilité des oscillateurs cyanobactériens.

Le second chapitre est consacré à une description purement théorique des effets du couplage et du bruit stochastique sur la dynamique d'oscillateurs. Après avoir défini brièvement les caractéristiques d'un oscillateur, et introduit les notions indispensables à l'étude de sa dynamique, nous étudierons le cas d'oscillateurs soumis à une force extérieure périodique, ou couplés à d'autres oscillateurs.

Puis nous développerons les choix faits et les techniques expérimentales utilisées pour accéder au suivi temporel de l'horloge circadienne chez les cyanobactéries : nous expliciterons comment il est possible d'accéder à la bioluminescence émise par une population et par une cellule individuelle. Et nous caractériserons les oscillations de bioluminescence en insistant en particulier sur les facteurs externes pouvant influencer leur phase et leur amplitude.

Nous poursuivrons avec l'investigation du couplage proprement dite : nous détaillerons les protocoles expérimentaux que nous avons suivis pour chercher une communication intercellulaire, puis les résultats expérimentaux seront confrontés à un modèle théorique décrivant la dynamique d'oscillateurs mutuellement couplés.

Finalement, nous discuterons la signification de la valeur de la constante de couplage estimée, et ouvrirons la voie à des expériences complémentaires permettant de comprendre les fondements de la stabilité de l'oscillateur circadien.

Table des matières

1	Introduction	1
1.1	Les horloges circadiennes	1
1.1.1	Les rythmes biologiques	1
1.1.2	L'oscillateur circadien.....	3
1.2	Régulation circadienne de l'expression génétique chez la cyanobactérie.....	7
1.2.1	Suivi temporel du rythme circadien : le rapporteur de la luciférase.....	9
1.2.2	Totalité du génome sous le contrôle circadien	11
1.2.3	Contrôle du cycle de division cellulaire par l'horloge circadienne	12
1.2.4	Rôle adaptif de l'horloge	13
1.2.5	Mécanismes moléculaires.....	14
1.2.6	Cœur de l'horloge : rôle de KaiC	16
1.3	Bruit stochastique.....	20
1.3.1	Introduction	20
1.3.2	Exemples de modélisation d'oscillateurs	21
1.3.3	L'oscillateur circadien à l'échelle d'une cellule individuelle	22
1.4	Oscillateur circadien chez la cyanobactérie individuelle.....	26
1.5	Origine de la stabilité.....	29
1.5.1	Couplage entre oscillateurs	29
1.5.2	Cas très particulier de la cyanobactérie.....	29
1.6	La question qui se pose.....	30
2	Synchronisation d'oscillateurs	33
2.1	Les oscillateurs linéaires.....	33
2.2	Les oscillateurs auto-entretenus.....	35
2.3	Oscillations en présence de bruit	38
2.3.1	Oscillateur de phase.....	38
2.3.2	Diffusion de la phase.....	39
2.3.3	Simulations numériques : diffusion de phase	41
2.4	Statistique circulaire	41
2.4.1	Introduction	41
2.4.2	Distribution de Von Mises	44
2.4.3	Exemple : l'oscillateur circadien chez la cyanobactérie.....	46
2.5	Synchronisation d'oscillateurs par une force extérieure.....	49
2.5.1	Modèle de synchronisation par une force extérieure de faible amplitude.....	49
2.5.2	Exemple : les lucioles	50
2.5.3	Entraînement de cyanobactéries par une variation périodique lumineuse	53

TABLE DES MATIÈRES

2.6	Oscillateurs mutuellement couplés.....	55
2.6.1	Couplage entre deux oscillateurs.....	55
2.6.2	Couplage mutuel entre N oscillateurs.....	56
3	Caractérisation de la bioluminescence des cyanobactéries	65
3.1	Dispositifs expérimentaux.....	65
3.1.1	Croissance et cultures cellulaires.....	65
3.1.2	Mesure de la densité cellulaire de cultures.....	69
3.1.3	Acquisition de la bioluminescence d'une population d'oscillateurs.....	73
3.1.4	Principe de l'imagerie de cellule unique.....	77
3.2	Bioluminescence d'une population de cyanobactéries.....	82
3.2.1	Intensité de bioluminescence émise par un puits.....	82
3.2.2	Choix de la densité optique initiale des cultures.....	87
3.2.3	Influence de la lumière externe sur le rapporteur de la luciférase.....	88
3.2.4	Comparaison bioluminescence/lumière extérieure.....	91
3.2.5	Effet de la congélation sur l'horloge circadienne.....	93
3.2.6	Influence de la dilution sur la phase des oscillations.....	95
3.2.7	Largeur de distribution de phase d'une population d'oscillateurs entraînés.....	99
3.3	Analyse de données.....	105
3.3.1	Analyse du signal de bioluminescence émis par un puits.....	105
3.3.2	Analyse d'images.....	115
3.3.3	Incertitude sur la détermination de la phase moyenne et du paramètre d'ordre.....	120
4	Évaluation du couplage	127
4.1	Principes des expériences.....	127
4.1.1	Distribution uniforme de phases.....	129
4.1.2	Interaction entre 2 populations entraînées de phases initiales différentes.....	132
4.1.3	Principe de suivi à long terme.....	135
4.2	Recherche expérimentale d'un couplage.....	137
4.3	Description théorique de l'interaction entre oscillateurs.....	140
4.3.1	Modèle théorique.....	140
4.3.2	Résolution analytique du système.....	142
4.3.3	Simulation numérique.....	143
4.4	Détermination d'une borne supérieure du couplage.....	148
4.4.1	Coefficient d'autocorrélation.....	148
4.4.2	Estimation du couplage intercellulaire.....	149
4.4.3	Etude de l'amplitude des oscillations.....	153
5	Conclusions	155

TABLE DES MATIÈRES

5.1	Rôle du couplage intercellulaire pour la stabilité du cycle circadien des cyanobactéries ...	155
5.2	Signification de la limite supérieure de la constante de couplage.....	156
5.3	Perspectives.....	157

TABLE DES MATIÈRES

Chapitre 1

Introduction

1.1 Les horloges circadiennes

1.1.1 Les rythmes biologiques

Tous les êtres vivants, humains, animaux et végétaux sont soumis à des rythmes naturels : la rythmicité est une des propriétés fondamentales de la matière vivante. Un rythme biologique se définit comme la variation périodique ou cyclique d'une fonction particulière d'un être vivant. Celui-ci peut être d'ordre physiologique (battement cardiaque, activité électrique cérébrale...), biochimique (synthèse moléculaire, hormonale...) ou comportementale (sommeil, migration...). Les rythmes biologiques sont classés en 3 grandes catégories [4]:

- les rythmes ultradiens, qui ont des périodes petites (comparées à $T=24$ h) comme par exemple l'activité électrique cérébrale, dont la période est d'environ 1 s chez un individu éveillé, le rythme cardiaque (1 s), ou encore nos cycles nocturnes de sommeil paradoxal de période voisine de 90 min).
- les rythmes circadiens, qui ont une période d'environ 24 h. On peut citer par exemple l'éclosion des œufs chez les insectes, l'activité locomotrice chez les mammifères, ou encore l'alternance veille-sommeil chez l'Homme.
- Les rythmes infradiens, qui sont des rythmes lents. Ils peuvent être mensuels (ex : le cycle ovarien), saisonniers ou annuels, ou pluriannuels, comme par exemple les floraisons végétales qui ont lieu selon un rythme dont la période peut aller jusqu'à plusieurs dizaines d'années pour certaines espèces de bambou.

Ces rythmes sont caractéristiques de l'adaptabilité des organismes vivants aux variations de leur environnement [5]. Ils sont sous le contrôle d'horloges biologiques internes : ce sont des oscillateurs auto-entretenus programmés génétiquement. Le fonctionnement de ces oscillateurs est l'objet de nombreuses études en biologie moléculaire, le but étant de comprendre les interactions physico-chimiques intracellulaires à l'origine de ces rythmes.

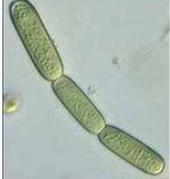
	Organisme	Rythmes circadiens	Principaux gènes de l'horloge
	<i>Neurospora</i> (champignon)	Conidiation Expression génétique	<i>frq, wc1, wc2</i>
	<i>Drosophila</i> (mouche)	Activité locomotrice Expression génétique	<i>per, tim, cyc, clk</i>
	<i>Synechococcus</i> (cyanobactérie)	Division cellulaire Photosynthèse Expression génétique	<i>kaiA, kaiB, kaiC</i>
	<i>Gonyaulax</i> (algue)	Division cellulaire Photosynthèse Bioluminescence	<i>lbp</i>
	<i>Euglena</i> (euglène)	Division cellulaire Photosynthèse Phototaxie	
	<i>Arabidopsis</i> (plante)	Mouvement des feuilles	<i>lhy, cca1, toc1</i>
	<i>Homme, souris, rat, hamster</i> (mammifères)	Activité locomotrice Système neuronal Expression génétique	<i>mper1,2,3, mtim, bmal1, clock (tau)</i>

FIG. 1-1 Quelques exemples d'organismes dotés d'une horloge circadienne, et principaux gènes clés de l'oscillateur biochimique.

(D'après Gonze D, « Les horloges biologiques »,

<http://student.ulb.ac.be/~dgonze/CLOCKS/horloges.html> 2006)

1.1.2 L'oscillateur circadien

L'oscillateur circadien (du latin *circa* - environ, et *dies* - jour) est un oscillateur biochimique auto-entretenu ayant une période d'environ 24h. Il a été mis en évidence chez une large variété d'organismes, parmi lesquels l'humain, les autres mammifères, les vertébrés, les insectes, les plantes, les champignons, et même dans des organismes simples comme les bactéries (FIG. 1-1). La coordination entre les processus biologiques internes et les cycles de l'environnement externe est vitale pour la survie de ces organismes.

Jean-Jacques d'Ortous de Mairan a rapporté à l'Académie des sciences de Paris en 1729 ses observations d'un rythme d'ouverture des feuilles de mimosa, rythme persistant lorsque les plantes se trouvent placées en obscurité constante. Ce qui prouve l'existence d'une horloge biologique interne ne nécessitant pas de stimuli externes, comme une variation périodique de la luminosité par exemple. Par la suite, la notion d'horloge circadienne a été formulée, en ajoutant deux caractéristiques permettant de la définir précisément :

L'horloge doit être compensée en température, c'est-à-dire que la période d'oscillation ne doit pas dépendre (ou très peu) de la température à laquelle l'oscillateur est placé, et ce pour un écart de température de l'ordre de 10°C. Il faut noter que pour la plupart des réactions biochimiques, une variation de 10°C entraîne une variation d'un facteur 2 des constantes de réaction [6]. Cela signifie que sans compensation en température, un oscillateur biochimique de période propre égale à 24 h à 20°C, aurait une période égale à 12h à 30°C. Ce qui rendrait l'oscillateur inadapté aux variations journalières liées à la rotation de la Terre.

La seconde caractéristique de l'horloge circadienne est son aptitude à être entraînée (ou forcée) à une période exactement égale à 24 heures par un signal périodique externe. En conditions externes constantes, les oscillateurs biochimiques n'ont pas une période rigoureusement égale à 24 h, mais il doit être possible de les entraîner par de nombreux signaux périodiques externes (lumière, température, concentration de CO₂...) de période précisément égale à 24 h, leur permettant de s'adapter aux variations liées à la rotation de la Terre.

En résumé, un oscillateur est dit circadien s'il respecte les 3 conditions suivantes :

- i. La période propre doit être proche de 24 h. Le terme « propre » désigne un oscillateur évoluant dans un environnement dont les paramètres sont constants.
- ii. L'oscillateur doit être compensé en température.
- iii. L'horloge doit pouvoir être entraînée à une période d'exactly 24 h, par un signal périodique externe.

Jusqu'au début des années 1990, les mécanismes moléculaires à la base de ces horloges étaient peu connus. Grâce aux progrès réalisés dans le domaine de la biologie moléculaire et génétique, de nombreuses avancées ont été faites dans la compréhension du fonctionnement moléculaire des horloges de nombreux organismes [7].

Malgré la diversité des espèces montrant un rythme circadien, l'origine de toutes les horloges circadiennes est la même : il s'agit d'au moins un oscillateur circadien interne auto-entretenu. Dans les organismes unicellulaires, chaque cellule possède sa propre horloge circadienne. Ainsi, l'oscillation circadienne a été observée chez des cellules isolées d'espèces comme le dinoflagellé marin *Gonyaulax polyedra* [8], *Neurospora Crassa* [9], ou encore chez la cyanobactérie *Synechococcus Elongatus* [10] (que nous étudierons en détail un peu plus loin). En fait, même chez les organismes pluricellulaires, on a montré l'existence d'oscillateurs circadiens à l'échelle d'une cellule : chez l'escargot *Bulla gouldiana* [11] par exemple, des neurones individuels à la base de la rétine ont montré un rythme circadien de la conductance de la membrane, pendant au moins deux jours. Une autre étude a permis d'observer des oscillations circadiennes chez des neurones individuels des noyaux suprachiasmatiques (SCN) du rat [12]. (Le noyau suprachiasmatique [13] est une structure paire du cerveau, située dans l'hypothalamus, chaque noyau contient 8000 à 10 000 neurones).

Ces oscillateurs sont constitués d'éléments positifs et négatifs (FIG. 1-2), qui engendrent une boucle de rétroaction, et dans la plupart des cas, ces boucles génèrent des oscillations de période égale à 24 h [7]. Les composants de ces boucles peuvent recevoir directement ou indirectement des signaux environnementaux. Ceci permet d'une part l'entraînement de l'horloge par des variations périodiques externes, et d'autre part de transférer des informations temporelles permettant la régulation de l'activité biologique, et des gènes dont l'expression est sous contrôle circadien.

Exemples

Nous allons présenter ici quelques exemples d'organismes vivants présentant une régulation circadienne de leur activité physiologique et génétique, en donnant pour chacun quelques éléments du mécanisme moléculaire à l'origine de l'horloge circadienne.

- *Neurospora crassa* [9]

Le champignon *Neurospora* présente un rythme circadien physiologique facilement observable en laboratoire : toutes les 21.5 h environ, la croissance s'arrête et donne lieu à la formation d'une bande de conidies (spores asexuelles) de couleur orange.

Le gène central de l'horloge circadienne est *frq* (pour « frequency »). Deux autres gènes *wc-1* et *wc-2* ("white-collar") codent pour deux protéines photosensibles et régulatrices de la transcription : WC-1 et WC-2. FRQ inhibe sa propre expression indirectement en désactivant le complexe WCC formé par les protéines WC-1 et WC-2. Enfin, la lumière active la transcription du gène *frq*, par l'intermédiaire du complexe WCC.

- *Drosophila melanogaster*

La drosophile, ou mouche du vinaigre, est un insecte très étudié en génétique, car d'une part elle se reproduit très rapidement, et d'autre part, ses chromosomes sont gros et facilement

observables. Depuis les travaux menés [14] par Konopka et Benzer (1971) qui ont, les premiers, obtenus des mouches mutantes dont le rythme d'activité est altéré, la drosophile est devenue l'un des organismes les plus étudiés pour les rythmes circadiens. On distingue notamment deux comportements circadiens chez la mouche : le rythme d'activité locomotrice et le rythme d'éclosion : toutes les mouches parvenues à maturité éclosent au même moment, entre 6 et 9h du matin.

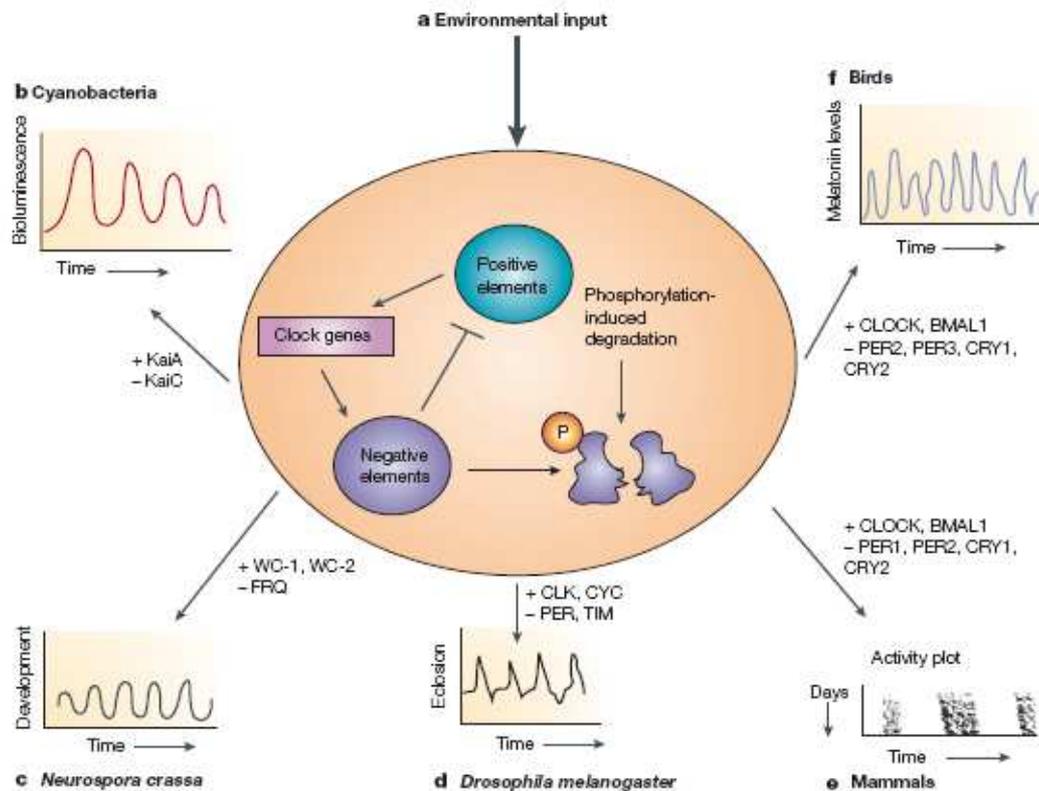


FIG. 1-2 Les oscillateurs circadiens sont régulés par des mécanismes qui présentent des similarités chez de nombreux organismes vivants. **a)** Beaucoup de ces mécanismes sont basés sur des boucles de rétroaction, constituées de répresseurs et d'activateurs de transcription. Les gènes centraux de l'horloge régule les rythmes circadiens des processus biologiques, et codent pour des protéines inhibant l'activité des activateurs. **b-f)** Bien que les mécanismes présentent des similarités, les composants de l'horloge varient d'un organisme à l'autre. Les éléments activateurs et répresseurs sont respectivement indiqués par un + et un -.

(D'après Bell-pederson D *et al.*, «Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms », **Nature reviews Genetics** 2005, 6(7):544-556.)

Le mécanisme de l'horloge est constitué notamment de deux boucles de rétroaction de transcription, et les gènes participant à ces boucles sont présents dans de nombreux tissus dans la tête, le thorax, et l'abdomen. Dans tous ces tissus, l'expression des gènes est régulée de façon circadienne, impliquant donc qu'ils contiennent des oscillateurs circadiens. On distingue l'oscillateur « central », qui comprend plusieurs groupes de neurones dans le cerveau, et régule le rythme des activités locomotrices, et les oscillateurs périphériques dans la tête et le corps [7].

Les gènes *per* et *tim* codent respectivement pour les protéines correspondantes PER et TIM, qui sont synthétisées dans le cytosol. Une fois qu'elles sont phosphorylées, elles forment un complexe capable de migrer vers le noyau et d'y inhiber indirectement la transcription de leur propre gène. Cette action s'exerce par l'intermédiaire des gènes *cyc* et *clk*. Les protéines correspondantes CYC, (pour « cycle »), et CLK (pour « clock ») formeraient un complexe pouvant activer la transcription des gènes *per* et *tim*. Le complexe PER-TIM aurait alors pour fonction d'inhiber la formation du complexe entre CYC et CLK, et exercerait donc une rétroaction négative indirecte sur la transcription de ses propres gènes *per* et *tim*.

- Les mammifères

Ce sont principalement sur les rats, les souris et les hamsters que les études du rythme circadien chez les mammifères ont été menées. Le rythme d'activité de la souris se mesure en effet facilement en laboratoire [15]. L'expérience classique consiste à placer une roue dans la cage de la souris, et à mesurer les tours de roue. En condition d'alternance jour/obscurité, les souris sont actives durant la nuit, et sont quasiment inactives dans la journée. En condition d'obscurité, le cycle d'activité circadienne perdure, avec une période propre d'environ 24 h.

Les noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus [13] (SCN) sont un groupe de neurones interconnectés situé à la base du cerveau. Les gènes de l'horloge ne sont pas seulement exprimés dans les SCN, mais aussi dans d'autres parties du cerveau, le foie, les muscles, les reins, et dans plusieurs autres tissus [7]. Et là aussi, l'expression des gènes est rythmique. *In vivo*, cependant, il semble que les SCN jouent un rôle d'oscillateur principal contrôlant ces oscillateurs périphériques. En effet, les lésions des SCN entraînent une disparition apparente des rythmes dans les autres tissus [16]. Ces rythmes peuvent être restaurés après une greffe de SCN (la période est alors celle du donneur) [17]. Ce pacemaker reçoit l'information provenant de la rétine via le tractus retino hypothalamique (RHT) (système photique) qui est indépendant du mécanisme de la vision [18].

Concernant le mécanisme moléculaire [19], il s'agit ici encore d'un complexe protéique CLOCK/BMAL1 qui peut se former, et activer la transcription de gènes homologues à *per* chez la drosophile : il s'agit ici de 3 gènes identifiés chez la souris : *mper1*, *mper2*, *mper3*. Par ailleurs, deux autres gènes jouent un rôle important : *mcry1* et *mcry2* qui codent pour des protéines appartenant à la famille des cryptochromes, récepteurs à la lumière bleue (mCRY1 et

mCRY2). Or, des mutations au niveau de ces gènes (double mutant *mcry1-mcry2*) affectent le fonctionnement de l'horloge.

1.2 Régulation circadienne de l'expression génétique chez la cyanobactérie

La cyanobactérie est le plus simple des organismes possédant un cycle circadien. Elle fait partie de la classe des bactéries, et est donc un organisme procaryote. Les cyanobactéries font partie des premiers organismes vivants apparus sur Terre, puisque leur origine remonterait à 3.8 milliards d'années. Du fait de leur activité photosynthétique, elles sont notamment à l'origine de l'enrichissement de l'atmosphère en dioxygène. Elles ont colonisé presque tous les milieux, qu'ils soient aquatiques ou terrestres, y compris ceux où règnent conditions extrêmes puisqu'on les observe dans les glaces des pôles, les sources d'eaux ferrugineuses, ou les geysers. On les trouve par ailleurs aussi bien en eau salée qu'en eau douce, soit vivant dans la masse d'eau (forme « planctonique »), ou fixées à des supports immergés. La prolifération des cyanobactéries peut être problématique, car en formant un tapis à la surface de l'eau, elles empêchent toute autre activité chlorophyllienne et diminuent les échanges gazeux entre l'air et l'eau, ce qui nuit au développement de la faune et de la flore aquatique. Par ailleurs, certaines souches sont susceptibles de libérer des substances toxiques qui peuvent être dangereuses pour l'homme et les animaux.

La bactérie sur laquelle nous centrons notre étude est la cyanobactérie d'eau douce *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (FIG. 1-3). C'est une bactérie de forme allongée (2-8 μm) de largeur 1 μm . Le génome de la bactérie est constitué d'un chromosome circulaire (2.69 Mpb). Cette bactérie est choisie dans de nombreuses études du cycle circadien, car elle permet l'insertion, avec succès, de séquences d'ADN étranger à son génome, technique utilisée depuis le début des années 70 [20]. De plus, elle se cultive facilement en laboratoire.

C'est seulement au début des années 90 que les preuves de l'existence d'une horloge biologique chez les cyanobactéries ont été mises en évidence [21]. En effet, jusqu'au début des années 80, la communauté scientifique pensait que le rythme circadien était une spécificité des cellules eucaryotes, se divisant moins d'une fois par jour [22].

La question a été posée de comprendre comment un organisme peut, au sein d'une même cellule, fixer l'azote et produire de l'oxygène via la photosynthèse [23]. En effet, la nitrogénase – enzyme clé pour la fixation de l'azote – voit son action inhibée en présence d'oxygène. Beaucoup de cyanobactéries filamenteuses différencient des cellules spécialisées dans la fixation de l'azote – hétérocystes – et dans la photosynthèse ; cette séparation spatiale permet ainsi la réalisation de ces deux besoins de l'organisme : on parle de cyanobactéries hétérocystiques. Concernant les bactéries non hétérocystiques, en 1985, une étude a été publiée montrant que la cyanobactérie

Oscillatoria opère une séparation temporelle de la photosynthèse et de la fixation de l'azote, lorsqu'elle est placée dans un environnement aux conditions périodiques de lumière, ce rythme persistant même en conditions constantes d'éclairage [24, 25]. Par la suite, une première étude a été publiée en 1993, prouvant l'existence d'une horloge circadienne chez la cyanobactérie *Synechococcus elongatus* PCC 7942 [21].

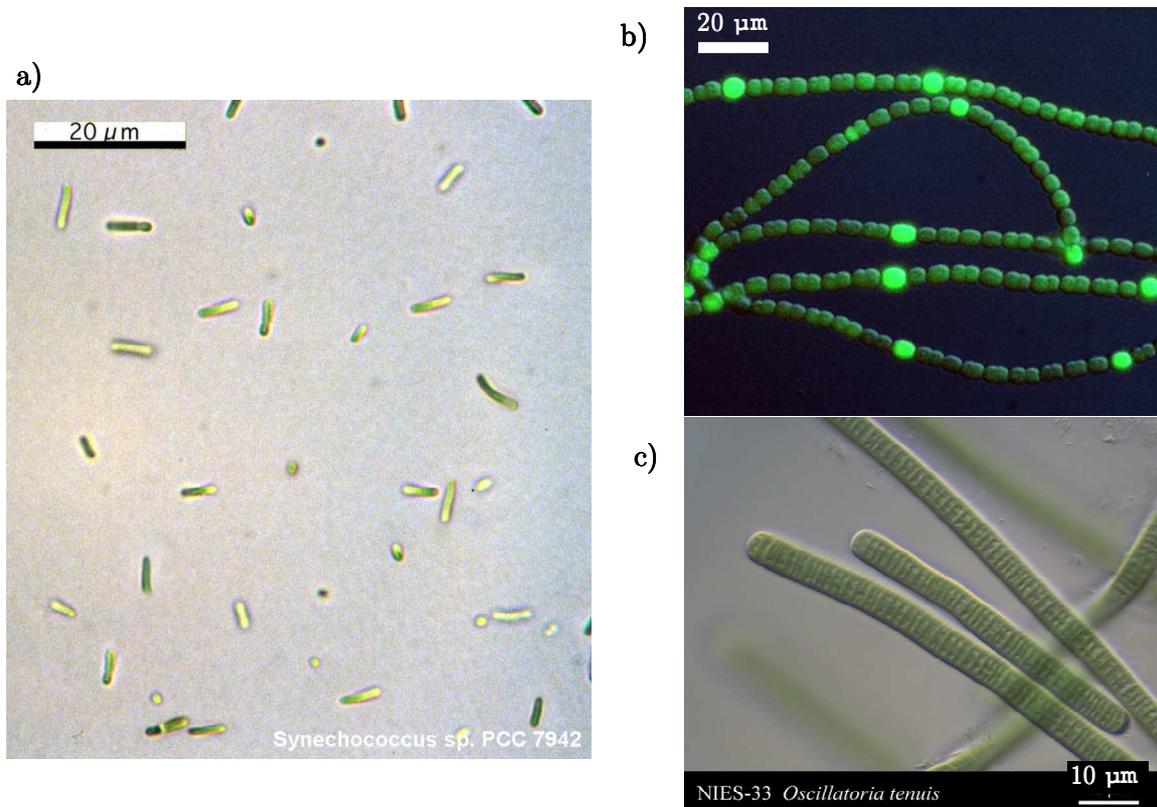


FIG. 1-3 Les cyanobactéries sont des organismes procaryotes qui contiennent notamment un pigment vert : la chlorophylle. **a)** *Synechococcus elongatus* PCC 7942 est une cyanobactérie marine d'eau douce, de forme allongée. (D'après http://www.ibvf.csic.es/Cultivos/Seccion_I.htm)
b) *Anabaena* différencie spatialement la photosynthèse et la fixation de l'azote. Ici, elle est modifiée génétiquement pour que les hétérocystes expriment une protéine fluorescente. (D'après http://www.mun.ca/biochem/courses/3107/Topics/Site_specific_Recomb.html).
c) *Oscillatoria tenuis* opère une séparation spatiale de la photosynthèse et de la fixation de N_2 . (D'après <http://www.nies.go.jp/biology/mcc/class/Oscillatoria.html>)

1.2.1 Suivi temporel du rythme circadien : le rapporteur de la luciférase

L'étude du rythme circadien chez cette cyanobactérie a été pour la première fois réalisée grâce à l'utilisation d'une souche de *Synechococcus elongatus* PCC 7942 dans laquelle est introduit un gène rapporteur de la luciférase [21]. La luciférase (LuxAB) est une enzyme naturellement produite par la bactérie marine *Vibrio harveyi*, via les gènes *luxAB* (FIG. 1-4). La production de bioluminescence est une réaction d'oxydation de la flavine (FMNH₂), catalysée par l'hétérodimère LuxAB, en présence d'un substrat : le *n*-decanal. – La flavine est une enzyme d'oxydoréduction naturellement présente dans la cyanobactérie –



Le spectre d'émission des photons est large et centré à une longueur d'onde $\lambda = 490$ nm.



FIG. 1-4 Bioluminescence de la bactérie *Vibrio Harveyi*. Cette bactérie est naturellement luminescente (sans excitation par radiation lumineuse), et produit ~ 5000 photons/ minutes. (A droite : culture éclairée en lumière naturelle. A gauche : dans l'obscurité)

Le gène rapporteur de la luciférase est constitué des gènes *luxAB* dépourvus de promoteur, accolés au promoteur du gène *psbAI*, qui code pour une protéine du système photosynthétique de la bactérie. On note ce rapporteur *PpsbAI::luxAB*.

Outre les gènes *luxAB* et le promoteur *PpsbAI*, l'insert contient aussi un gène résistant à un antibiotique, comme le montre la FIG. 1-5a. L'insert est introduit sur un site dit « neutre » du chromosome de la cyanobactérie, c'est-à-dire un locus où l'insertion de gènes étrangers est sans effet apparent quant au fonctionnement de la bactérie.

Grâce à un dispositif muni de photomultiplicateur, il est alors possible de suivre l'évolution temporelle de la bioluminescence émise par une population de cellules ($\sim 10^8$ cellules). La souche ainsi obtenue (AMC 149) émet des oscillations de bioluminescence, de période environ 24 h en condition d'éclairage constant (FIG. 1-5). Les oscillations sont par ailleurs compensées en température, et peuvent être entraînées à une nouvelle phase grâce à plusieurs cycles lumière/obscurité (cycle « LD ») de 24 h. Lorsque les cyanobactéries sont placées en lumière constante, pour chaque période d'oscillation, on définit deux intervalles de temps : le « jour subjectif » et la « nuit subjective », qui correspondent aux intervalles de temps « jour » et « obscurité » d'un cycle LD qui donnerait la même oscillation circadienne. Par la suite, on adopte les notations suivantes : lorsque les cellules sont placées en lumière constante, ou dans l'obscurité constante, on parlera respectivement de cycles « LL », ou « DD » (pour *light/light*, ou *dark/dark*). Les cycles d'entraînement seront notés « LD » (pour *light/dark*). Ainsi, pour un cycle d'entraînement composé de 12 h de lumière, et 12 h d'obscurité, on notera : LD 12 :12.

De nombreux contrôles ont été réalisés [26], afin d'assurer que l'oscillation de bioluminescence observée reflète effectivement le rythme circadien des cyanobactéries. Ainsi, des expériences montrent que le quantité d'ARNm *luxAB* oscille avec une période approximative de 24 h, et en phase avec l'ARNm *psbAI* de souches sauvages. Etant donné que l'ARNm *luxAB* a une courte durée de vie, les oscillations observées témoignent bien de la régulation circadienne de l'activité du promoteur de *psbAI*. Par ailleurs, la présence du rapporteur de la luciférase ne perturbe pas la croissance cellulaire des bactéries [26].

L'étude du cycle circadien des cyanobactéries utilisant un rapporteur de la luciférase constitue donc un excellent moyen de suivre les oscillations circadiennes sans perturber le métabolisme cellulaire. Par ailleurs, l'ARNm *luxAB* et l'enzyme LuxAB se dégradent suffisamment rapidement pour pouvoir retransmettre de manière fiable le rythme circadien de l'activité du promoteur de *psbAI* [21, 26].

Dans certain cas, plutôt que d'introduire l'aldéhyde de manière exogène, on peut également introduire sur le chromosome de la bactérie un groupe de gènes issu de la bactérie *Xenorhabdus luminescens* : *luxCDE*, ce qui permet la production de l'aldéhyde *in vivo*.

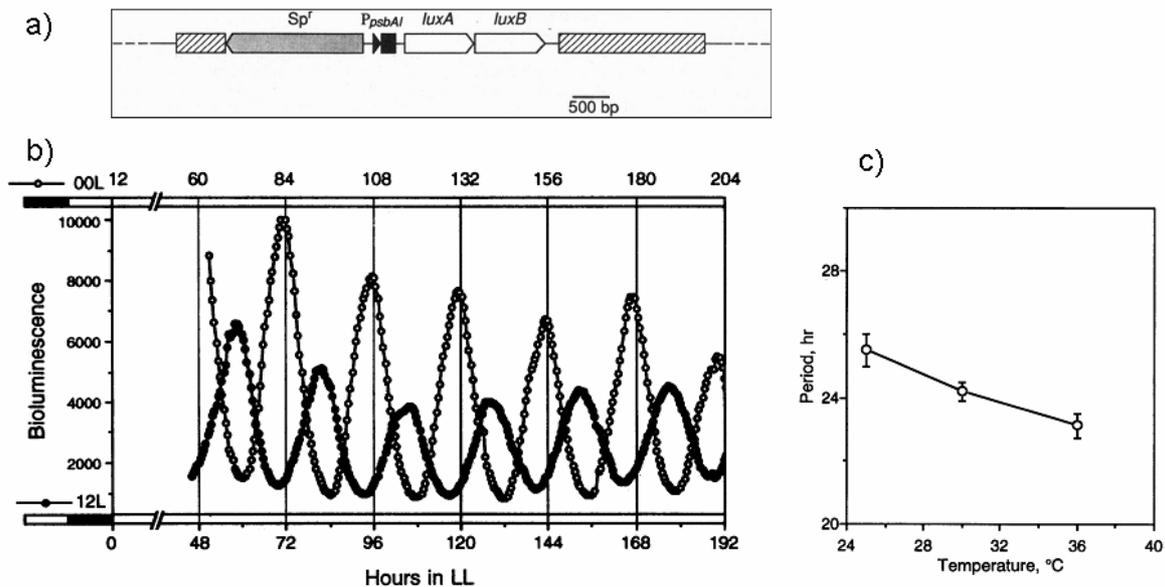


FIG. 1-5 Acquisition des oscillations circadiennes grâce au rapporteur de la luciférase.

a) Représentation schématique de l'insert rapporteur de la luciférase. Les flèches représentent le gène résistant aux antibiotiques (spectinomycine/streptomycine), et les gènes *luxAB*; la flèche indiquant le sens de la transcription. Les rectangles rayés représentent les séquences d'ADN de *Synechococcus* permettant l'insertion du rapporteur dans un site neutre du chromosome de la cyanobactérie. Deux cultures de cellules de la souche AMC 149 sont entraînées avec des cycles en opposition de phases de 12 h de jour, 12 h d'obscurité. b) Les deux cultures émettent des oscillations de bioluminescence en opposition de phase, de période proche de 24 h. Ces oscillations sont compensées en température. c) Période propre des oscillations mesurées à 3 températures différentes, démontrant la compensation en température des oscillateurs cyanobactériens.

(D'après Kondo T *et al.*, « Circadian rhythms in prokaryotes : luciferase as a reporter of circadian gene expression in cyanobacteria », *Proc. Natl. Acac. Sci. USA*, 90 :5672-5676.)

1.2.2 Totalité du génome sous le contrôle circadien

Un peu plus tard, des études approfondies sur des colonies de cellules ont montré que c'est quasiment l'ensemble du génome de la bactérie qui est sous contrôle circadien [27]. Quel que soit le promoteur derrière lequel est inséré le gène rapporteur de la luciférase, les colonies émettent des oscillations de bioluminescence de période environ 24 h, ce qui prouve que tous les promoteurs testés sont sous contrôle circadien [28]. Selon l'allure et la phase des oscillations

observées, les promoteurs sont classés en 5 catégories : les classes 1 à 3 ont des formes sinusoidales symétriques, mais leur maxima sont décalés ; et les classes 4 et 5 regroupent les oscillations dissymétriques.

De plus, des expériences ont montré que même des promoteurs étrangers à la bactérie, comme par exemple un promoteur de *Escherichia coli*, étaient régulés par l'horloge circadienne lorsqu'ils sont insérés dans le génome de la cyanobactérie. Il semble donc que l'horloge circadienne de la cyanobactérie contrôle l'expression de la totalité du génome. La régulation ne semble pas être spécifique à des promoteurs particuliers.

1.2.3 Contrôle du cycle de division cellulaire par l'horloge circadienne

Dans des conditions optimales de croissance, les cyanobactéries peuvent se diviser jusqu'à 3-4 fois par 24 h [29]. Malgré ce taux de division, on a observé qu'une population d'oscillateurs émet des oscillations de bioluminescence sur plus de 10 générations [30].

Cependant, le cycle de division cellulaire n'est pas indépendant de l'horloge circadienne [29]. Lorsque la cyanobactérie *Synechococcus elongatus PCC 7942* est soumise à des variations périodiques de lumière (12 h de jour/12 d'obscurité), elle ne se divise que durant le jour. En lumière constante, il apparaît qu'il y a une durée de 4 h environ au cours de laquelle aucune division cellulaire n'a lieu, les cellules se contentant de croître, sans se diviser. Ainsi, la division cellulaire est « autorisée » durant le jour subjectif, et tard dans la nuit subjective. L'horloge circadienne des cyanobactéries est donc robuste à la division cellulaire, mais contrôle aussi les instants autorisant ou interdisant la division.

Ceci est confirmé par le fait que pour des souches mutantes de AMC 149, comme par exemple SP22, ou LP 27 (qui ont respectivement des périodes d'oscillations de bioluminescence de 22 h et de 27-28h), les périodes du cycle de division changent et deviennent égales à celles des mutants respectifs. De plus, la délétion de *kaiC*, qui est un gène majeur dans le fonctionnement de l'oscillateur, annihile non seulement le rythme circadien d'expression des gènes, mais également le rythme de division cellulaire [31].

Des travaux supplémentaires [32] montrent que le cycle circadien est indépendant de la division cellulaire chez la cyanobactérie. La surexpression du gène *ftsZ* engendre un arrêt de la division cellulaire de la bactérie, qui croît alors sous forme de filaments sans se diviser. Malgré cette incapacité à se diviser, on observe toujours les oscillations de bioluminescence d'expression des gènes.

En conclusion, l'horloge circadienne contrôle la division cellulaire chez cette bactérie.

1.2.4 Rôle adaptif de l'horloge

On peut supposer que du point de vue de l'évolution, l'horloge circadienne améliore la survie des espèces en leur permettant de s'adapter facilement aux variations quotidiennes de leur environnement [25].

Pour tenter d'élucider cette question, des comparaisons ont été faites entre des souches de cyanobactéries oscillant à des périodes propres différentes [33]. Les souches utilisées sont la souche sauvage AMC 149 (de période ~ 25 h), et deux souches mutées de celle-ci : SP22 (de période ~ 23 h) et P28 (de période ~ 30 h). Dans les deux cas, ces souches ont des points de mutation sur le gène *kaiC*. Lorsque ces cellules sont mises à croître séparément, leur taux de croissance est identique, aussi bien en lumière constante que pour des cycles périodiques de 24 h LD 12 :12, ou d'autres périodes : LD 11 :11, et LD 15 :15. A priori, il n'y a pas d'avantage ou d'inconvénient à avoir une période propre donnée lorsque les cellules sont cultivées séparément. Cependant, lorsque deux souches différentes sont cultivées ensemble, on observe des différences de taux de croissance, qui dépendent de la nature du cycle LD appliqué. La souche dont la période propre est la plus proche de celle de l'entraînement externe « élimine » la souche « concurrente », en se divisant bien plus vite. Par contre, en lumière constante, les deux souches ont approximativement le même taux de division. Le paramètre crucial dans la sélection qui s'opère semble être le déphasage entre l'oscillation circadienne, et le cycle d'entraînement LD, qui dépend de la période propre de l'oscillation, et de la période du cycle LD.

Le mécanisme physiologique expliquant comment la sélection entre deux souches est réalisée n'est cependant pas encore connu. La sécrétion d'un inhibiteur de croissance par les souches en compétition est suggérée. Un modèle s'appuyant sur les observations expérimentales et sur cette hypothèse a été élaboré, afin de comprendre le fonctionnement de la sélection qui s'opère pour deux souches en compétition [34]. Cette théorie considère l'oscillateur circadien comme un oscillateur de Van der Pol sensible à la lumière, contrôlant la croissance cellulaire, ainsi que la sécrétion d'inhibiteurs de croissance. Cette description permet de générer des oscillations circadiennes dont la phase dépend effectivement de la période propre et du cycle LD appliqué, conformément aux observations expérimentales. Concernant la croissance de souches en compétition ou non, la dynamique des populations est décrite par des équations prenant en compte d'une part la sécrétion continue d'inhibiteurs, et d'autre part la croissance cellulaire lorsque les bactéries sont éclairées (tout en interdisant toute division pendant un intervalle de temps bien précis dicté par l'oscillateur circadien).

Cette description permet de mieux comprendre la contradiction apparente entre l'égalité des taux de croissance des souches cultivées séparément, et la compétition qui s'installe lorsqu'elles sont mises en contact. La vitesse de dégradation de l'inhibiteur, la différence de phase entre le cycle LD et l'oscillateur circadien, et la proportion des populations mélangées jouent notamment un rôle déterminant dans l'émergence d'une population sur l'autre pour deux souches en compétition.

Ces travaux montrent que l'horloge circadienne confère un avantage certain en cas de croissance compétitive, si la période de l'horloge est proche de celle des variations de l'environnement.

1.2.5 Mécanismes moléculaires

Il y a une dizaine d'années, les 3 gènes clés *kaiA*, *kaiB*, *kaiC* à l'origine du rythme circadien chez la cyanobactérie ont été identifiés [35]. Les gènes *kaiB* et *kaiC* forment un opéron cotranscrit par le promoteur *PkaiBC* alors que *kaiA* est transcrit indépendamment des deux autres. Les taux des deux ARNm correspondant varient rythmiquement dans la cellule. Les taux de protéines KaiB et KaiC varient également selon un rythme circadien, mais la concentration en protéine KaiA ne semble pas être le siège d'oscillations circadiennes. De nombreuses études montrent par ailleurs que ces 3 protéines interagissent, et forment un large complexe, appelé « périodosome » selon un cycle circadien [36-41].

Des mutations ponctuelles de l'un de ces gènes peuvent conduire à des mutants arythmiques, ou dont les périodes d'oscillation vont de 16 à 60 h (FIG. 1-6D) [42, 43]. L'inactivation ou la délétion de l'un de ces 3 gènes annihile la régulation circadienne de l'expression des gènes, sans pour autant qu'il y ait d'effet apparent sur la croissance cellulaire (FIG. 1-6) [35, 44]. De plus, la protéine KaiC inhibe la transcription de son propre gène, tandis que KaiA agit comme un activateur de la transcription, tout en supprimant l'activité circadienne du promoteur [35]. Une étude supplémentaire montre qu'en fait, la surexpression de KaiC annihile l'activité circadienne de l'ensemble des promoteurs de la bactérie [28, 44]. Ce qui laisse penser que c'est cette protéine qui coordonne l'expression circadienne de l'ensemble du génome.

Par ailleurs, dans une certaine gamme de concentrations, des impulsions de 6h de KaiC dans les bactéries engendrent des changements de la phase d'oscillation, comparés à une souche n'ayant pas subi ce traitement [45]. Les déphasages engendrés dépendent de la concentration de l'impulsion de KaiC, et de l'heure circadienne à laquelle l'impulsion est faite. Les déphasages observés sont maximaux lorsque les impulsions de KaiC sont administrées aux heures circadiennes correspondant normalement à un minimum de concentration en KaiC.

Par ailleurs, d'autres travaux montrent l'importance de deux protéines : SasA et RpaA [46, 47]. SasA est une histidine kinase, et RpaA présente des motifs liant à l'ADN. KaiC peut déclencher la phosphorylation de SasA, qui est alors capable de phosphoryler RpaA. Par ailleurs, la délétion de *SasA* ou *RpaA* entraîne une réduction importante de la transcription de *kaiBC*, ainsi qu'une activité circadienne réduite du promoteur de *kaiBC*. Cette étude suggère donc un mécanisme supplémentaire de contrôle de l'expression rythmique des gènes, et laisse entrevoir qu'il est possible que d'autres processus de contrôle circadien de la transcription, augmentant la stabilité de l'oscillateur KaiABC en cycles LL ou LD existent.

Les mécanismes précis grâce auxquels l'oscillateur KaiABC régule l'expression globale du génome ne sont pas encore connus. Cependant, il est possible que la clé de cette régulation globale réside dans un mécanisme permettant directement ou indirectement au périodosome – un complexe formé par KaiC et KaiA et/ou KaiB - d'influer sur l'état de condensation du chromosome. En effet, le degré de compaction peut interdire ou permettre aux facteurs de transcription d'accéder aux promoteurs. La compaction ou non de l'ADN pourrait donc expliquer comment il est possible de réguler l'ensemble du génome [48]. Cette hypothèse est appuyée par des travaux montrant notamment que structurellement, KaiC présente des similarités avec des protéines connues pour pouvoir se lier à l'ADN [49].

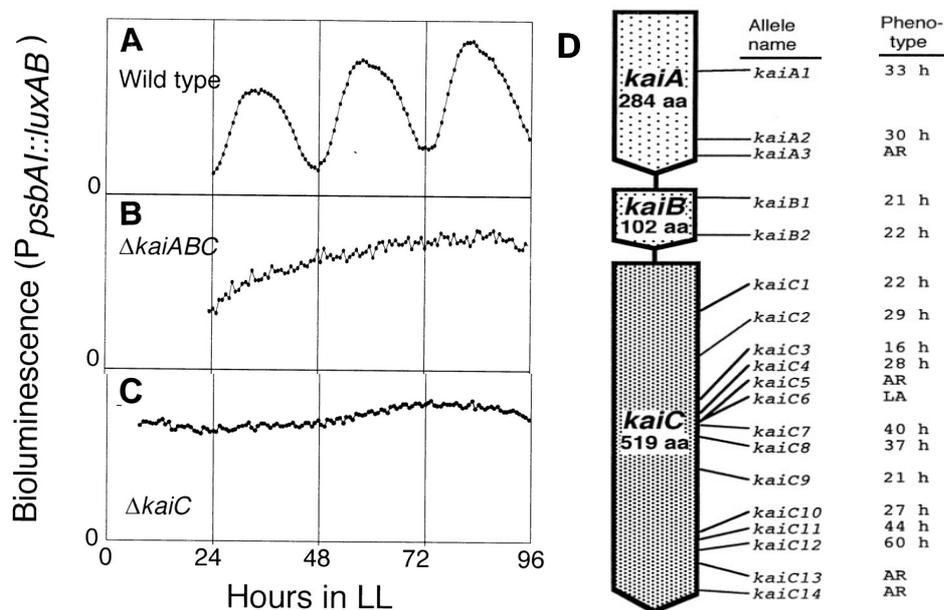


FIG. 1-6 Identification des gènes de l'horloge centrale. A-C) Bioluminescence émise par des souches sur une souche doté du rapporteur de la luciférase *P_{kaiBC}::luxAB*. A) Oscillations de bioluminescence de la souche non modifiée. B), C) La souche dépourvue des 3 gènes ($\Delta kaiABC$), devient arythmique, de même que les souches dans lesquelles l'un des 3 gènes est rendu inactif, ou est supprimé. D) Représentations des mutations sur le groupe de gènes *kaiABC* affectant la période du rythme circadien. La colonne *phénotype* indique les périodes d'oscillation, en heure, résultant des mutations. Certaines mutations causent l'annihilation de l'oscillation circadienne, on parle d'arythmie (AR), ou encore réduisent l'amplitude des oscillations (LA : low amplitude).

(D'après Ishiura M *et al.*, « Expression of a gene cluster cluster *kaiABC* as a circadian feedback process in cyanobacteria » *Science* 281:1519-1523).

1.2.6 Cœur de l'horloge : rôle de KaiC

La protéine KaiC est capable, en présence d'ATP, de se phosphoryler et de se déphosphoryler aussi bien *in vivo*, que *in vitro* [50-52]. Cependant, la forme phosphorylée est assez instable, et c'est la déphosphorylation qui l'emporte à terme. Des expériences *in vitro* montrent que la protéine KaiA augmente l'autophosphorylation de KaiC (ou inhibe sa déphosphorylation), tandis que KaiB s'oppose à l'action de KaiA.

In vivo, en lumière constante, la quantité de protéine KaiC totale, et la quantité de KaiC phosphorylées oscillent de manière circadienne. Comme les cyanobactéries sont des organismes photosynthétiques, alors l'essentiel de leur activité métabolique (dont la synthèse d'ARN et de protéines) est stoppée lorsqu'elles sont placées dans l'obscurité complète. Ainsi, *in vivo*, en DD, il n'y plus d'oscillation de la quantité de protéine. Par contre, le taux de KaiC phosphorylées (que l'on notera « KaiC-P ») et non phosphorylées (noté « KaiC-NP ») continue d'osciller avec une période circadienne, et les oscillations sont de plus compensées en température (FIG. 1-7a) [52].

Ceci implique donc que l'oscillateur circadien peut fonctionner indépendamment d'un processus de transcription-traduction, et que c'est ce cycle de phosphorylation/déphosphorylation de KaiC qui est le cœur de l'oscillateur circadien chez la cyanobactérie. La phosphorylation de KaiC apparaît comme un critère indispensable à l'existence de l'horloge circadienne [50]. Deux sites de d'autophosphorylation ont été repérés sur la protéine KaiC. La suppression de l'un de ces sites (ou des deux) entraîne une arythmie des souches mutantes. Par ailleurs, le complexe protéique entre les 3 protéines ne se forme pas chez ces mutantes. Le complexe protéique apparaît donc comme un élément clé indispensable à la régulation circadienne de l'expression génétique.

D'ailleurs, une étude récente a montré qu'il était possible de reconstituer ces oscillations circadiennes *in vitro*, simplement en présence de KaiA, KaiB, KaiC, et d'ATP [53]. Les oscillations obtenues ont bien une période proche de 24 h, et sont compensées en température (FIG. 1-7b-c). De plus, en utilisant des protéines KaiC provenant de mutants ayant des périodes égales à 17, 21, et 27 h, les quantités de KaiC phosphorylées et non phosphorylées oscillent bien avec les périodes correspondantes. Et les oscillations *in vitro* obtenues sont effectivement en accord avec celles observées *in vivo* avec les mêmes mutants. La construction de cet oscillateur *in vitro* a permis récemment de mieux comprendre les interactions qui ont lieu entre les 3 protéines clés de l'oscillateur circadien de la cyanobactérie. Grâce à une étude combinant notamment la microscopie électronique et la réalisation de gel d'électrophorèse, un modèle d'interaction circadienne entre ces 3 protéines a été proposé [54]. La protéine KaiC (présente sous forme d'hexamère), et les protéines KaiA et KaiB (qui sont des dimères) interagiraient *in vitro* selon le modèle présenté FIG. 1-8. La protéine KaiC non phosphorylée (état α), grâce à l'association et la dissociation rapide de KaiA se phosphoryle, et atteint ainsi

un état d'« hyper phosphorylation » (état β). KaiB se lie ensuite à cette protéine phosphorylée, ce qui induit un changement de conformation de KaiC (qui devient KaiC*, état χ). Cet hexamère se déphosphoryle (état δ), puis relaxe jusqu'à l'état initial α . En réalité, les différents complexes coexistent; simplement, les proportions varient en fonction de la phase de l'oscillation circadienne.

De nombreux modèles théoriques d'interaction entre les 3 protéines ont été proposés, en s'appuyant sur les observations expérimentales faites sur l'oscillateur *in vitro* et *in vivo* [55, 56]. Ces approches décrivent la dynamique des boucles de rétroaction potentielles dictant la formation des différents complexes. Elles permettent d'optimiser les constantes de réaction afin de générer des oscillations circadiennes stables et robustes à une multiplication par 5 (par rapport aux concentrations naturelles *in vivo*) des quantités des différentes protéines Kai, comme c'est le cas pour l'oscillateur KaiABC *in vitro*. Les approches théoriques montrent de plus la sensibilité de la stabilité au nombre de protéines en interaction : une diminution par un facteur 10 des concentrations en protéines rendent le système incapable de générer des oscillations circadiennes stables [56].

Ainsi, il semble que l'obtention d'oscillations de hautes amplitudes soit notamment liée au fait que les hexamères de KaiC doivent avoir un taux de phosphorylation synchrone. Cette synchronisation peut être assurée par l'échange de monomères entre les différents complexes [54], ou être liée au fait que KaiA présente une grande affinité pour les complexes KaiBC non phosphorylés [56]. De plus, un modèle récent permet d'étudier la mise à zéro de la phase de l'oscillateur induite par une impulsion de température observée *in vitro*. En réalisant une analyse aux petites perturbations de la dynamique théorique du système, il est possible de mieux cerner les facteurs contrôlant la remise à zéro de l'oscillateur [54].

L'oscillateur *in vitro* KaiABC constitue donc un excellent modèle de l'horloge des cyanobactéries en DD. Cependant, lorsque les cellules sont en lumière constante, ou en cycle lumière/obscurité, il y a des rythmes de transcription et de traduction gouvernés par l'oscillateur KaiABC. De plus, en LL ou LD, les quantités de KaiB et KaiC varient *in vivo* et ces changements sont susceptibles de modifier fondamentalement l'horloge. En effet, pour de faibles concentrations de KaiB et KaiC *in vitro*, l'oscillateur KaiABC n'est plus le siège d'oscillations circadiennes. Il s'agit de savoir comment l'oscillateur *in vivo*, s'organise pour gérer les variations moléculaires (transcription, traduction, dégradation de protéines), et si une boucle de rétroaction de transcription/traduction est nécessaire dans ces conditions.

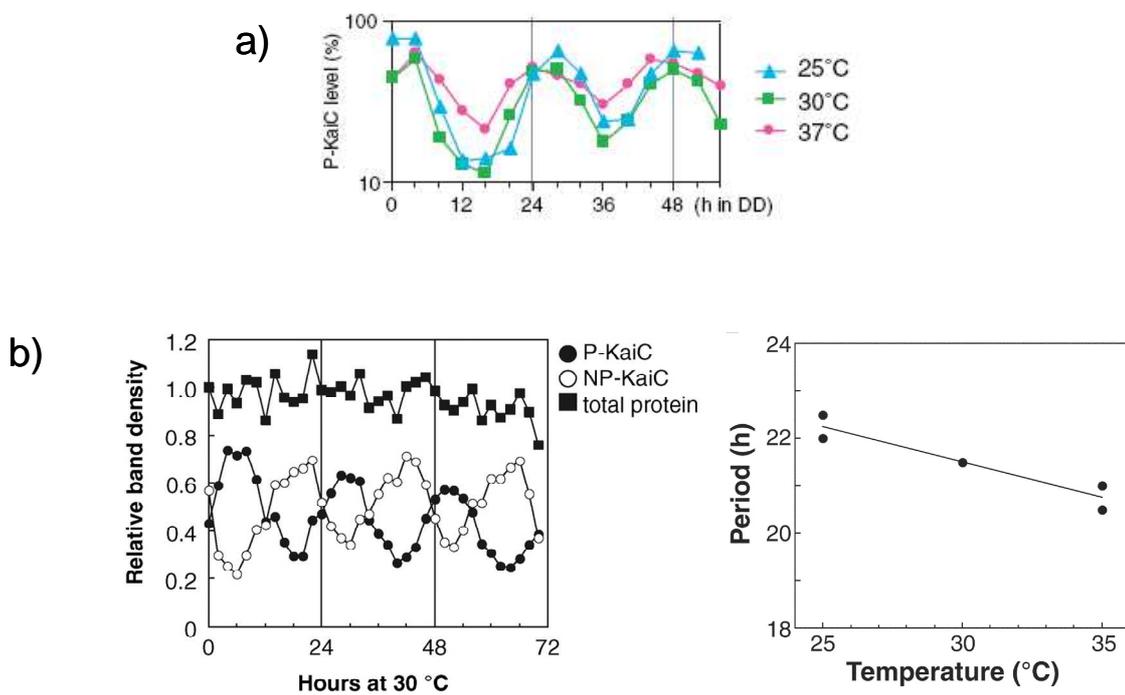


FIG. 1-7 Oscillations circadiennes de phosphorylation de KaiC

a) Oscillations *in vivo* de la concentration relative de kaiC-P : les oscillations sont compensées en température.

(D'après Tomita J *et al.*, «No Transcription-Translation Feedback in Circadian Rhythm of KaiC Phosphorylation », **Science** 307:251-254).

b) Reconstitution de l'oscillation circadienne de phosphorylation de KaiC *in vitro*. (gauche) Oscillations de KaiC-P, et KaiC non phosphorylé, obtenues par l'incubation de KaiA, KaiB, KaiC, et d'ATP. (droite) Période des oscillations mesurées à différentes températures : les oscillations *in vitro* sont compensées en température.

(D'après Nakajima M *et al.*, « Reconstitution of circadian oscillation in cyanobacterial KaiC phosphorylation in vitro », **Science** 308:414-415).

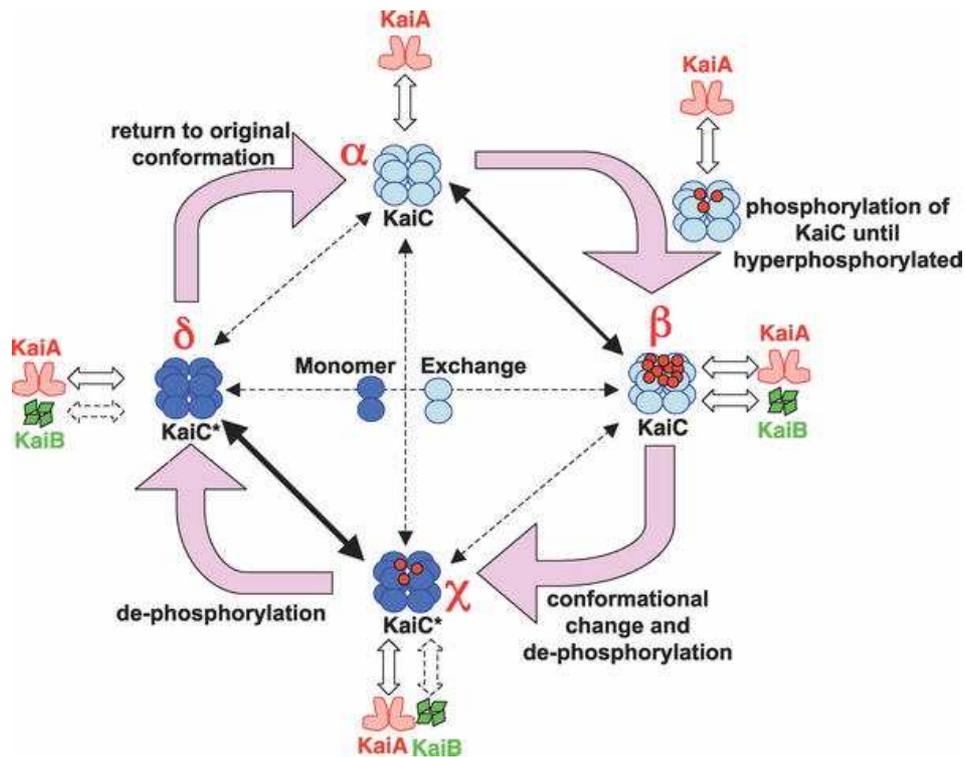


FIG. 1-8 Modèle d'interaction entre les protéines de l'oscillateur central KaiABC. La protéine KaiC, sous forme d'hexamère (état α), se phosphoryle en présence de KaiA, jusqu'à ce que la phosphorylation soit suffisante pour que le complexe interagisse avec KaiB (état β). L'interaction est supposée engendrer un changement conformationnel de KaiC (état χ), qui se déphosphoryle ensuite (état δ) avant de revenir à son état initial. Il est possible que des monomères soient échangés entre les différents complexes. Les probabilités d'échange sont symbolisées par les flèches (épaisses : forte probabilité, fines : moyenne probabilité, pointillés : faible probabilité). (D'après Mori T et *al.*, « Elucidating the ticking of an in vitro circadian clockwork », *Plos Biology* 5(4): e93)

1.3 Bruit stochastique

1.3.1 Introduction

Au sein d'une cellule, les protéines sont susceptibles d'interagir entre elles, d'activer ou de réprimer la transcription d'autres gènes, d'interagir avec des ARNm... L'ensemble de ces interactions est décrit par un réseau génétique (FIG. 1-9).

Le bruit stochastique engendre la majeure partie de la variabilité de cellule à cellule observée au sein de populations isogéniques. Les fluctuations observées viennent du fait que les cellules possèdent un petit nombre de certaines molécules régulatrices, ou d'ADN. Par conséquent, l'expression génétique est constituée d'une succession d'événements probabilistes. Une étude expérimentale [1] montre que l'amplitude des fluctuations dépend des taux de transcription, de la dynamique de régulation, et des gènes impliqués. Ainsi, le bruit (défini comme le rapport de la déviation standard sur la moyenne) peut varier de 5 à 25% pour un processus de transcription/traduction stationnaire. Et surtout, cette étude montre qu'un petit nombre de molécules peut foncièrement limiter la précision de la régulation génétique. Ce bruit sur la régulation génétique peut fondamentalement modifier l'environnement intracellulaire, et donc les phénotypes associés aux génomes [57].

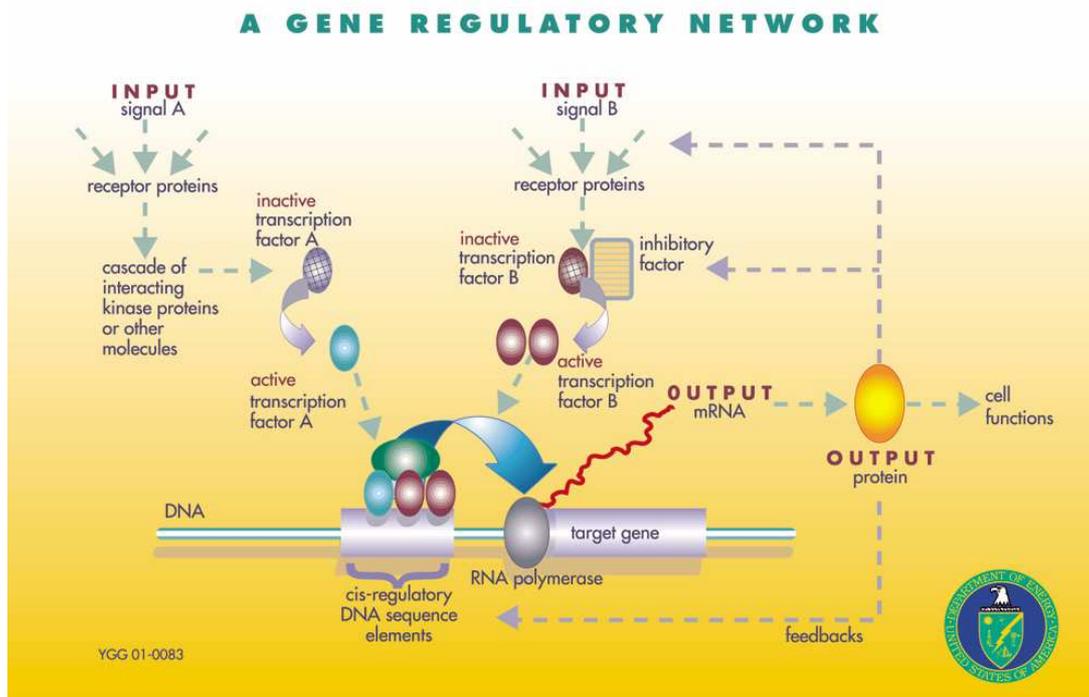


FIG. 1-9 Exemple schématique d'un réseau de régulation génétique.

(D'après http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome)

1.3.2 Exemples de modélisation d'oscillateurs

Qu'en est-il pour les cellules dont la régulation génétique est sous contrôle circadien ? Du fait de la complexité des mécanismes de régulation générant les rythmes circadiens, la modélisation s'avère indispensable, afin de pouvoir prédire et mieux comprendre la dynamique interne des oscillateurs.

Une première approche consiste à créer un oscillateur artificiel, implémenté ensuite dans une cellule, afin de comprendre les limites de fonctionnement d'un oscillateur biologique. Pour l'étude présentée ci-dessous, l'oscillateur artificiel est créé à partir d'une séquence d'ADN, introduite dans la bactérie *Escherichia coli* [58]. La séquence d'ADN est composée notamment de 3 gènes : *LacI*, *tetR*, et *cI*. Les protéines correspondantes forment une boucle de rétroaction de par leur action inhibitrice : LacI inhibe la transcription de *tetR*, qui à son tour inhibe *cI* (FIG. 1-10a). Un rapporteur d'une protéine fluorescente (proche de la GFP) est introduit dans un plasmide en aval du promoteur du gène *LacI*, permettant ainsi de suivre les oscillations générées par le réseau génétique implanté dans les cellules.

Des équations différentielles déterministes décrivant la dynamique du système montrent que pour certaines valeurs de paramètres, les quantités de protéines oscillent au cours du temps, avec une période et une amplitude parfaitement définies (FIG. 1-10b). Si maintenant ce système est simulé en tenant compte des effets stochastiques engendrés par la nature probabiliste de l'expression génétique, les oscillations des quantités de protéines ont des périodes et des amplitudes qui fluctuent.

Expérimentalement, on observe (FIG. 1-10d) que les bactéries individuelles émettent des oscillations temporelles de fluorescence. La période d'oscillation, de l'ordre de quelques heures, est plus grande que le temps de division des cellules. On constate néanmoins que l'amplitude et la période des oscillations individuelles varient dans le temps. De plus, deux cellules issues d'une division cellulaire oscillent avec des périodes et des phases qui diffèrent rapidement. Cette variabilité de l'oscillation de cellules ayant *a priori* un matériel génétique similaire est liée aux fluctuations stochastiques auxquelles l'oscillateur est soumis [1].

Il existe plusieurs approches théoriques de modélisation des rythmes circadiens s'appuyant sur les mécanismes de contrôle observés expérimentalement. Ces modèles utilisent des équations différentielles pour décrire l'évolution temporelle des concentrations en ARNm, et en protéines de l'horloge circadienne, et peuvent générer des oscillations circadiennes. Nous présentons ici les résultats d'un modèle simple [59] décrivant l'auto-repression du gène *per* chez la drosophile, en présence de bruit stochastique.

L'algorithme utilisé (méthode de Gillespie) décompose les réactions en pas élémentaires, et à chaque pas, l'occurrence d'une réaction est fonction de la probabilité que lui attribue l'algorithme. La probabilité est notamment liée à la quantité de molécules réactives présentes. Pour une quantité de protéine et d'ARNm suffisant (FIG. 1-11A-B), on obtient des

oscillations circadiennes stables, l'amplitude et la période fluctuent faiblement dans le temps. Les histogrammes des périodes des oscillations montrent que la valeur moyenne reste en accord avec une période propre circadienne. Mais lorsque le nombre de molécules devient trop petit (FIG. 1-11C), les fluctuations d'amplitude et de période deviennent importantes : les oscillations circadiennes ne sont pas robustes.

Cependant, d'autres modèles générant des oscillations circadiennes de quantité de molécules montrent que le bruit stochastique n'a pas nécessairement des conséquences « destructrices » sur ces oscillations. En effet, un modèle simplifié faisant abstraction des oscillations des quantités d'ARNm montre qu'il est possible de générer des oscillations circadiennes uniquement avec un répresseur et un complexe [60]. Cette étude montre que dans ce cas, pour certaines valeurs de paramètres, le modèle déterministe prévoit que le système converge vers un point fixe, alors que la présence de fluctuations fait basculer l'état du système et engendre des oscillations. Selon les équations régissant la (les) boucle(s) de rétroaction, la présence de bruit n'a donc pas systématiquement les conséquences nuisibles aux oscillations que l'on aurait pu prévoir [61].

L'existence d'une horloge circadienne persistante chez un organisme vivant nécessite donc que l'oscillateur soit résistant au bruit stochastique, ou le détourne à son avantage, pour stabiliser les oscillations.

1.3.3 L'oscillateur circadien à l'échelle d'une cellule individuelle

Chez la souris, les fibroblastes individuels possèdent un oscillateur circadien autonome. A l'aide d'un rapporteur, des cellules clonales sont rendues fluorescentes, permettant ainsi de suivre les oscillations circadiennes de cellules individuelles [62]. Les périodes et amplitudes diffèrent beaucoup d'un oscillateur à l'autre. La cohérence diminue avec le temps, impliquant que le signal moyen émis par la population est de plus en plus amorti (FIG. 1-12a). On peut également citer l'exemple de l'oscillateur circadien chez le poisson *Zebra fish* [63]. Des cellules clonales munies d'un rapporteur de la luciférase montrent des oscillations de bioluminescence de période et de phases fortement variables d'une cellule à l'autre, et dans le temps. Grâce à une impulsion lumineuse, il est possible de synchroniser les oscillations individuelles, mais la cohérence est rapidement perdue du fait du bruit stochastique, et le signal moyen émis par la population a une amplitude qui décroît (FIG. 1-12b).

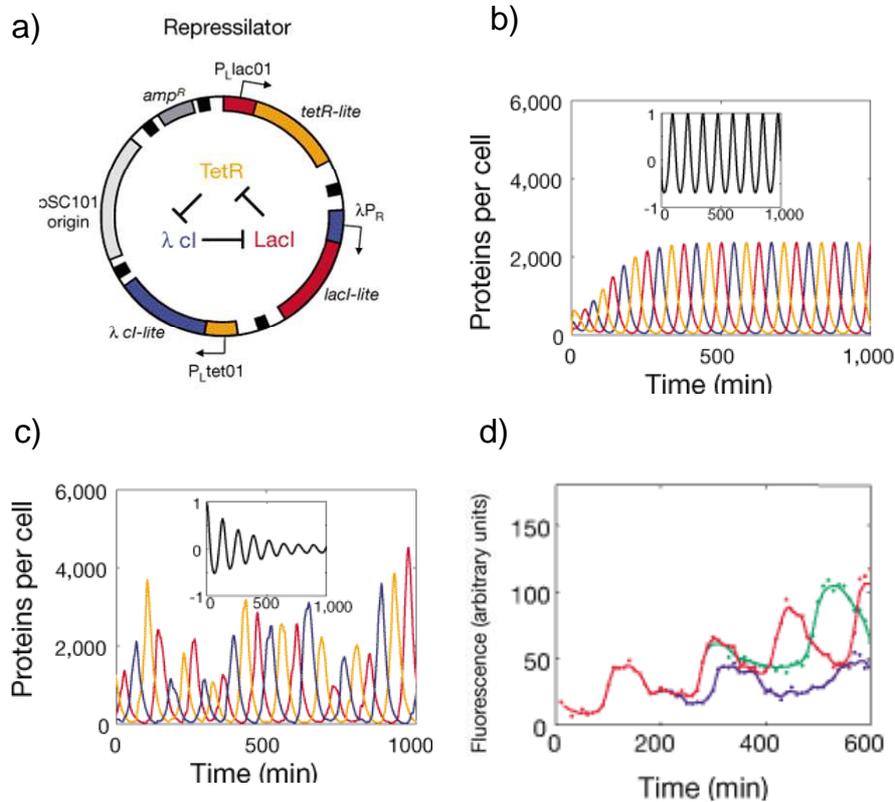


FIG. 1-10 Oscillateur synthétique : calcul numérique et réalisation expérimentale. **a)** Le réseau génétique du « repressilator » est constitué de 3 inhibiteurs transcriptionnels, et des promoteurs correspondants. **b)** Intégrations numériques des équations décrivant la dynamique déterministe du « repressilator ». Pour certaines valeurs de paramètres, les quantités des 3 protéines oscillent avec une amplitude, une période et une phase parfaitement définies. **c)** En présence de bruit stochastique, les oscillations obtenues numériquement sont fluctuantes. Les inserts montrent la fonction d'autocorrélation normalisée pour la protéine LacI. Le code de couleur est le même que pour **(a)**. **d)** Un rapporteur d'une protéine fluorescente (proche de la GFP) placée derrière le promoteur du gène *TetR* permet de traduire la concentration en protéine TetR. La figure montre les oscillations de fluorescence d'une cellule (en rouge), et de sa descendance. Les cellules filles oscillent en retard sur la cellule mère.

(D'après Elowitz MB, Leibler S, « A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators », *Nature* **2000**, **403**(6767):335-338)

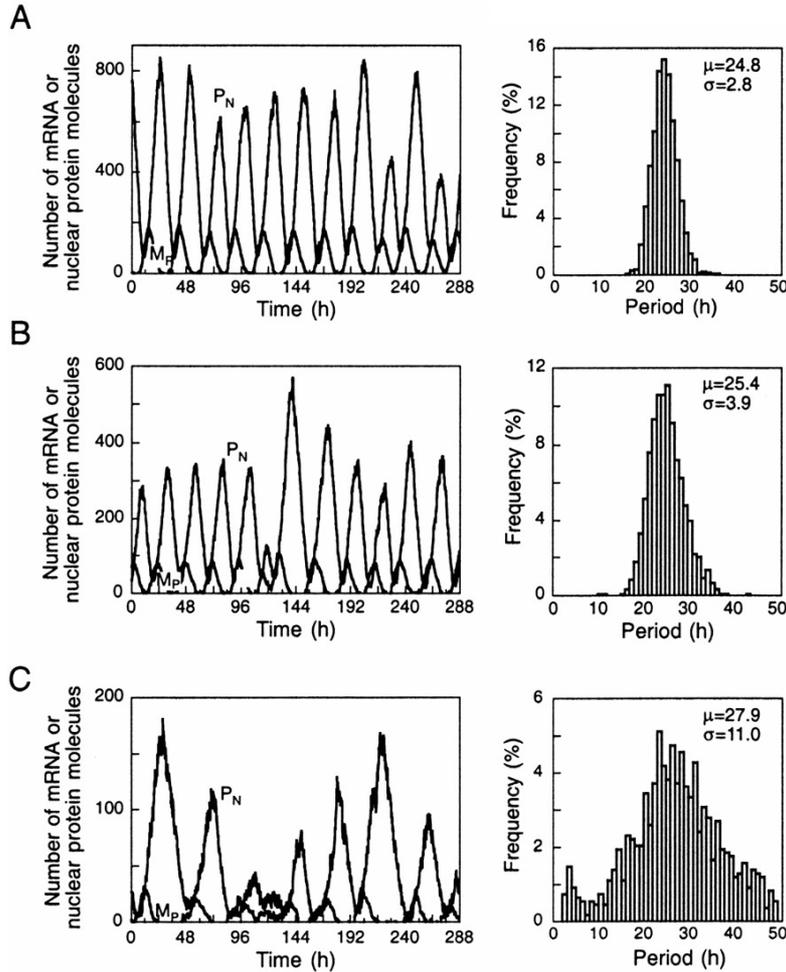


FIG. 1-11 Effet du nombre de molécules sur la robustesse des oscillations circadiennes. Oscillations de la quantité d' $ARNm$ (P_N) et de protéines présentes dans le noyau (M_P) ; et histogramme des périodes des oscillations obtenues en simulant la dynamique du système en présence de bruit stochastique, (nombre fini d'éléments interagissant). **A), B)** Pour un nombre de molécules d' $ARNm$ variant de 0 à 200 (A), ou de 0 à 120 (B), et un nombre de protéines nucléaires variant de 20 à 800 (A), et de 10 à 600 (B), les oscillations obtenues restent stables, même si les fréquences et les amplitudes fluctuent dans le temps. La valeur moyenne de la période reste proche de celle d'un oscillateurs circadien. **C)** Pour un nombre de molécules d' $ARNm$ variant de 0 à 30, et une quantité de protéines nucléaires variant de 5 à 160, les fluctuations des oscillations sont plus importantes. La distribution des périodes est plus large, et la valeur moyenne s'éloigne de la période circadienne.

(D'après Gonze D *et al.* «Robustness of circadian rhythms with respect to molecular noise» *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99(2):673-678)

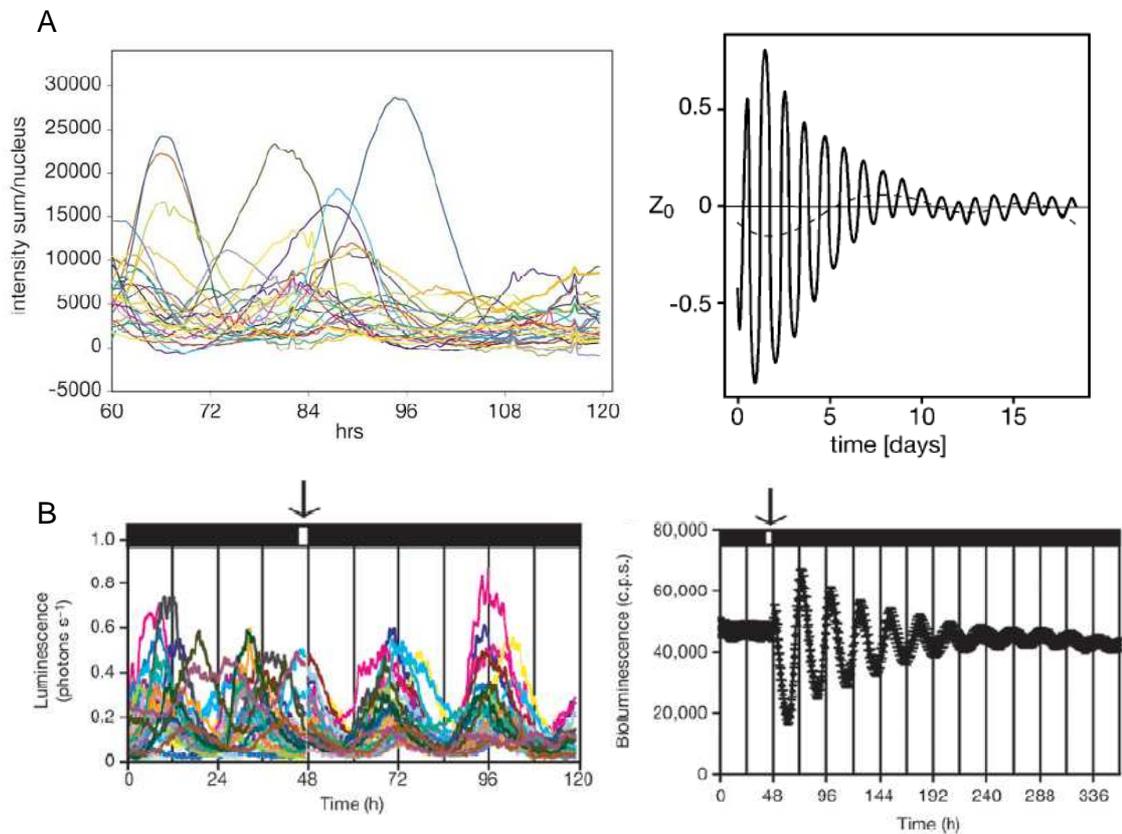


FIG. 1-12 Oscillations circadiennes de cellules clonales de tissus d'organismes pluricellulaires. A) (gauche) Oscillations chez les fibroblastes individuels de souris. Les amplitudes et les périodes varient dans le temps et d'une cellule à l'autre. (droite), ce qui engendre une perte de cohérence de l'oscillation moyenne de la population (droite).

(D'après Nagoshi E *et al.*, « Circadian gene expression in individual fibroblasts: cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells », *Cell* 119:693-705).

B) (gauche) Oscillations de cellules de *Zebra fish*. Les cellules peuvent être synchronisées par une impulsion de lumière (flèches noires), mais perdent rapidement cette cohérence (droite).

(D'après Carr AJ, Whitmore D, « Imaging of single light-responsive clock cells reveals fluctuating free-running periods », *Nat Cell Biol* Mar;7(3):319-321).

1.4 Oscillateur circadien chez la cyanobactérie individuelle

En ce qui concerne l'horloge circadienne des cyanobactéries, il a été montré que l'oscillateur existe aussi au sein de chaque bactérie [10] et que l'horloge biologique est remarquablement stable. La cohérence temporelle entre les oscillateurs individuels est particulièrement importante, comparée aux cellules individuelles d'organismes pluricellulaires. Ce résultat est obtenu en utilisant un système de détection permettant de suivre les oscillations de bioluminescence de cellules individuelles dotées du rapporteur de la luciférase *PpsbAI::luxAB*. Chaque cellule émet des oscillations circadiennes dont l'amplitude fluctue temporellement, ainsi que d'une cellule à l'autre. La période est par contre bien définie. La variabilité des fréquences des bactéries observées dans l'expérience est inférieure à 0.5% (rapport déviation standard/moyenne). Les cellules issues d'une même colonie oscillent en synchronie. Afin de quantifier la stabilité de l'oscillateur au fur et à mesure des divisions cellulaires, l'oscillation de bioluminescence a été approchée par un simple signal sinusoïdal :

$$y_i = A_i(t) \left[c + \cos(\omega_0 t + \varphi_i) \right] \quad \{1.4.1\}$$

La pulsation propre ω_0 et le paramètre c sont supposés être des paramètres constants, tandis que $A_i(t)$ est considéré comme une variable aléatoire gaussienne de valeur moyenne A , et de variance σ_A^2 . Comme les fluctuations stochastiques engendrent une diffusion des phases individuelles, les φ_i sont supposées décrire un processus de Wiener, similaire à un processus de marche aléatoire à une dimension. La valeur moyenne φ_0 est donc constante, et la variance croît linéairement avec le temps : $\sigma_\varphi^2 = Dt$, avec D la constante de diffusion de phase. Grâce à la comparaison de la variance du signal théorique {1.4.1}, avec la variance expérimentale des oscillations émises par les cellules, ces travaux ont permis d'estimer le bruit sur l'amplitude, défini comme le rapport de la déviation standard sur la valeur moyenne : $\sigma_A/A = 0.25 \pm 0.01$, ainsi que la constante de diffusion de phase : $D = 5 \cdot 10^{-4} \pm 3 \cdot 10^{-4}$ rad/h = $1.2 \cdot 10^{-2} \pm 7.2 \cdot 10^{-3}$ rad/jour. Le bruit observé sur les oscillations est notamment dû aux fluctuations stochastiques des différents composants moléculaires internes aux cellules. Malgré ces fluctuations, cette étude révèle donc l'étonnante robustesse de l'horloge biologique chez les cyanobactéries – comparée à certains organismes pluricellulaires –, caractérisée par un temps de corrélation $\tau = 2/D = 166 \pm 100$ jours.

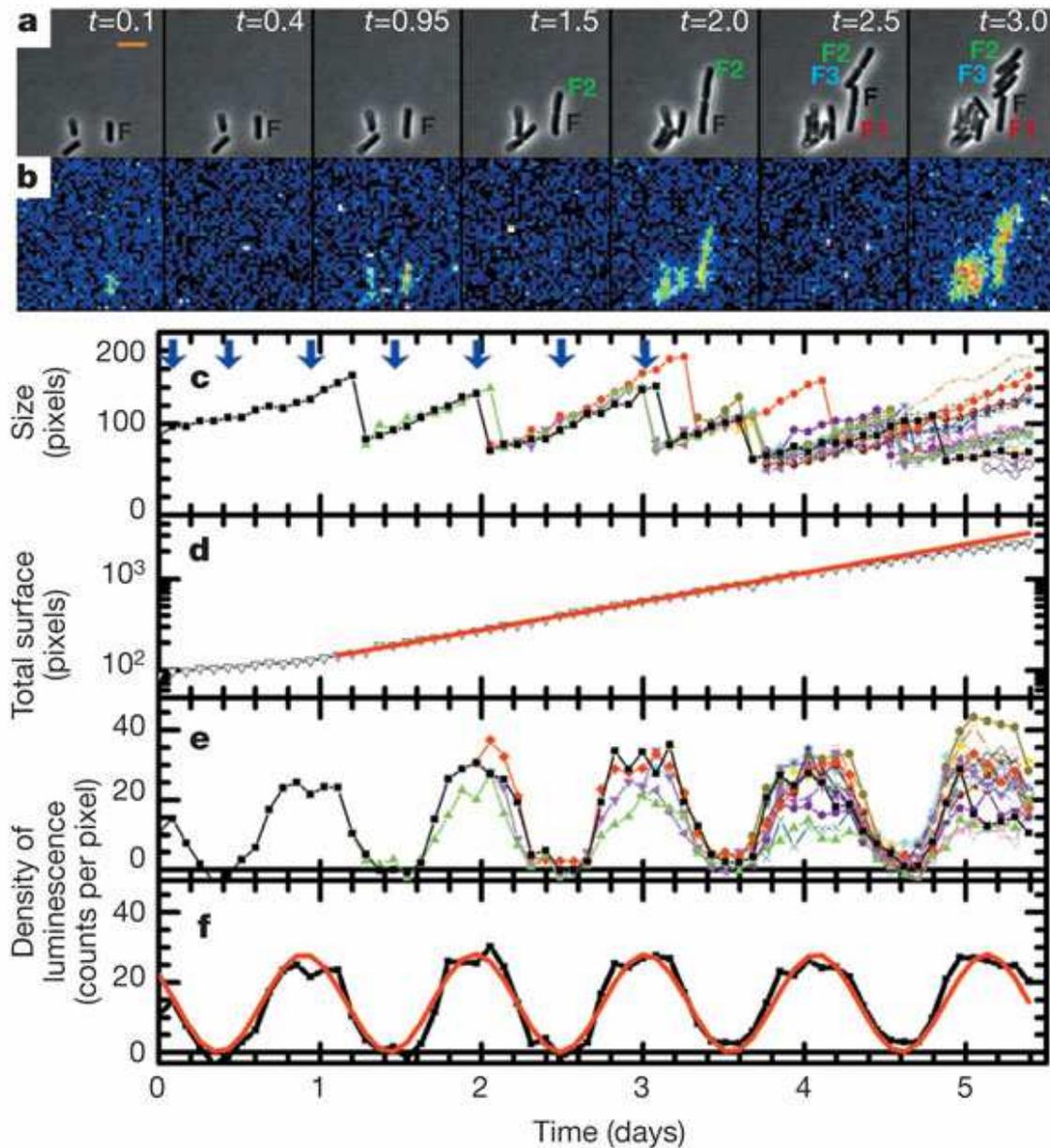


FIG. 1-13 L'oscillateur circadien chez la cyanobactérie individuelle. **a)** images en contraste de phases d'une bactérie F et de sa descendance, prises à différents instants (t en jours), et **b)** images de bioluminescence correspondantes. **c)** Taille de la cellule F et de sa descendance **d)** taille de la colonie correspondante : la colonie croît exponentiellement. **e)** Oscillations de bioluminescence des cellules précédentes. **f)** oscillation moyenne de bioluminescence de la colonie (en noir), ajustée numériquement par une fonction sinusoïdale : $\langle d(t) \rangle = B + A \cos(2\pi/T_0 \cdot t + \varphi_0)$, ce qui donne une période $T_0 = 25.4 \pm 0.12$.

(D'après Mihalcescu I *et al.*, «Resilient circadian oscillator revealed in individual cyanobacteria», *Nature* 430:81-85)

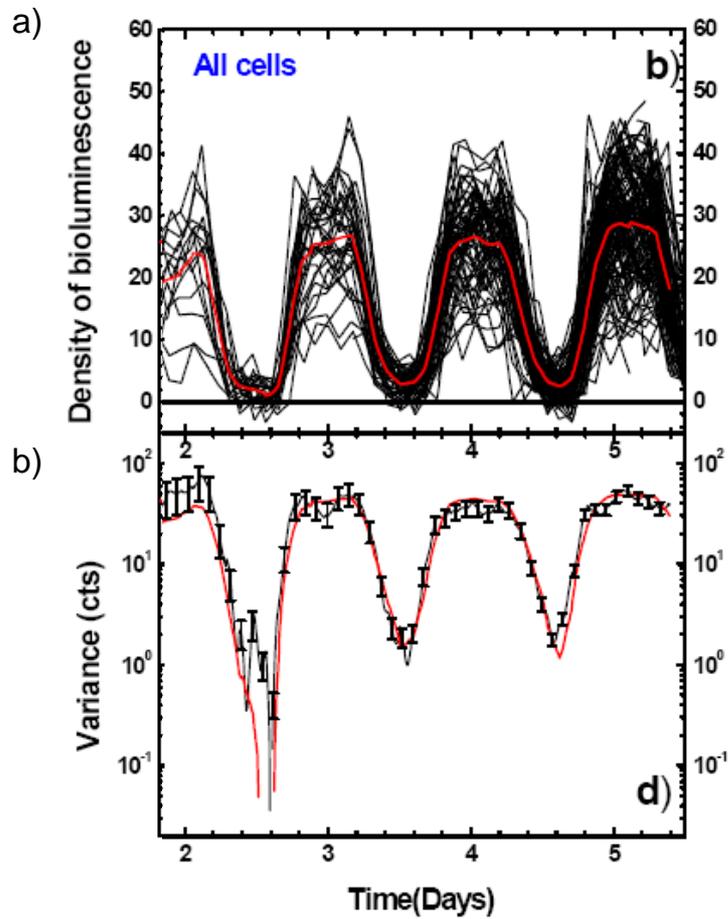


FIG. 1-14 Diffusion de phase. a) Oscillations de bioluminescence des cellules de toutes les colonies (en noir). Pour chacune, l'oscillation a été décalée en temps en fonction de la valeur de la phase moyenne d'oscillation de la colonie correspondante, de manière à avoir la même phase que la colonie F. La courbe rouge représente l'oscillation moyenne calculée sur l'ensemble des cellules. **b)** Variance expérimentale (en noir), ajustée numériquement par l'expression de la variance théorique (en rouge). Le bruit expérimentale sur l'amplitude est ainsi estimée à $\sigma_A/A = 0.25 \pm 0.01$, et la diffusion de phase à $D = 5 \cdot 10^{-4} \pm 3 \cdot 10^{-4} \text{ h}^{-1}$.

(D'après Mihalcescu I *et al.*, «Resilient circadian oscillator revealed in individual cyanobacteria», **Nature** 430:81-85, Supplementary Information)

1.5 Origine de la stabilité

1.5.1 Couplage entre oscillateurs

Dans certains cas, l'existence d'un rythme stable à l'échelle de l'organisme peut suggérer que la précision temporelle est atteinte grâce au couplage intercellulaire entre les oscillateurs.

C'est ce que montre une étude à la fois théorique et expérimentale réalisée sur une population d'oscillateurs chimiques [64]. Expérimentalement, le système est constitué d'électrodes de nickel dans un bain d'acide sulfurique. Le courant est mesuré pour chaque électrode pour une différence de potentielle appliquée constante. Pour certaines valeurs de tension appliquée, ou de concentration d'acide sulfurique, il apparaît des oscillations périodiques (de période $\sim 1-2$ sec). En l'absence de couplage, d'une électrode à l'autre, les périodes diffèrent peu, mais les phases sont très dispersées. A l'inverse, en présence de couplage, une synchronisation partielle des phases d'oscillation a lieu pour une intensité de couplage supérieure à une valeur critique. Ces observations expérimentales concordent avec le modèle théorique de couplage établi par Kuramoto (cf. 2.6).

De même, chez les mammifères, l'émergence d'un signal cohérent est rendue possible grâce à un couplage entre oscillateurs individuels, ce qui contrecarre les effets désordonnant des fluctuations stochastiques. Ainsi, concernant les mammifères, les neurones individuels déconnectés du SCN émettent des oscillations de périodes variables, alors que lorsqu'ils sont dans le SCN, ils se synchronisent [62, 65].

Les oscillations glycolytiques chez la levure (période ~ 30 s) donnent aussi un exemple de couplage intercellulaire [66]. Deux populations de levures oscillant en opposition de phase sont mélangées dans les mêmes proportions, et après quelques cycles, un rythme commun est instauré, et des oscillations apparaissent.

1.5.2 Cas très particulier de la cyanobactérie

Afin de voir si un mécanisme similaire de synchronisation existe chez les cyanobactéries, les travaux présentés se sont intéressés aux phases d'oscillations de deux colonies croissant à proximité l'une de l'autre, mais ayant des phases d'oscillations différentes.

Pour deux colonies adjacentes ayant des phases d'oscillations suffisamment grandes pour être détectées, il apparaît que chaque lignée cellulaire conserve sa phase originelle d'oscillation, même après plusieurs cycles de divisions cellulaires, indépendamment des phases des colonies adjacentes (FIG. 1-15).

En première approximation, ce n'est donc pas un couplage fort qui serait l'origine de la stabilité de l'oscillateur circadien chez la cyanobactérie.

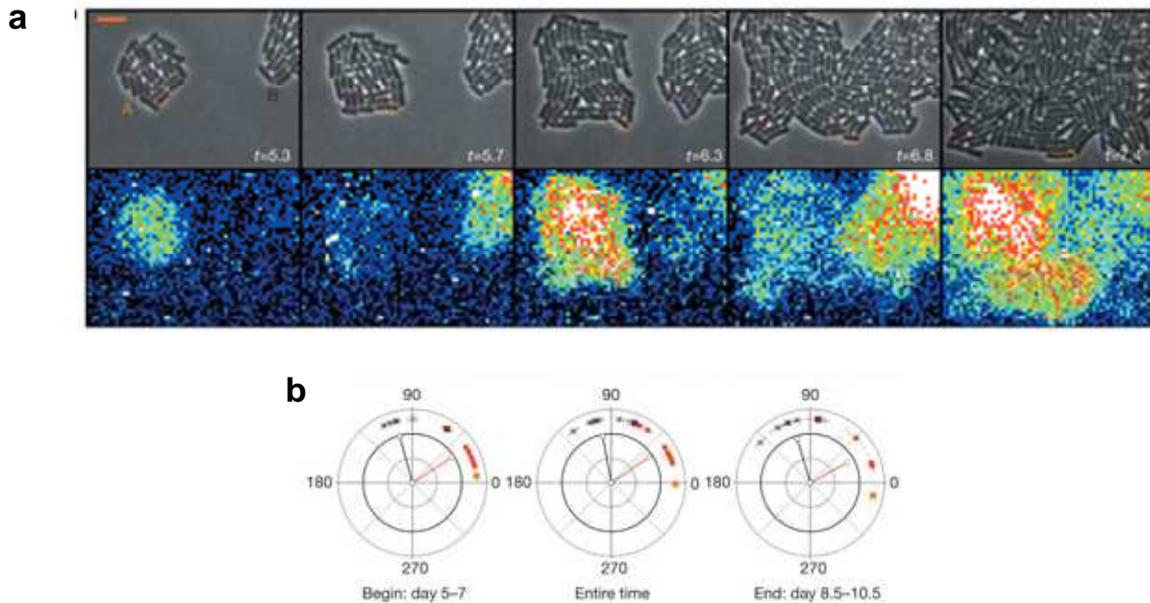


FIG. 1-15 Colonies adjacentes de phases d'oscillations différentes. a) Images en contraste de phases (haut) et de bioluminescence correspondantes (bas). Les cellules de colonies A et B se rejoignent au fur et à mesure de leur croissance. **b)** Phases des oscillateurs de la colonie A (rouge) et (bleu) à différents intervalles de temps. Les vecteurs centraux représentent la cohérence au sein des colonies, leur orientation est donnée par la phase moyenne. Au fur et à mesure du temps, les phases individuelles se dispersent. Cependant, les phases moyennes des colonies A et B ne semblent pas être influencées l'une par l'autre. (D'après Mihalcescu I *et al.*, «Resilient circadian oscillator revealed in individual cyanobacteria», **Nature** 430:81-85.)

1.6 La question qui se pose

Les résultats récents, obtenus grâce à la réalisation *in vitro* de l'oscillateur KaiABC, ainsi que des modélisations théoriques de cet oscillateur permettent de mieux comprendre les interactions potentielles entre ces 3 protéines clés [54, 56]. Cependant, les origines de la stabilité *in vivo* ne sont pas encore connues. L'oscillation circadienne de la phosphorylation de KaiC, parallèlement avec la formation du périodosome semble être à la base des oscillations circadiennes de l'ensemble du génome. Dans chaque cellule, on compte plusieurs milliers de protéines KaiC et KaiB par cellules, et seulement 250-500 pour KaiA. La formation du

périodosome nécessite 1 ou 2 dimère KaiA, ce qui implique qu'il y a en moyenne 60-250 périodosomes actifs par cellule [67]. Cette faible quantité de complexes est *a priori* susceptible d'engendrer des fluctuations stochastiques de son activité [1, 59].

Pourtant un organisme aussi simple qu'une bactérie semble posséder des propriétés de résistance au bruit stochastique fondamentalement différentes de celles observées chez les eucaryotes :

Malgré les divisions cellulaires (jusqu'à 4 fois par 24 h [29]), la phase de l'oscillation circadienne est conservée pour des cellules d'une même lignée. Ceci est d'autant plus surprenant que les quantités d'ARNm et de protéines jouant un rôle dans la formation du périodosome sont susceptibles de fluctuer d'une cellule à l'autre, vu le nombre de copies limitées.

Par comparaison avec ce qui est observé *in vivo* pour des oscillateurs naturels ou synthétiques, nous pouvons émettre deux hypothèses expliquant les origines d'une telle robustesse :

- Il peut s'agir d'une propriété intrinsèque de l'oscillateur : il est en effet possible que les mécanismes moléculaires générant les oscillations circadiennes soient telles qu'ils soient résistants aux fluctuations stochastiques. C'est le cas d'un oscillateur synthétique implémenté dans la bactérie *Escherichia coli* [68]. Les boucles et les interactions entre les protéines de cet oscillateur sont telles que pour certaines valeurs de paramètres, on observe à l'échelle d'une des oscillations du nombre d'une protéine donnée. L'originalité de cet oscillateur, par rapport à celui que nous avons vu auparavant (1.3.2) réside dans le fait que les oscillations sont résistantes aux divisions cellulaires. En effet, en dépit d'un temps de divisions 10 fois plus petit que la période, 3 cycles d'oscillations sont observés avant que les fluctuations stochastiques n'atténuent notablement l'amplitude du signal. Le mécanisme de cet oscillateur est tel qu'il permet de suivre les oscillations circadiennes sur une trentaine de générations. Par comparaison, avec les cyanobactéries, il est possible de suivre les oscillations sur une quarantaine de jours, soient environ 40 générations (cf. 4.2). L'oscillateur synthétique offre une preuve de la robustesse potentielle aux fluctuations stochastiques qui résultent des interactions moléculaires au sein du système.

- La deuxième hypothèse pouvant expliquer la robustesse constatée, est celle du couplage entre oscillateurs, que nous avons déjà évoqué pour les cellules des SCN par exemple. L'hypothèse d'une interaction forte est *a priori* exclue pour expliquer la stabilité observée, mais il est possible qu'une telle robustesse puisse provenir d'un couplage faible entre oscillateurs, renforcé par l'existence du bruit extracellulaire. L'existence d'une interaction, même faible pourrait contrebalancer la dispersion des phases des oscillateurs individuelles.

Le mécanisme de l'interaction pourrait être similaire à celui observé chez la levure : les levures interagissent via un réservoir commun de métabolites extracellulaires, et synchronisent ainsi leurs oscillations glycolytiques. Un mécanisme similaire a été proposé pour les oscillations circadiennes de bioluminescence de *Gonyaulax polyedra* [8]. Deux cultures initialement en opposition de phase sont mélangées, et les oscillations étudiées pendant une quinzaine de jours.

Il apparaît que ce mélange développe un comportement temporel qui diffère progressivement d'une simple somme arithmétique de leurs oscillations circadiennes. Ceci peut être interprété comme un type de communication, orchestré via le milieu cellulaire.

C'est dans cette direction que se sont orientés nos travaux : nous investiguons l'existence d'un couplage entre oscillateurs cyanobactériens, et tentons de voir si la stabilité de l'oscillateur circadien est une propriété intrinsèque aux bactéries, ou si une interaction faible entre oscillateurs participe à renforcer la robustesse des oscillations.

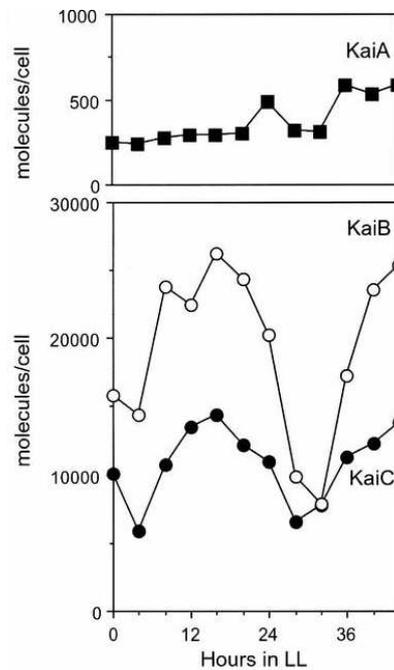


FIG. 1-16 Evolution temporelle des nombres de molécules par cellules en protéines KaiA, kaiB, KaiC dans une cyanobactérie. Le nombre de protéines KaiA n'oscille pas. Alors que les nombres de protéines KaiB et KaiC oscillent avec une période proche de 24 h.

(D'après Kitayama Y *et al.*, « KaiB functions as an attenuator of KaiC phosphorylation in the cyanobacterial circadian clock system », **EMBO J.** 22(9):2127-2134).

Chapitre 2

Synchronisation d'oscillateurs

Avant de décrire l'oscillateur circadien chez la cyanobactérie, nous allons faire une brève introduction générale sur les oscillateurs en s'appuyant sur des exemples. Puis nous présenterons la dynamique d'oscillateurs soumis à des fluctuations stochastiques. Nous expliciterons notamment les effets de ces fluctuations sur l'oscillateur cyanobactérien. Nous développerons au travers d'un modèle théorique et de quelques exemples, le cas des oscillateurs forcés. Enfin, nous introduirons la dynamique d'une population d'oscillateurs mutuellement couplés.

2.1 Les oscillateurs linéaires

Un oscillateur désigne dans le sens le plus général du terme un système montrant des variations périodiques dans le temps.

On parle d'oscillateurs linéaires lorsque la dynamique du système est gouvernée par un système d'équations différentielles linéaires. Pour introduire des notions telles que le portrait de phase et le cycle limite, nous allons étudier brièvement l'exemple d'une masse m oscillant à l'extrémité d'un ressort de raideur k (FIG. 2-1a). La position de la masse est gouvernée par l'équation :

$$m\ddot{x} + kx = 0 \tag{2.1.1}$$

L'état de la masse peut être caractérisé par son écart à la position d'équilibre x , et sa vitesse $v = \dot{x}$. L'équation précédente peut alors s'écrire sous forme d'un système linéaire :

$$\begin{aligned} \dot{x} &= v \\ \dot{v} &= -\omega_0^2 x \end{aligned} \tag{2.1.2}$$

Avec $\omega_0^2 = k/m$.

La solution de ce système est connue, et on obtient une variation sinusoidale de x :

$$x(t) = A \cos(\omega_0 t + \varphi) \quad \{2.1.3\}$$

où A et φ sont l'amplitude et la phase de l'oscillation, ne dépendant que des conditions dans lesquelles l'oscillateur a été mis initialement en mouvement.

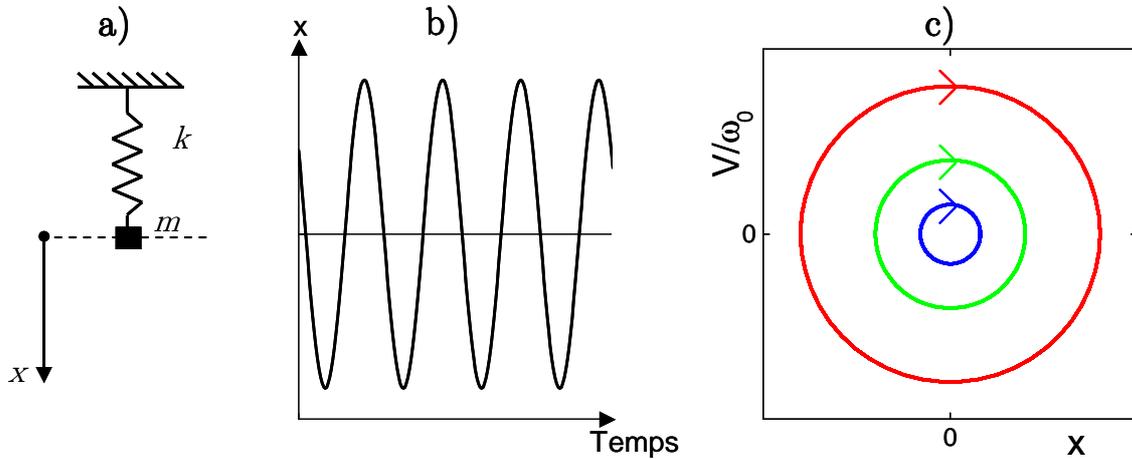


FIG. 2-1 Caractérisation d'un oscillateur linéaire sans dissipation. **a)** Exemple d'une masse m oscillant idéalement (sans frottement), à l'extrémité d'un ressort de raideur k . **b)** Oscillation de la position de la masse autour de sa position d'équilibre. **c)** Portrait de phase de l'oscillateur. Les trajectoires sont fermées et ne dépendent que des conditions initiales de mise en mouvement ; ici, 3 trajectoires sont représentées. Si on perturbe le système, l'oscillateur garde une mémoire de cet événement, et change de trajectoire close.

On peut alors représenter l'évolution de la masse soit en traçant l'évolution de x en fonction du temps (FIG. 2-1b), soit dans ce que l'on appelle l'espace des phases. Dans le cas de cet oscillateur, la position et la vitesse suffisent à caractériser l'état de l'oscillateur : on peut alors définir l'espace des phases comme l'ensemble des points de coordonnées $(x(t); v(t)/\omega_0)$. L'oscillation est décrite par la rotation d'un point à la vitesse constante ω_0 sur une trajectoire fermée (FIG. 2-1c). Ses coordonnées polaires correspondent à la phase $\omega_0 t + \varphi$ et à l'amplitude A de l'oscillation.

Pour un système linéaire conservatif, l'amplitude des oscillations est entièrement déterminée par les conditions initiales. La FIG. 2-1c montre le portrait de phase de cet oscillateur pour différentes conditions initiales.

Dans le cas d'un oscillateur dont la pulsation $\omega_0(t)$ dépend du temps, cela revient à dire que le point se déplace à vitesse non constante dans l'espace des phases ; la phase instantanée de l'oscillateur est alors définie par :

$$\omega_0(t) = \frac{d\varphi(t)}{dt} \quad \{2.1.4\}$$

2.2 Les oscillateurs auto-entretenus

On parle d'oscillateurs auto-entretenus pour décrire des systèmes dont l'oscillation est maintenue grâce à une source d'énergie interne qui compense les dissipations au sein du système. C'est le cas par exemple du cœur humain (rythme des battements), ou des vers lumineux mâles, qui clignent environ 3 fois par 2 secondes, afin d'attirer les femelles.

Parmi ces oscillateurs, on peut distinguer deux catégories principales : les oscillateurs quasi-linéaires, et les oscillateurs de relaxation. Les oscillateurs quasi-linéaires sont des systèmes délivrant un signal pratiquement sinusoïdal, de fréquence déterminée par les propriétés du système. Quant aux oscillateurs de relaxation, ce sont des systèmes caractérisés par la présence de 2 échelles de temps : au sein de chaque cycle, se trouvent des intervalles de mouvements lents et rapides. L'oscillation est donc loin de ressembler à une simple sinusoïde.

Comme exemple d'oscillateur de relaxation, nous pouvons citer en hydrodynamique, le vase de Tantale, qui, lorsqu'il est alimenté continûment par de l'eau, se vide et se remplit périodiquement. (FIG. 2-3). L'observation du niveau d'eau en fonction du temps montre bien les deux états de fonctionnement de l'oscillateur (FIG. 2-3b).

On peut aussi citer un exemple très connu : l'oscillateur de Van der Pol [69, 70], décrit par une équation dont le terme proportionnel à la vitesse est non linéaire :

$$\ddot{x} - \varepsilon\omega \left(1 - \frac{x^2}{x_0^2} \right) \dot{x} + \omega^2 x = 0 \quad \{2.2.1\}$$

avec $\varepsilon > 0$.

Le terme $-\epsilon\omega\left(1-\frac{X^2}{X_0^2}\right)\dot{X}$ constitue un amortissement si $\frac{X^2}{X_0^2} > 1$, et un terme d'accroissement si $\frac{X^2}{X_0^2} < 1$. Il entraîne alors la décroissance des grandes amplitudes d'oscillations, et leur croissance si elles deviennent trop petites. Ce système donne naissance à des oscillations auto-entretenues. Selon la valeur de ϵ , l'oscillateur peut passer d'un régime d'oscillations quasi-sinusoidal, à un régime de relaxation (FIG. 2-2a).

Les portraits de phase (FIG. 2-2b) pour ces régimes sont des trajectoires convergeant vers des orbites closes que l'on qualifie ici de cycles limites, car ces orbites sont indépendantes des conditions initiales de mise en mouvement de l'oscillateur. Ce cycle limite est dit attracteur, car si une petite perturbation modifie l'oscillation du système, le point de phase retourne sur le cycle limite. Ceci est une caractéristique des oscillateurs auto-entretenus : suite à une perturbation, le rythme originel est restauré.

Oscillateurs chaotiques

Le terme « chaotique » signifie ici que le comportement à long terme d'un tel système dynamique ne peut être prédit, et ce, même sans fluctuation des paramètres, ni bruit environnemental. L'irrégularité et l'imprévisibilité résultent de la dynamique interne du système. Un oscillateur chaotique est caractérisé par une période très fluctuante dans le temps. La dynamique d'un système chaotique dissipatif, représenté dans l'espace des phases, n'a pas une forme géométrique simple comme les cycles limites vus précédemment, mais a une structure complexe, appelés attracteur étrange (à l'opposé des cycles limites qui sont des attracteurs simples).

Un exemple connu d'attracteur étrange, est celui qui a fait l'objet des travaux du météorologue Edward Norton Lorenz en 1963, concernant des simulations numériques sur la convection turbulente.

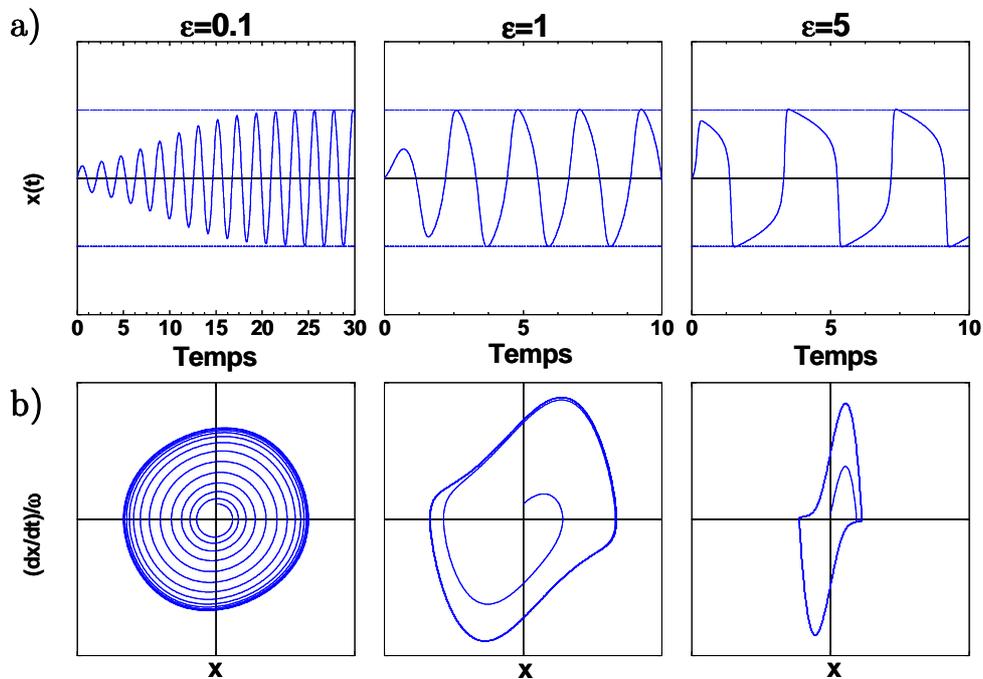
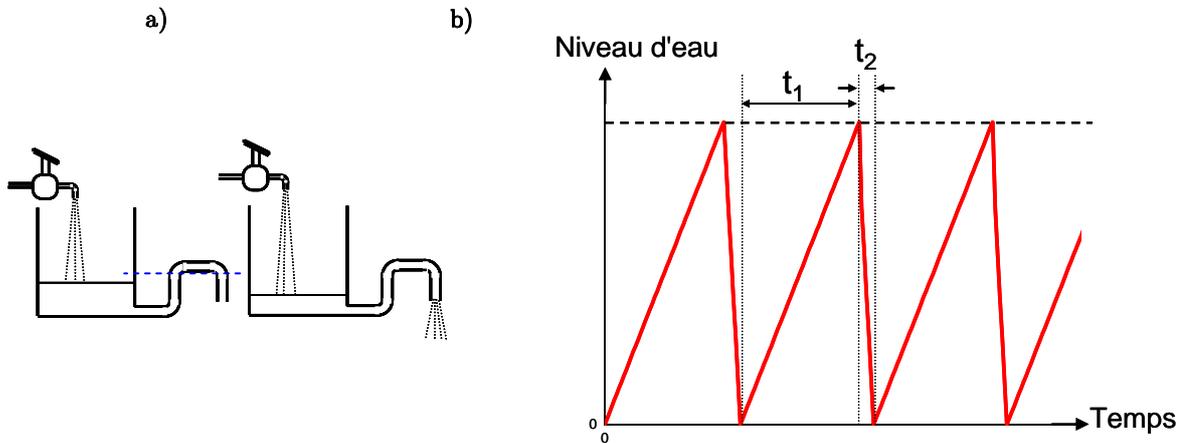


FIG. 2-2 Oscillateur de Van der Pol. a) Résolution de l'équation de Van der Pol {2.2.1}. Chacune de ces résolutions utilise les mêmes valeurs de ω et x_0 . Seul ε change d'un graphique à l'autre. Les oscillations sont d'autant moins sinusoïdales que ε est grand. b) Portraits de phases correspondant à ces paramètres. Dans tous les cas, il y a un cycle limite, et pour $\varepsilon = 0.1$, le cycle limite est circulaire, et se distord pour des valeurs plus élevées de ε .

2.3 Oscillations en présence de bruit

Jusqu' alors, nous avons considéré des systèmes oscillants idéaux, en négligeant le fait que les paramètres macroscopiques des systèmes peuvent fluctuer. Ces fluctuations peuvent être considérées comme des perturbations faibles, pouvant modifier l'oscillation originelle du système.

2.3.1 Oscillateur de phase

Nous nous intéressons à ce que deviennent la phase et l'amplitude d'un oscillateur auto-entretenu en présence de bruit. Le portrait de phase d'un tel oscillateur tracé dans un repère tournant à la pulsation propre de l'oscillateur ω_0 , est donc un point immobile sur le cycle limite (FIG. 2-4).

Si le système subit une perturbation, nous pouvons représenter cette perturbation par un déplacement du point de phase hors du cycle limite. Dans la mesure où la perturbation est faible, l'amplitude du signal relaxe jusqu'à sa valeur initiale, alors que la phase, conserve la « mémoire » de la perturbation, et ne revient pas à sa valeur antérieure (FIG. 2-5). Le cycle limite d'un oscillateur auto-entretenu est donc stable dans la direction transverse, alors que dans la direction tangentielle, il n'est ni stable, ni instable. En dynamique non linéaire, la convergence/divergence de trajectoires proches est caractérisée par les exposants de Lyapunov. Des exposants de Lyapunov négatif et positif correspondent respectivement à la convergence et la divergence le long d'une direction de l'espace des phases. Et dans le cas où l'exposant de Lyapunov est nul, il n'y a ni convergence, ni divergence. La phase de l'oscillateur auto-entretenu a un exposant de Lyapunov nul, ce qui implique qu'elle ne converge, ni ne diverge suite à une perturbation [70].

On définit un oscillateur de phase comme un système dont la dynamique peut être décrite uniquement par sa phase. Les éventuelles perturbations subies par l'oscillateur ont essentiellement des effets sur la phase, les perturbations sur l'amplitude restant limitées.

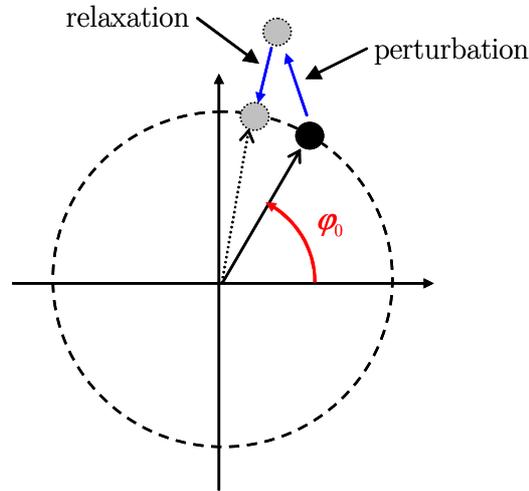


FIG. 2-4 Effet d'une perturbation faible sur un oscillateur auto-entretenu. Nous considérons un oscillateur auto-entretenu de pulsation propre ω_0 . Dans un repère tournant à la vitesse ω_0 , la dynamique de l'oscillateur est représenté par un point immobile dans l'espace des phases. (point noir). Si le point est éjecté à proximité du cycle limite, la perturbation sur l'amplitude diminue : le point retourne sur le cycle limite. Par contre, la phase après perturbation ne relaxe pas à la valeur précédant la perturbation. Les cercles gris représentent l'état de l'oscillateur perturbé, et l'état après la perturbation.

(D'après Pikovsky, A., *et al.*, « *Synchronization: A universal concept in nonlinear sciences* » Cambridge University Press, Cambridge 2001 p32)

2.3.2 Diffusion de la phase

Nous étudions ici, un oscillateur i , dont l'oscillation est décrite par la variable $x_i(t)$; pour un oscillateur auto-entretenu libre, la dynamique est décrite [70] par l'équation :

$$\frac{dx_i}{dt} = f_i(x_i) \quad \{2.3.1\}$$

En particulier, l'évolution de la phase de cet oscillateur dépend de la pulsation propre $\omega_i(t)$:

$$\frac{d\phi_i}{dt} = \omega_i(t) \quad \{2.3.2\}$$

Il faut cependant tenir compte dans cette description déterministe de l'évolution de la phase, de la présence de bruit sur les phases des oscillateurs. Comme la phase d'un oscillateur auto-entretenu a un exposant de Lyapunov nul, alors le bruit stochastique engendre des fluctuations sur la phase similaire à un processus de marche aléatoire à une dimension. Les termes de fluctuation aléatoire $\xi_k(t)$ sur la phase φ_k sont ainsi supposés être des variables gaussiennes indépendantes, de valeur moyenne nulle $\langle \xi_k \rangle = 0$, et δ -corrélées en temps, $\langle \xi_k(t)\xi_j(t') \rangle = 2\sigma^2 \delta(t-t')\delta_{kj}$. Ainsi, dans un repère tournant à la vitesse $\omega_0(t)$, avec $\varphi(t) = \phi(t) - \int \omega_0(t)dt$, l'équation {2.3.2} décrivant la variation de la phase devient une équation de Langevin :

$$\frac{d\varphi_i}{dt} = \xi_i(t) \quad \{2.3.3\}$$

L'équation de Fokker-Planck [71] correspondante décrivant l'évolution temporelle de la distribution de phase est :

$$\frac{\partial P(\varphi, t)}{\partial t} = \sigma^2 \frac{\partial^2 P(\varphi, t)}{\partial \varphi^2} \quad \{2.3.4\}$$

Nous obtenons ainsi une équation de diffusion de la phase de l'oscillateur. En choisissant comme condition initiale une distribution centrée en $\varphi = \mu$: $P(\varphi, t=0) = \delta_{\varphi-\mu}$, cette équation a pour solution, sur l'intervalle $]-\infty; +\infty[$:

$$P(\varphi, t) = \frac{1}{\sqrt{2\pi Dt}} e^{-\frac{(\varphi-\mu)^2}{2Dt}} \quad \{2.3.5\}$$

Avec $D=2\sigma^2$ le coefficient de diffusion de phase.

Les phases de chaque oscillateur décrivent un processus de Wiener, c'est-à-dire une gaussienne dont la variance croît linéairement avec le temps : $\sigma_\varphi^2 = Dt$. En considérant une assemblée d'oscillateurs, les phases individuelles vont donc se disperser sous l'effet du bruit stochastique. Cependant, les phases sont définies modulo 2π , et cette description de la dispersion sur un intervalle de largeur infinie n'est pas adaptée pour décrire la diffusion de phase. Nous allons donc plutôt résoudre cette équation en cherchant une solution 2π -périodique de la phase : $P(\varphi, t) = P(\varphi + 2\pi n, t)$, où n est un entier. Pour ce faire, il suffit de replier la solution {2.3.5}, sur un intervalle de largeur 2π , ce qui donne :

$$P(\varphi, t) = \frac{1}{\sqrt{2\pi Dt}} \sum_{k=-\infty}^{k=\infty} e^{-\frac{-(\varphi+2\pi k-\mu)^2}{2Dt}} \quad \{2.3.6\}$$

2.3.3 Simulations numériques : diffusion de phase

Dans cette partie, nous réalisons les simulations numériques des équations {2.3.3} décrivant la dynamique d'une assemblée d'oscillateurs soumis à un bruit stochastique. Nous utilisons la méthode d'Euler pour résoudre ces équations différentielles. Le pas de calcul temporel choisi étant $6.2 \cdot 10^{-2}$ h. Le choix du pas résulte d'un compromis entre la durée des simulations, que l'on désire minimiser, et la qualité de la résolution des équations par la méthode d'Euler. Par ailleurs, le bruit sur la phase ξ est un processus de Wiener, de constante de diffusion D , simulé à chaque pas de temps par un saut de phase $\xi = \pm\sqrt{D\Delta t}$, équiprobable vers l'avant ou l'arrière.

Toutes les simulations numériques présentées par la suite sont réalisées de cette manière. Le pas de calcul est le même pour toutes les simulations, et le bruit stochastique sur la phase est toujours simulé par ce processus de marche aléatoire.

Nous considérons une population constituée de 10000 oscillateurs. Et nous générons une distribution initiale de phases indépendantes de ces oscillateurs, réparties suivant une gaussienne de valeur moyenne nulle, et de déviation standard $\sigma_0 = 0.1$ rad.

La FIG. 2-5 montre la distribution de phases repliée sur l'intervalle $]-\pi; \pi]$ à différents instants, pour $D = 1.1 \cdot 10^{-2}$ h⁻¹. Nous voyons aussi sur cette FIG. 2-5 une représentation spatiale des phases : chaque point a la même coordonnée polaire radiale, et une coordonnée angulaire donnée par la phase d'un oscillateur. Les phases sont de plus en plus étalées sur le cercle à mesure que le temps passe.

2.4 Statistique circulaire

2.4.1 Introduction

Comme les phases sont des variables définies à 2π près, la description statistique utilisée habituellement pour des variables non cycliques n'est pas appropriée pour décrire la phase moyenne et la largeur de la distribution de phases. En effet, les résultats obtenus par exemple pour la valeur moyenne de la phase dépendent fortement de l'intervalle de largeur 2π considéré pour l'étude des phases.

Afin d'illustrer ceci, représentons la distribution {2.3.6} sur deux intervalles de largeur 2π différents. La FIG. 2-6 montre que pour $\mu = 0$, la moyenne de la distribution repliée sur l'intervalle $[-\pi; \pi[$ est égale à 0, tandis que, en représentant cette même gaussienne sur l'intervalle $[0; 2\pi[$, il est clair que la valeur moyenne de la distribution n'est plus égale à 0, mais à π .

Il est donc indispensable d'introduire une description statistique appropriée [72] à l'étude des phases. Pour ce faire, nous définissons le champ moyen complexe de phases Z créé par une assemblée de N oscillateurs :

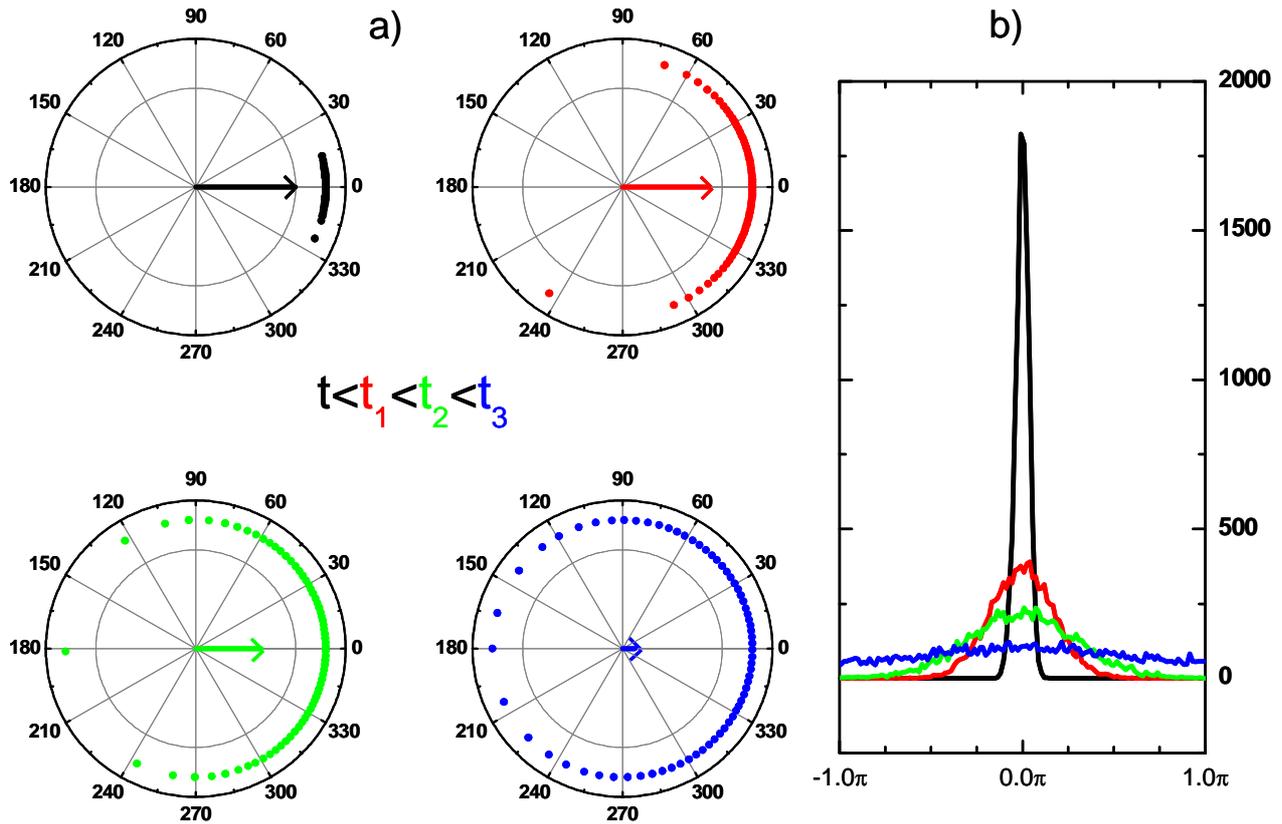


FIG. 2-5 Effet du bruit stochastique sur la phase. Nous simulons numériquement les équations {2.3.3} pour un ensemble de 10000 oscillateurs, dont les phases sont réparties initialement suivant une distribution gaussienne centrée sur 0, et de déviation standard $\sigma = 0.1$ rad. **a)** Phases individuelles des oscillateurs à différents instants t , t_1 , t_2 , t_3 . La largeur de distribution croît effectivement avec le temps. Les vecteurs au centre de chaque cercle représentent la cohérence des phases : leur norme est égale au paramètre d'ordre (cf. 2.4.1), et leur orientation est donnée par la phase moyenne de la distribution de phases. **b)** Histogrammes de phases repliés sur l'intervalle $]-\pi, \pi]$ de la population aux différents instants t , t_1 , t_2 , t_3 .

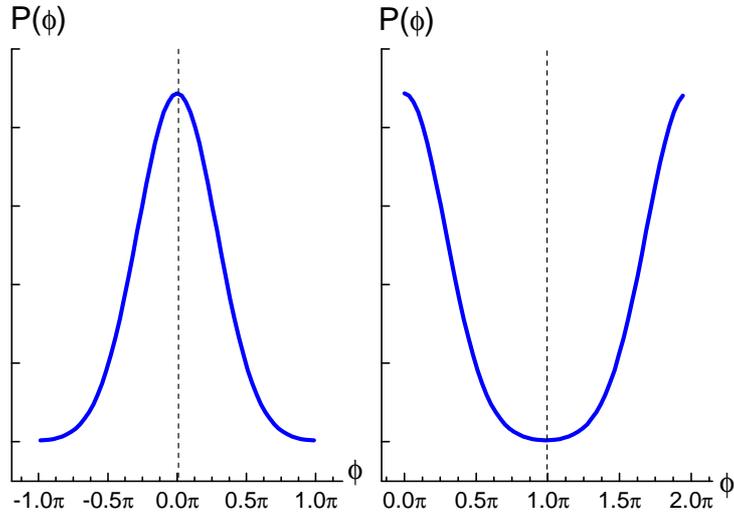


FIG. 2-6 Distribution gaussienne de valeur moyenne nulle, repliée sur un intervalle de largeur 2π . **a)** Distribution repliée sur l'intervalle $[-\pi; \pi[$: la valeur moyenne de la distribution définie sur cet intervalle est bien nulle. **b)** Cette même distribution, repliée sur l'intervalle $[0; 2\pi[$ a une valeur moyenne égale à π .

$$Z = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N e^{i\varphi_j} = \rho e^{i\mu} \quad \{2.4.1\}$$

Où ρ et μ sont le module et l'argument de Z .

Cette écriture revient à considérer la contribution de chaque oscillateur comme un vecteur unitaire de direction donnée par φ_j . Le champ moyen Z est le vecteur résultant moyen, orienté selon la phase moyenne des oscillateurs, et dont la norme caractérise la cohérence au sein de l'assemblée d'oscillateurs. Le module et l'argument de Z ont pour expression :

$$\rho = \frac{1}{N} \left[\sqrt{\left(\sum_{i=1}^N \cos \varphi_i \right)^2 + \left(\sum_{i=1}^N \sin \varphi_i \right)^2} \right] \quad \{2.4.2\}$$

et

$$\mu = \tan^{-1} \left(\frac{\sum_{i=1}^N \sin(\varphi_i)}{\sum_{i=1}^N \cos(\varphi_i)} \right) \quad \{2.4.3\}$$

Le module de Z caractérise la cohérence au sein de l'assemblée d'oscillateurs : si tous les oscillateurs ont des phases strictement identiques, alors $\rho = 1$. Alors que si les phases sont uniformément distribuées sur un intervalle de largeur 2π , $\rho = 0$. ρ apparaît comme le paramètre d'ordre du système d'oscillateurs : $0 \leq \rho \leq 1$, et ρ est d'autant plus petit que la dispersion des phases est importante. La FIG. 2-5 montre la phase moyenne et le paramètre d'ordre des populations d'oscillateurs soumises à la diffusion de phase. La phase moyenne est constante, et le paramètre d'ordre diminue à mesure que la distribution s'élargit.

2.4.2 Distribution de Von Mises

Dans le cadre de la statistique circulaire, il existe une fonction de densité de probabilité qui joue un rôle particulièrement important: il s'agit de la distribution de Von Mises [73], définie pour une variable circulaire φ , par :

$$f(\varphi) = \frac{1}{2\pi I_0(k)} e^{k \cos(\varphi - \mu_0)} \quad \{2.4.4\}$$

Où μ_0 est la phase moyenne,

k la « concentration », un paramètre lié à la largeur de la distribution, et $I_0(k)$ la fonction de Bessel modifiée d'ordre 0.

Rappelons que à l'ordre n , les fonctions de Bessel modifiées sont définies par

$$I_n(k) = \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} e^{k \cos t} \cos nt \, dt.$$

Le champ moyen complexe d'un ensemble infini d'oscillateurs dont les phases sont réparties suivant cette distribution s'écrit, d'après {2.4.1} :

$$Z_\infty = \frac{1}{2\pi I_0(k)} \int_{-\pi}^{\pi} e^{i\varphi} e^{k \cos(\varphi - \mu_0)} d\varphi \quad \{2.4.5\}$$

Le calcul de cette intégrale donne :

$$Z_\infty = \frac{I_1(k)}{I_0(k)} e^{i\mu_0} \quad \{2.4.6\}$$

Par analogie avec l'expression {2.4.1} du champ complexe créée par un ensemble fini d'oscillateurs, nous en déduisons que lorsque $N \rightarrow \infty$:

$$\begin{aligned} \mu &\rightarrow \mu_0 \\ \rho &\rightarrow \frac{I_1(k)}{I_0(k)} \end{aligned} \quad \{2.4.7\}$$

Par la suite, nous définissons la fonction $A_1(k) = I_1(k)/I_0(k)$.

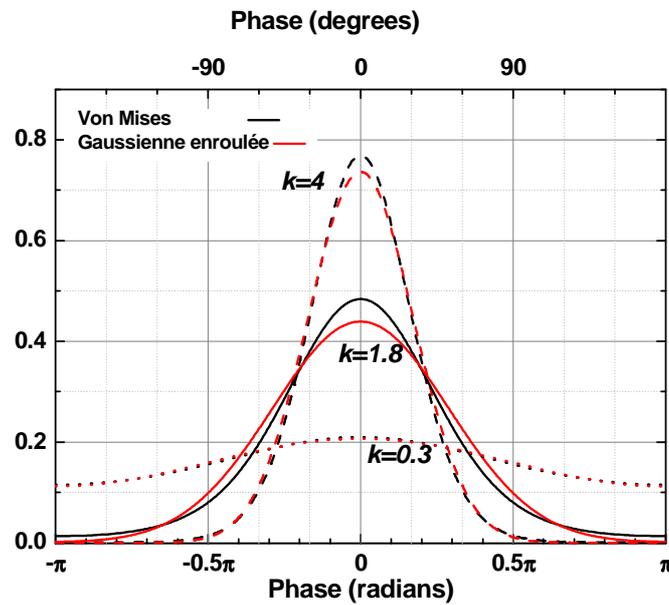


FIG. 2-7 Comparaison d'une distribution Gaussienne enroulée et d'une distribution de Von Mises, (resp. lignes rouges et noires), pour différentes valeurs de concentration k : $k=0.3$; $k=1.8$; $k=4$, ce qui correspond respectivement à des déviations standards circulaires $\sigma=1.95$; 0.9 , et 0.54 rad. Pour les fortes et faibles concentrations, les 2 distributions coïncident.

Nous avons vu que le paramètre d'ordre quantifie la dispersion des phases ; cependant, il est plus intuitif de quantifier cette dispersion par une grandeur analogue à la déviation standard d'une variable aléatoire non cyclique.

Pour une infinité d'oscillateurs répartis suivant une distribution Gaussienne centrée en μ_0 , et de variance σ^2 (on note par la suite la distribution $\mathcal{N}(\mu_0, \sigma)$), le champ moyen complexe a pour expression :

$$Z_\infty = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma}} \int_{-\infty}^{+\infty} e^{j\varphi} \cdot e^{-\frac{(\varphi-\mu_0)^2}{2\sigma^2}} d\varphi \quad \{2.4.8\}$$

Le calcul de cette intégrale donne :

$$Z_\infty = e^{i\mu_0} \cdot e^{\frac{-\sigma^2}{2}} \quad \{2.4.9\}$$

Le paramètre d'ordre de cette distribution est donc :

$$\rho = e^{\frac{-\sigma^2}{2}} \quad \{2.4.10\}$$

Par analogie entre {2.4.6} et {2.4.9}, nous en déduisons que la distribution de Von Mises équivalente à la distribution $N(\mu_0, \sigma)$ repliée, a une déviation standard circulaire :

$$\sigma = \sqrt{-2 \ln \rho(k)} = \sqrt{-2 \ln A_1(k)} \quad \{2.4.11\}$$

La FIG. 2-7 compare la distribution de Von Mises de valeur moyenne nulle et de concentration k , à la distribution gaussienne repliée équivalente, de valeur moyenne nulle, et de déviation standard $\sigma = \sqrt{-2 \ln A_1(k)}$. Ces 2 distributions coïncident pour les petites et les grandes valeurs de k .

2.4.3 Exemple : l'oscillateur circadien chez la cyanobactérie

Diffusion de phase

Nous avons vu que des résultats démontraient la robustesse de l'oscillation circadienne chez des cyanobactéries individuelles [10]. Chaque cellule possède donc un oscillateur auto-entretenu. Par ailleurs, au vu de la forme quasi-sinusoidale de l'oscillation circadienne, on peut estimer que l'oscillateur implémenté dans la cyanobactérie est quasilinéaire.

Cet oscillateur est soumis à deux sources de fluctuations, qui engendrent du bruit sur la phase de l'oscillation.

La première, purement expérimentale, est générée par des fluctuations de l'environnement extérieur dans lequel se trouvent les cellules, et par les interventions de l'expérimentateur, comme par exemple l'ajout de milieu de culture. Ces fluctuations sont externes aux oscillateurs, et on considère donc qu'elles affectent tous les oscillateurs de manière analogue. Par la suite, nous ne prendrons pas en compte ces fluctuations dans l'étude de la dynamique des phases.

La deuxième source de bruit, spécifique à chaque oscillateur cette fois, vient de la nature stochastique des réactions chimiques au sein de chaque cellule. Ceci peut *a priori* affecter aussi bien la phase, que la période propre d'oscillation, ou encore la forme de l'oscillation. Cependant, des expériences sur cellules individuelles [10] montrent que pour une même condition

expérimentale, tous les oscillateurs ont des périodes propres quasiment identiques (le rapport de la déviation standard par la moyenne étant inférieur à 0.5%). Par conséquent, nous considérons que tous les oscillateurs sont identiques, et oscillent avec la même pulsation propre $\omega_0(t)$ qui dépend sensiblement du temps (et identiquement pour tous les oscillateurs).

L'oscillateur peut être considéré comme un oscillateur de phase (cf. 2.4.3), et de ce fait, nous nous intéressons uniquement à la dynamique de la phase. L'oscillation de bioluminescence d'une cellule i peut être décrite par l'expression :

$$s_i(t) = g_i \cdot [1 + b \cdot \cos(\omega_0 t + \varphi_i)] \quad \{2.4.12\}$$

Où la pulsation propre ω_0 et l'amplitude b sont des grandeurs constantes en première approximation. De plus, $0 \leq b \leq 1$ ($s_i(t)$ se réfère à une émission de photons et est donc une grandeur positive). Le gain du rapporteur de la luciférase $g_i(t)$ et la phase φ_i sont deux variables aléatoires. $g_i(t)$ est une variable gaussienne de valeur moyenne constante $\langle g_i(t) \rangle = g$, et de déviation standard σ_A constante.

Signal de bioluminescence moyen généré par une population d'oscillateurs

A partir de la définition du champ moyen complexe vu dans la partie 2.4.1, nous allons exprimer le champ moyen d'oscillation créée par une assemblée de N oscillateurs ($N \gg 1$).

Le signal moyen émis par cette assemblée d'oscillateurs est :

$$S(t) = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N s_j(t) = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N g_j + \frac{b}{N} \sum_{j=1}^N g_j \cdot \cos(\omega_0 t + \varphi_j) \quad \{2.4.13\}$$

Comme $N \gg 1$, et que les variables $g_j(t)$ et φ_j sont indépendantes, alors on peut réécrire le signal moyen comme suit :

$$S(t) = g(t) \cdot [1 + b \cdot \langle \cos(\omega_0 t + \varphi) \rangle] \quad \{2.4.14\}$$

Où $\langle \cos(\omega_0 t + \varphi) \rangle$ et $g(t) = \langle g_j(t) \rangle$ sont les valeurs moyennes théoriques respectives de $\cos(\omega_0 t + \varphi_j)$ et $g_j(t)$.

Le champ moyen complexe de phase généré par cette assemblée d'oscillateurs s'écrit $Z = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N e^{i(\omega_0 t + \varphi_j)}$, et d'après ce que nous avons vu dans la partie 2.4.1, $Z = \rho e^{i(\omega_0 t + \mu)}$, où ρ

est le paramètre d'ordre, et μ la phase moyenne dans un repère tournant à la vitesse ω_0 . Nous déduisons alors que $\langle \cos(\omega_0 t + \varphi) \rangle = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N \cos(\omega_0 t + \varphi_j) = \rho \cos(\omega_0 t + \mu)$. Le signal théorique moyen émis par une assemblée d'oscillateurs a donc pour expression :

$$S(t) = g \cdot [1 + b \cdot \rho \cdot \cos(\omega_0 t + \mu)] \quad \{2.4.15\}$$

L'amplitude d'oscillation est proportionnelle au paramètre d'ordre : plus les phases sont dispersées, plus l'amplitude diminue.

Exemple : cas des oscillateurs dispersifs

Dans le cas d'oscillateurs soumis à des fluctuations stochastiques (cf. 2.3.2), la distribution de phases d'une assemblée infinie d'oscillateurs a une valeur moyenne constante, et une variance qui augmente linéairement avec le temps : $\sigma^2 = Dt$. Le paramètre d'ordre de la distribution est donc (d'après {2.4.10}) $\rho = e^{\frac{-Dt}{2}}$. On en déduit le signal moyen théorique émis par cette population d'oscillateurs :

$$S(t) = \langle s_i(t) \rangle = A \cdot [1 + b \cdot e^{-Dt/2} \cdot \cos(\omega_0 t + \mu)] \quad \{2.4.16\}$$

Ainsi, du fait de la diffusion, les phases des oscillateurs dérivent de part et d'autre de la phase moyenne μ , d'où la décroissance exponentielle de l'amplitude des oscillations.

2.5 Synchronisation d'oscillateurs par une force extérieure

2.5.1 Modèle de synchronisation par une force extérieure de faible amplitude

Dans le cas d'un oscillateur soumis à une force d'amplitude faible, l'amplitude d'oscillation n'est pas affectée, puisque nous avons vu que pour un oscillateur auto-entretenu quasi linéaire, l'amplitude est stable, et pas la phase. Dès lors, nous allons nous intéresser uniquement à la dynamique de phase.

Considérons un oscillateur soumis à une force extérieure de faible amplitude, en l'absence de bruit. L'équation {2.3.1} décrivant la dynamique d'un oscillateur libre devient alors :

$$\frac{dx}{dt} = f(x) - \varepsilon p(x, t) \quad \{2.5.1\}$$

Où la force $\varepsilon p(x, t) = \varepsilon p(x, t + T)$ a une période T . La force est proportionnelle au paramètre ε , supposé petit, c'est pourquoi nous considérons par la suite uniquement les effets du premier ordre en ε . On peut montrer [70], en combinant {2.3.2} et {2.5.1} que l'évolution de la phase de cet oscillateur forcé s'écrit :

$$\frac{d\phi}{dt} = \omega_0 - \varepsilon \cdot Q(\phi, t) \quad \{2.5.2\}$$

Où Q est une fonction 2π -périodique de ϕ et T -périodique de t . Cette fonction dépend aussi de p .

En développant Q en série de Fourier, et dans l'hypothèse où la fréquence propre de l'oscillateur et la fréquence de la force extérieure sont proches ($\omega \approx \omega_0$), alors on peut montrer que l'équation précédente s'exprime à l'aide d'une nouvelle fonction 2π -périodique, q :

$$\frac{d\phi}{dt} = \omega_0 - \varepsilon \cdot q(\phi - \omega t) \quad \{2.5.3\}$$

Introduisons maintenant la différence entre la phase de l'oscillation et la phase de la force extérieure :

$$\psi(t) = \phi(t) - \omega t \quad \{2.5.4\}$$

De même on introduit la différence de pulsation :

$$\nu = \omega_0 - \omega \quad \{2.5.5\}$$

Ce qui permet de réécrire {2.5.3} :

$$\frac{d\psi}{dt} = \nu - \varepsilon \cdot q(\psi) \quad \{2.5.6\}$$

Nous choisissons par la suite de décrire le couplage en ne conservant que le premier terme du développement de Fourier de q , c'est-à-dire que nous faisons l'hypothèse d'un couplage sinusoïdal simple, ainsi, l'équation précédente devient :

$$\frac{d\psi}{dt} = \nu - \varepsilon \cdot \sin \psi \quad \{2.5.7\}$$

plus connue sous le nom d'équation de Adler.

Cette expression permet de distinguer deux types d'interaction selon le signe de ε ; en particulier, dans le cas où $\nu = 0$, on remarque que si $\varepsilon > 0$, la solution stable correspond à l'égalité des phases de la force et de l'oscillateur : il s'agit donc ici d'une interaction attractive. A l'inverse, si $\varepsilon < 0$, la solution stable correspond à une opposition de phase : l'interaction est répulsive. Notre étude ne s'intéresse qu'à des interactions attractives, nous posons donc $\varepsilon > 0$ par la suite.

2.5.2 Exemple : les lucioles

Un exemple d'oscillateurs biologiques décrit par cette équation est celui de l'émission d'impulsions lumineuses par les lucioles.

Les lucioles peuvent émettre des flashes lumineux périodiques, espacés typiquement d'une seconde. Ces insectes sont capables de synchroniser leur émission avec une source extérieure (on parle alors d'entraînement), ou avec d'autres lucioles de la même espèce. Des expériences d'entraînement par une excitation lumineuse, faites sur une espèce de lucioles de Malaisie (*Pteroptyx malacca*), montrent qu'il est possible de modéliser le comportement par un couplage avec une force extérieure de faible amplitude [74].

Soit θ la phase du rythme d'émission des flashes lumineux, où $\theta = 0$ correspond à l'instant auquel un flash est émis. En l'absence de stimuli externes, la phase de l'oscillateur ne dépend que de la pulsation propre d'oscillation ω_0 :

$$\frac{d\theta}{dt} = \omega_0 \quad \{2.5.8\}$$

Le modèle suppose que la force extérieure agit continûment sur l'oscillateur, et a une pulsation constante ω_E . Les hypothèses sont les suivantes : si $\omega_E < \omega_0$, alors $d\theta/dt$ diminue, ce qui diminue la fréquence des flash émis ; et à l'inverse, si $\omega_E > \omega_0$, l'émission de flash s'accélère, $d\theta/dt$ augmente.

Dans cette étude, l'équation décrivant ce modèle est :

$$\frac{d\theta}{dt} = \omega_0 - \varepsilon \sin(\theta - \omega_E t) \quad \{2.5.9\}$$

où $\varepsilon > 0$ quantifie l'influence relative de la force extérieure sur l'oscillateur.

En posant $\varphi = \omega_0 t - \theta$, et $\nu = \omega_E - \omega_0$, cette équation se réécrit :

$$\frac{d\varphi}{dt} = \nu - \varepsilon \sin \varphi \quad \{2.5.10\}$$

La FIG. 2-8a montre le portrait de phase de l'oscillateur pour différentes valeurs de ν . Dans le cas où $\nu = 0$, on voit apparaître un point fixe, qui correspond à $\varphi = 0$. C'est-à-dire que l'oscillateur se met à osciller en phase avec la force extérieure : les lucioles émettent des flashes à l'unisson avec la force. Nous voyons que pour $0 < \nu < \varepsilon$, il existe aussi un point fixe, mais dans ce cas, $\varphi > 0$. La synchronisation se traduit non pas par une égalité des phases, mais par une égalité des fréquences de l'oscillateur et de la force. Si maintenant $\nu > \varepsilon$, on voit sur la FIG. 2-8c qu'il n'y a plus de point fixe : la différence de phase entre l'oscillateur et la force augmentera non uniformément, de manière quasi périodique : il n'y a pas de synchronisation.

La capacité de l'oscillateur à se synchroniser avec la force extérieure dépend du rapport entre leur différence de fréquence et l'amplitude de la force ε . L'entraînement n'est effectif que pour une force d'intensité suffisante comparée à $|\omega_0 - \omega_E|$. L'intervalle de fréquence correspondant est la « région de synchronisation » (FIG. 2-8d). Ceci est un résultat général sur la synchronisation d'un oscillateur avec une force extérieure : la synchronisation entre un oscillateur et une force extérieure périodique n'est possible que si la différence de fréquence $|\omega_0 - \omega_E|$ est petite (relativement à l'intensité de la force).

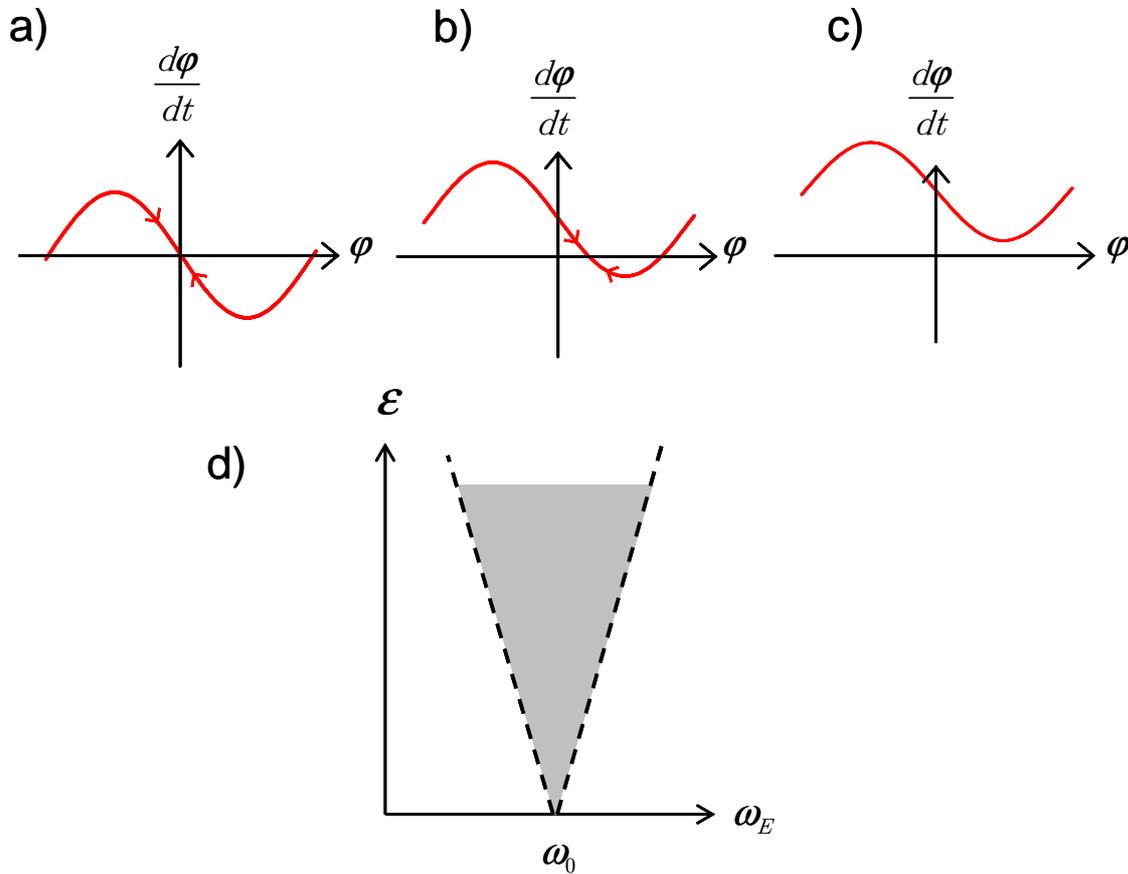


FIG. 2-8 Portrait de phase pour 3 valeurs de ν . **a)** $\nu = 0$, la solution stationnaire stable correspond à $\phi^* = 0$: l'oscillateur oscille en phase avec la force extérieure : les lucioles sont entraînées. **b)** $0 < \nu < \epsilon$, la solution stationnaire stable correspond à $\phi^* \neq 0$: l'oscillateur a la même fréquence que la force extérieure, mais oscille à une phase différente **c)** Pour $\nu > \epsilon$, il n'existe plus de solution stationnaire : le stimulus devient trop rapide pour la luciole ; il n'y a plus de synchronisation possible. **d)** Schématisation de la région de synchronisation (langue d'Arnold) : l'entraînement n'est effectif que lorsque la différence de fréquence entre la force et l'oscillateur est petite (relativement à ϵ). La gamme de fréquences autorisant l'entraînement est d'autant plus large que ϵ est important. Les lignes en pointillés délimitent la région pour laquelle $\epsilon \geq |\omega_0 - \omega_E|$.

2.5.3 Entraînement de cyanobactéries par une variation périodique lumineuse

L'oscillateur circadien chez la cyanobactérie peut être entraîné par des variations périodiques de l'environnement. Nous avons montré [75] que cet oscillateur peut être considéré comme un oscillateur de phase, et que des cyanobactéries soumises à des variations périodiques de lumière, de période $T = 24$ h, ont un comportement qui peut être modélisé par l'équation de Adler {2.5.7}, modifiée par la présence du bruit stochastique.

Cette étude considère une population d'oscillateurs cyanobactériens j , de phase $\varphi_j(t)$, et de pulsation propre ω_0 , entraînés par une force extérieure périodique de phase : $\varphi_E = \varphi_E^0 + \omega_E t$. La dynamique d'un oscillateur de phase est décrite dans ce cas par l'équation :

$$\frac{d\phi_j}{dt} = \nu - \varepsilon \sin[\phi_j - \Delta\theta] + \xi_j(t) \quad \{2.5.11\}$$

Avec $\nu = \omega_0 - \omega_E$, et $\xi_j(t)$ est le terme de bruit stochastique décrit en 2.3.2, et avec $\phi_j(t) = \varphi_j(t) - \varphi_j(0) - \omega_E t$, et $\Delta\theta = \varphi_E^0 - \varphi_j(0)$.

La FIG. 2-9 montre l'évolution expérimentale de la phase moyenne des populations d'oscillateurs, pour différentes valeurs de déphasages initiaux entre la force et l'oscillateur. Les phases moyennes initiales des populations sont les mêmes, et sous l'effet de l'entraînement, les phases moyennes des populations changent. Au terme de l'entraînement, les déphasages entre populations sont égaux aux déphasages entre leurs entraînements respectifs. Même après l'arrêt de l'entraînement, ces déphasages persistent, preuve que chaque population a effectivement été entraînée par les forces extérieures respectives. Nous voyons aussi sur cette figure les résultats des simulations numériques de l'équation {2.5.11}. Les évolutions des phases données par ces simulations décrivent correctement les évolutions expérimentales des phases.

Cette étude montre que nous pourrons par la suite, considérer l'oscillateur circadien de la cyanobactérie comme un oscillateur de phase, et que l'interaction avec une force extérieure faible pourra être décrite par $\varepsilon \cdot \sin(\varphi_{osc} - \varphi_E)$, où est φ_{osc} la phase de l'oscillateur, et φ_E la phase de la force extérieure.

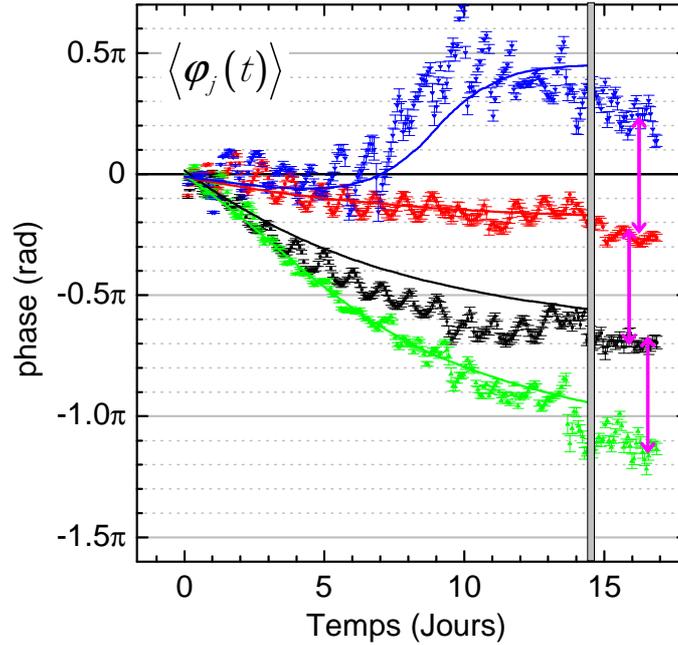


FIG. 2-9 Entraînement des oscillateurs cyanobactériens par une intensité périodique de lumière. Les populations sont soumises à une variation périodique sinusoïdale de lumière, de période $T=24$ h, oscillant entre 300 et 700 lux, pendant $\cong 14$ jours, puis elles sont placées en lumière constante pendant 3 jours. La double barre grise indique le passage du cycle LD au cycle LL. 4 entraînements sont réalisés sur des populations de cyanobactéries ; les phases initiales des entraînements étant séparées de $\pi/2$. Les carrés et les barres d'erreurs représentent la phase moyenne d'oscillation de chaque population, et l'erreur standard sur la moyenne. Les lignes continues représentent les simulations numériques des équations de Adler {2.5.11} pour une population constituée de 2000 oscillateurs, avec les mêmes conditions d'entraînement que les conditions expérimentales. Les flèches de norme $\pi/2$, montrent que les déphasages entre les populations après entraînement sont ceux imposés par les entraînements.

2.6 Oscillateurs mutuellement couplés

Ce paragraphe traite de la synchronisation d'oscillateurs mutuellement couplés. Les effets sont similaires à ceux que nous venons de décrire pour un oscillateur couplé à une force extérieure.

Dans le cas le plus général, l'interaction entre 2 systèmes n'est pas symétrique. Si l'interaction dans une direction est bien plus forte que dans l'autre, on se retrouve dans le cas d'un oscillateur couplé à une force extérieure. Pour ce qui est d'une interaction bidirectionnelle, si le couplage est suffisamment fort, les fréquences d'oscillation des systèmes convergeront vers une valeur commune.

Exemple : les vers lumineux

Les lucioles donnent un exemple spectaculaire de synchronisation dans la nature. Dans certaine région de l'Asie du sud-est, des milliers de lucioles mâles se rassemblent dans les arbres et émettent des impulsions de lumière à l'unisson. Le couplage est ici une influence des lucioles les unes sur les autres : une luciole voyant l'émission d'une autre va ralentir ou accélérer son émission pour émettre plus en phase au prochain cycle.

2.6.1 Couplage entre deux oscillateurs

Soient deux oscillateurs 1 et 2 de phases respectives $\varphi_1(t)$ et $\varphi_2(t)$, et de même pulsation propre ω_0 . Nous supposons de plus que les deux oscillateurs sont de même nature ; le couplage est donc symétrique.

Par analogie avec l'équation décrivant le couplage d'un oscillateur avec une force extérieure de faible amplitude, nous décrivons la dynamique de deux oscillateurs couplés par {2.5.7}, à l'aide du système :

$$\begin{aligned} \frac{d\varphi_1}{dt} &= \omega_0 - \varepsilon \cdot \sin(\varphi_1 - \varphi_2) \\ \frac{d\varphi_2}{dt} &= \omega_0 - \varepsilon \cdot \sin(\varphi_2 - \varphi_1) \end{aligned} \tag{2.6.1}$$

2.6.2 Couplage mutuel entre N oscillateurs

Nous généralisons le système précédent au cas d'un très grand nombre ($N \rightarrow \infty$) d'oscillateurs couplés, soumis aux fluctuations décrites dans le § 2.3.2. Cette dynamique d'un ensemble d'oscillateurs mutuellement couplés est décrite par Kuramoto [76], grâce à un système d'équations similaires à {2.6.1}: pour un oscillateur k de pulsation propre ω_0 , l'évolution de la phase φ_k est donnée par :

$$\frac{d\varphi_k}{dt} = \omega_0 + \frac{\varepsilon}{N} \sum_{j=1}^N \sin(\varphi_j - \varphi_k) + \xi_k(t) \quad \{2.6.2\}$$

Ainsi, dans un repère tournant à la vitesse ω_0 , avec $\phi(t) = \varphi(t) - \omega_0 t$, l'équation {2.6.2} décrivant la variation de la phase devient :

$$\frac{d\phi_k}{dt} = \frac{\varepsilon}{N} \sum_{j=1}^N \sin(\phi_j - \phi_k) + \xi_k(t) \quad \{2.6.3\}$$

Nous réécrivons alors cette équation en utilisant le champ moyen défini en 2.4.1 : $Z = X + iY = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N e^{i\varphi_j} = \rho e^{i\mu}$, ce qui donne :

$$\frac{d\varphi_k}{dt} = \varepsilon (-X \sin \varphi_k + Y \cos \varphi_k) + \xi_k(t) \quad \{2.6.4\}$$

Avec X et Y les parties réelle et imaginaire de Z .

En supposant que la variation du champ moyen Z est lente (comparée à la variation du bruit $\xi_k(t)$), ce terme peut être considéré comme déterministe dans l'équation précédente, qui devient alors l'équation de Langevin d'un oscillateur individuel soumis à un bruit blanc gaussien [71]. Nous pouvons alors en déduire la variation temporelle de la distribution de phase :

$$\frac{\partial P(\varphi, t)}{\partial t} = \varepsilon \frac{\partial}{\partial \varphi} [(X \sin \varphi - Y \cos \varphi) P(\varphi, t)] + \frac{D}{2} \frac{\partial^2 P(\varphi, t)}{\partial \varphi^2} \quad \{2.6.5\}$$

Dans le cadre de la statistique circulaire, cette distribution est, par définition, une fonction 2π périodique de la phase. Comme $Z = X + iY = \rho e^{i\mu}$, alors $X = \rho \cos \mu$, et $Y = \rho \sin \mu$: l'équation suivante peut être réécrite :

$$\frac{\partial P(\varphi, t)}{\partial t} = \varepsilon \frac{\partial}{\partial \varphi} [\rho \sin(\varphi - \mu) P(\varphi, t)] + \frac{D}{2} \frac{\partial^2 P(\varphi, t)}{\partial \varphi^2} \quad \{2.6.6\}$$

L'équation {2.6.6} montre que les oscillateurs sont soumis à deux effets antagonistes : d'une part le couplage, qui tend à synchroniser les oscillateurs, et d'autre part, la diffusion de phase, qui au contraire tend à accroître la largeur de distribution de phases.

Equation de Fokker-Planck stationnaire

L'équation de Fokker-Planck stationnaire s'écrit :

$$\varepsilon \frac{\partial}{\partial \varphi} [\rho \sin(\varphi - \mu) P(\varphi, t)] + \frac{D}{2} \frac{\partial^2 P(\varphi, t)}{\partial \varphi^2} = 0 \quad \{2.6.7\}$$

En intégrant une fois cette équation par rapport à φ , nous pouvons en déduire que :

$$\varepsilon \rho \sin(\varphi - \mu) P(\varphi, t) + \frac{D}{2} \frac{\partial P(\varphi, t)}{\partial \varphi} = C_1 \quad \{2.6.8\}$$

où C_1 est une constante.

Posons :

$$k_S = \frac{2\rho\varepsilon}{D} \quad \{2.6.9\}$$

Nous substituons dans {2.6.8} :

$$k_S \sin(\varphi - \mu) d\varphi = -\frac{dP}{P} \quad \{2.6.10\}$$

Ce qui donne $P(\varphi) = C_2 e^{k_S \cos(\varphi - \mu)}$, où C_2 est une constante.

Afin de trouver la solution complète de {2.6.8}, nous cherchons une solution de {2.6.8} ayant la forme : $P(\varphi) = C_2(\varphi) e^{k_S \cos(\varphi - \mu)}$.

D'après ce qui précède, $C_2(\varphi)$ vérifie : $\frac{\partial C_2(\varphi)}{\partial \varphi} = \frac{2C_1}{D} e^{-k_S \cos(\varphi - \mu)}$. Cette équation est intégrée en développant $e^{-k_S \cos(\varphi - \mu)}$ en série de Fourier :

$$e^{-k_S \cos(\varphi - \mu)} = I_0(k_S) + 2 \cdot (-1)^n \sum_{n=1}^{\infty} I_n(k_S) \cos[n(\varphi - \mu)] \quad \{2.6.11\}$$

Ceci permet d'en déduire la densité de probabilité de phase stationnaire :

$$P(\varphi) = \left\{ \frac{2C_1}{D} \left[I_0(k_S) \varphi + 2(-1)^n \sum_{n=1}^{\infty} I_n(k_S) \frac{\sin(n\varphi)}{n} \right] + C_0 \right\} e^{k_S \cos(\varphi - \mu)} \quad \{2.6.12\}$$

Comme $P(\varphi)$ est 2π -périodique, alors $C_1 = 0$, ce qui donne $P(\varphi) = C_0 e^{k_S \cos \varphi}$. Enfin, pour déterminer C_0 , il suffit d'utiliser la condition de normalisation de $P(\varphi)$:

$\int_{-\pi}^{\pi} P(\varphi) d\varphi = 1$, et immédiatement $P(\varphi) = \frac{1}{2\pi I_0(k)} e^{k_S \cos(\varphi - \mu)}$. La distribution de phase stationnaire est une distribution de Von Mises, de phase moyenne μ , et de concentration k_S .

Suivant la valeur de D/ε , une solution stationnaire $k_S \neq 0$ existe ou non. La condition d'existence d'une telle solution stationnaire apparaît en exprimant directement le paramètre d'ordre ρ à partir de la distribution de phase. Par ailleurs (cf. 2.4.2), pour un très grand nombre d'oscillateurs, ρ est relié à la concentration k par : $\rho(k_S) = \frac{I_1(k_S)}{I_0(k_S)}$. En comparant

cette expression avec la substitution {2.6.9}, on aboutit à l'équation : $\rho(k_S) = \frac{D}{2\varepsilon} \cdot k_S = \frac{I_1(k_S)}{I_0(k_S)}$. La résolution graphique de cette équation montre que selon la

valeur du rapport D/ε , une solution $\rho_S \neq 0$ existera ou non. La FIG. 2-10 donne un exemple de résolution pour 3 valeurs du rapport D/ε : 0.5 ; 1 ; et 1.5. Une solution est commune à ces 3 valeurs : $\rho_S = 0, k_S = 0$. Ce régime correspond à une complète désynchronisation des oscillateurs, c'est-à-dire que les phases des oscillateurs sont réparties uniformément sur l'intervalle $[-\pi; \pi[$. Cependant, pour des valeurs $D/\varepsilon < 1$, une solution non nulle existe,

correspondant à l'intersection de la droite $\rho(k) = \frac{D}{2\varepsilon} k$ avec la courbe $\rho(k) = \frac{I_1(k)}{I_0(k)}$. On peut

montrer, en étudiant les effets d'une petite perturbation sur la distribution de phase, que la solution $\rho_S = 0, k_S = 0$ est une solution stable pour les valeurs $D/\varepsilon \geq 1$. Nous allons montrer que ce n'est plus le cas lorsque $D/\varepsilon < 1$.

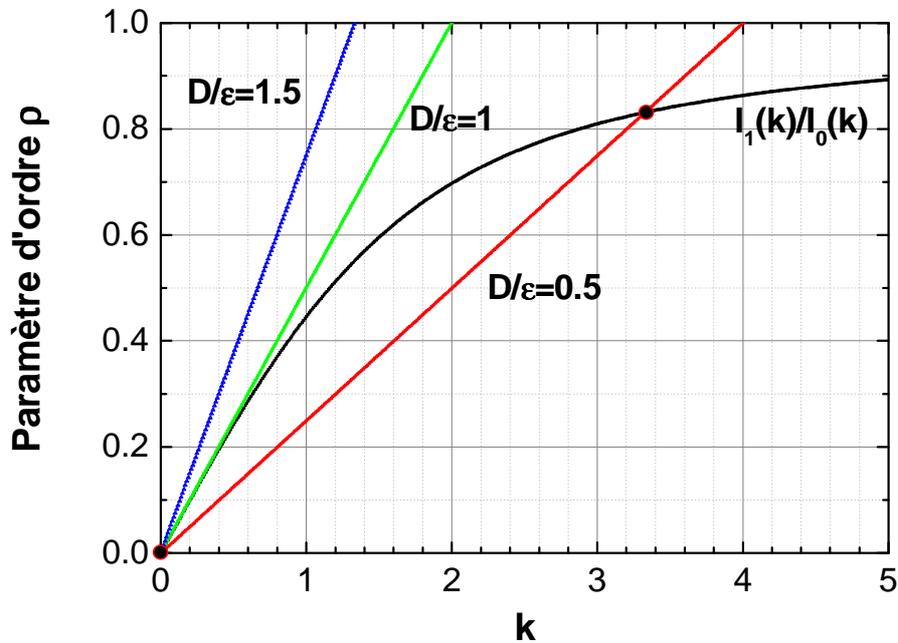


FIG. 2-10 Condition d'existence d'une solution stationnaire de l'équation de Fokker-Planck, exemple de résolution graphique de l'équation $A_1(k) = (D/\varepsilon) \cdot (k/2)$ pour 3 valeurs du rapport D/ε : 0.5 ; 1 ; et 1.5. $A_1(k)$ est une courbe dont la pente à l'origine est égale à 0.5. Ainsi, la droite $\rho(k) = (D/\varepsilon) \cdot (k/2)$ n'interceptera la courbe $A_1(k)$ ailleurs qu'à l'origine si sa pente est inférieure à 0.5 ; ce qui donne la condition d'existence d'une solution non nulle de l'équation de Fokker-Planck : $D/\varepsilon < 1$.

Analyse de la stabilité de la solution

Nous cherchons la stabilité des solutions stationnaires en supposant qu'en régime transitoire, les phases sont réparties suivant une distribution de Von Mises, de valeur moyenne $\mu(t)$ et de « concentration » $k(t)$ dépendant du temps (cf. le paragraphe suivant pour la justification). A partir de cette hypothèse et de l'équation de Fokker-Planck non stationnaire {2.6.5}, nous déterminons les équations décrivant la dynamique de $\mu(t)$ et du paramètre d'ordre $\rho(t)$. Pour ce faire, nous multiplions {2.6.6} par $e^{i\varphi}$, et intégrons sur un intervalle de largeur 2π :

$$\begin{aligned}\frac{\partial \rho}{\partial(\varepsilon t)} &= \frac{\rho}{2} \cdot \left(\frac{2\rho}{k} - \frac{D}{\varepsilon} \right) \\ \frac{\partial \mu}{\partial(\varepsilon t)} &= 0\end{aligned}\tag{2.6.13}$$

Suivant ce modèle, la phase moyenne de la distribution est constante au cours du temps : $\mu(t) = \mu(t=0) = \mu^0$. De plus, εt apparaît spontanément comme le temps réduit. De ce fait, hormis les conditions initiales, le rapport D/ε est le seul paramètre influençant l'évolution du paramètre d'ordre.

Connaissant la relation entre $\rho(t)$ et $k(t)$ ($\rho = A_1(k) = I_1(k)/I_0(k)$), nous en déduisons la variation temporelle de la concentration :

$$\frac{\partial k}{\partial(\varepsilon t)} = \frac{A_1(k)}{A_2(k) + 1 - 2A_1^2(k)} \cdot \left(\frac{2A_1(k)}{k} - \frac{D}{\varepsilon} \right)\tag{2.6.14}$$

La FIG. 2-11 montre la résolution graphique de cette équation pour différentes valeurs de D/ε . Pour $D/\varepsilon < 1$, nous retrouvons les 2 solutions stationnaires précédentes : $k_S = 0$, et $k_S = \frac{2\varepsilon \cdot A_1(k_S)}{D}$, qui correspondent aux paramètres d'ordre respectifs $\rho_S = 0$, et $\rho_S = A_1(k_S) = \frac{D \cdot k_S}{2\varepsilon}$. C'est cette dernière solution qui est stable. Pour $D/\varepsilon \geq 1$, la solution $k_S = 0$ est la seule solution stationnaire, et elle est effectivement stable.

Cette description illustre parfaitement la compétition entre les deux effets opposés que sont le couplage entre oscillateurs et la diffusion de phase. Dans le cas d'une diffusion importante, comparée à l'intensité du couplage ($D/\varepsilon > 1$), la diffusion « étale » la distribution de phases $k_S = 0$, l'ordre tend à disparaître au sein de la population ($\rho_S = 0$). A l'inverse, pour un couplage suffisant ($D/\varepsilon < 1$), les phases ne sont plus uniformément dispersées au sein de la population ($k_S \neq 0$) un ordre partiel s'établit ($\rho_S \neq 0$). Pour un couplage infiniment grand devant la diffusion de phase, la solution stationnaire stable correspond à $A_1(k_S)/k_S \rightarrow 0$ avec $k_S \rightarrow \infty$, c'est à dire $\rho_S \rightarrow 1$: les oscillateurs sont parfaitement synchronisés.

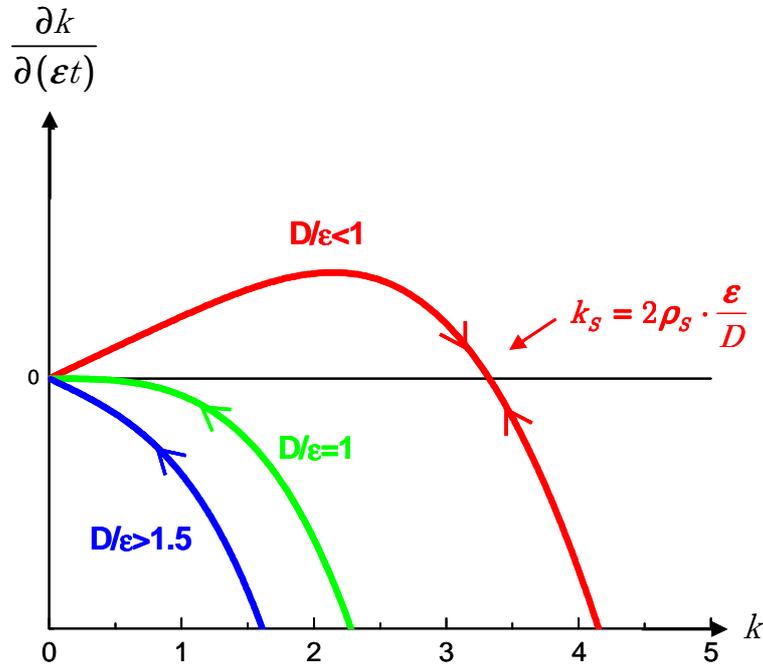


FIG. 2-11 Stabilité des solutions stationnaires de l'équation de Fokker-Planck. Evolution de $\frac{\partial k}{\partial(\epsilon t)}$ en fonction de k , pour des valeurs de D/ϵ inférieures, égales, ou supérieures à 1. Pour $D/\epsilon \geq 1$, il y a une seule solution stationnaire, qui est stable : $\rho_S = 0, k_S = 0$. Pour $D/\epsilon < 1$, il existe 2 solutions stationnaires, dont l'une est instable ($\rho_S = 0, k_S = 0$), et l'autre est stable : c'est la solution non nulle, pour laquelle un ordre partiel s'établit : $k_S \neq 0; \rho_S \neq 0$.

Régime transitoire : Simulation numérique

Pour déterminer l'évolution de la distribution de phase en régime transitoire, nous simulons numériquement les équations {2.6.4} décrivant la dynamique d'un ensemble de N oscillateurs couplés en présence de bruit stochastique.

Nous considérons une population constituée de 500, ou 10000 oscillateurs. Et nous générons une distribution initiale de phases indépendantes de ces oscillateurs, réparties suivant une gaussienne de valeur moyenne nulle, et de déviation standard circulaire $\sigma_0 = 0.9$ rad. A chaque instant, nous pouvons calculer le paramètre d'ordre et la phase moyenne de la distribution, puisque nous connaissons les phases individuelles des oscillateurs. Nous pouvons

ainsi calculer la « concentration » k de la distribution de Von Mises correspondant à ce paramètre d'ordre. La FIG. 2-12a-d montre que la distribution repliée est peu différente de la distribution de Von Mises de même paramètre d'ordre et de même valeur moyenne.

Nous résolvons ensuite numériquement l'équation {2.6.13} pour le paramètre d'ordre, et comparons les résultats obtenus avec le paramètre d'ordre obtenu grâce aux simulations numériques précédentes.

La FIG. 2-12e-f montre l'évolution de la phase moyenne et du paramètre d'ordre en fonction du temps réduit εt pour des rapports D/ε variant de 0.5 à 1.5. Dans le cas d'une population constituée de $N=10000$ oscillateurs, les simulations montrent que la phase moyenne est effectivement constante, et reste égale à 0. Cependant, nous voyons que plus la constante de diffusion est grande, et plus les fluctuations autour de la valeur moyenne sont importantes. Ceci est dû au fait que l'échantillon contient un nombre fini d'oscillateurs, et que donc la valeur moyenne est une variable aléatoire. Pour une population contenant $N=500$ oscillateurs, ces fluctuations sont d'autant plus importantes, puisque l'incertitude sur la détermination de la phase moyenne, varie en $1/\sqrt{N-1}$. Cependant, l'amplitude de ces fluctuations reste suffisamment petite pour que des simulations faites avec 500 oscillateurs restent significatives.

Par ailleurs, concernant le paramètre d'ordre, nous voyons que les évolutions obtenues grâce aux simulations sont en accord avec les résultats de la résolution analytique du système {2.6.13}. Là encore, les fluctuations de $\rho(t)$ sont moins importantes pour des simulations réalisées avec 10000 que pour celles faites avec 500 oscillateurs, mais nous voyons que ces dernières restent en accord avec le modèle simplifié.

La comparaison entre les simulations numériques et la résolution analytique du modèle simplifié nous amène aux conclusions suivantes :

- i. La distribution de phases au sein d'une population d'oscillateurs en interaction peut être approchée par une distribution de Von Mises, de valeur moyenne constante, et de paramètre d'ordre dépendant du temps. Ceci est bien sûr valable pour un choix des paramètres et des conditions initiales particulier, résultant de nos données expérimentales.
- ii. L'évolution du paramètre d'ordre dépend de l'importance relative du couplage et de la diffusion de phase. Un ordre partiel ne peut s'établir qu'à la condition $D/\varepsilon < 1$ (les oscillateurs sont parfaitement synchronisés si $D/\varepsilon \rightarrow 0$).

Les simulations du couplage avec 500 oscillateurs donnent des évolutions fiables des paramètres.

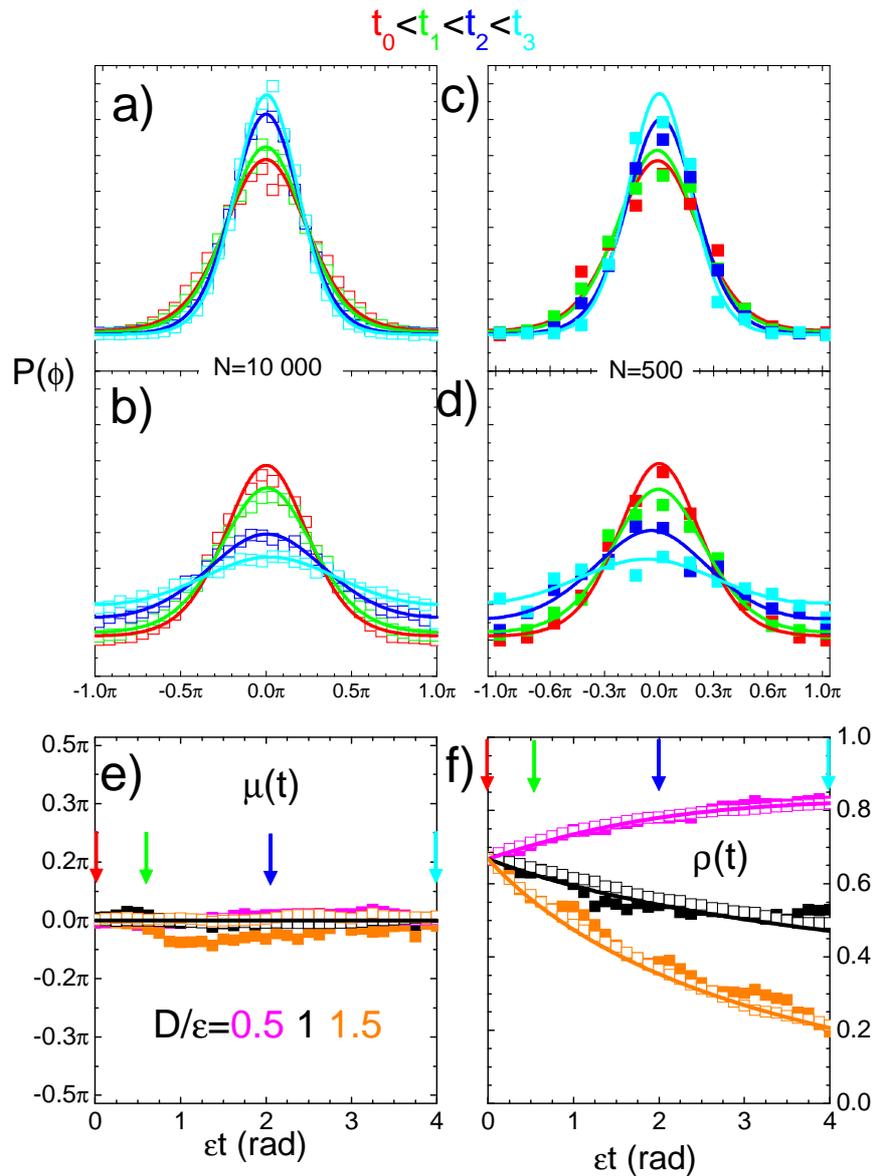


FIG. 2-12 Comparaison entre la résolution analytique de {2.6.13} et les simulations numériques des équations {2.6.3}. Les carrés sont les résultats des simulations numériques, réalisées avec 10000 (carrés vides), ou 500 (carrés pleins) oscillateurs. La distribution initiale de phases au sein des populations à une déviation standard circulaire $\sigma_0 = 0.9$ rad. Nous réalisons les histogrammes de phases à différents instants t_i . **a), b), c), d)** Evolution temporelle de la distribution de phases au sein d'une population d'oscillateurs en interaction avec $\epsilon = 0.2$ rad/jour. Les simulations sont réalisées pour 2 valeurs de D/ϵ : 0.5 (a,c), et 1 (c,d). Les lignes continues sont les distributions de Von Mises dont les paramètres d'ordre et les phases moyennes sont calculés à partir des phases individuelles obtenues via les simulations numériques. **e)** Evolution de la phase moyenne et **f)** du paramètre d'ordre en fonction du temps réduit ϵt . Pour 500 oscillateurs, les fluctuations sur $\mu(t)$ et $\rho(t)$ sont plus importantes que dans le cas où l'on a 10000 oscillateurs, mais donnent des évolutions similaires à celles obtenues par les calculs analytiques (lignes continues de même couleur). Les flèches montrent les instants auxquels les histogrammes sont tracés (même code de couleur).

Chapitre 3

Caractérisation de la bioluminescence des cyanobactéries

Nous allons décrire ici les deux dispositifs expérimentaux que nous avons utilisés pour accéder à l'oscillation circadienne de bioluminescence de la cyanobactérie, en montrant la complémentarité de ces deux techniques. Puis nous caractériserons précisément cette oscillation de bioluminescence, et en particulier, nous nous pencherons sur les facteurs qui peuvent influencer la phase du cycle circadien. Enfin, nous détaillerons précisément les techniques analytiques que nous avons utilisées pour caractériser quantitativement la phase et l'amplitude de l'oscillation circadienne.

3.1 Dispositifs expérimentaux

3.1.1 Croissance et cultures cellulaires

Souches bactériennes

La cyanobactérie *Synechococcus sp. strain* PCC 7942, que nous avons choisie pour notre étude est l'un des organismes les plus simples présentant un comportement circadien [21]. L'utilisation du rapporteur de la luciférase est une méthode qui permet, depuis plus de 10 ans, de suivre l'expression génétique circadienne de populations de cyanobactéries [21, 27]. Le terme « rapporteur » désigne ici des insertions sur deux sites neutres du chromosome de la cyanobactérie des gènes *luxAB* et *luxCDE*, auxquels sont associés des promoteurs de la cyanobactérie. L'émission de lumière (spectre centré sur 490 nm), est le résultat d'une réaction

biochimique catalysée par l'hétérodimère LuxAB, utilisant comme substrat un aldéhyde produit et recyclé par le complexe LuxCDE.

Les deux souches bactériennes luminescentes que nous utilisons pour nos études sont AMC 462 et AMC 412, dont les caractéristiques sont les suivantes [77] :

Souche	Insertion sur le site neutre I	Insertion sur le site neutre II
AMC 462	<i>PkaiBC::luxAB</i>	<i>PpsbAI::luxCDE</i>
AMC 412	<i>PpsbAI::luxAB</i>	<i>PpsbAI::luxCDE</i>

Rappelons que la notation *PkaiBC::luxAB* fait référence aux gènes *luxAB* insérés devant le promoteur du gène *kaiBC*. Les inserts cités dans la table précédente sont, de plus, fusionnés à des gènes résistants à un antibiotique choisi : les insertions sur le site neutre I comportent un gène résistant à la spectinomycine ; et les insertions sur le site neutre II comportent un gène résistant au chloramphénicol.

Pour les 2 souches choisies, les gènes *luxCDE* sont sous le contrôle du *PpsbAI*, qui est le plus fort promoteur de la cyanobactérie. Ceci assure que le substrat (l'aldéhyde) est présent en quantité non limitante pour entretenir la réaction.

Une grande partie de notre étude a été centrée sur la souche AMC 462, puisqu'elle donne accès directement à l'expression du gène clé de l'horloge circadienne *kaiC* (cf. 1.2). Par ailleurs, la souche AMC 412 présente l'avantage d'être la plus fortement luminescente de toutes les souches munies du rapporteur de la luciférase [35] puisque le gène *luxAB* est inséré derrière le promoteur du gène *psbAI*. Nous verrons que cette souche est suffisamment luminescente (émission de ~ 20 photons/minute/bactérie) pour permettre de suivre les oscillations circadiennes de cellules individuelles.

Il faut noter enfin que l'utilisation de la GFP (green fluorescent protein) ou d'autres protéines fluorescentes est moins adaptée à l'étude des cyanobactéries, essentiellement parce que ces dernières sont elles-mêmes fortement fluorescentes sous irradiation lumineuse (FIG. 3-1). Par ailleurs, le métabolisme et l'horloge circadienne sont susceptibles d'être affectés par la forte intensité de lumière nécessaire à l'excitation de la protéine [78]. Enfin, la GFP peut être sujette au photoblanchiment, à cause d'une exposition prolongée à la lumière nécessaire à la croissance cellulaire.

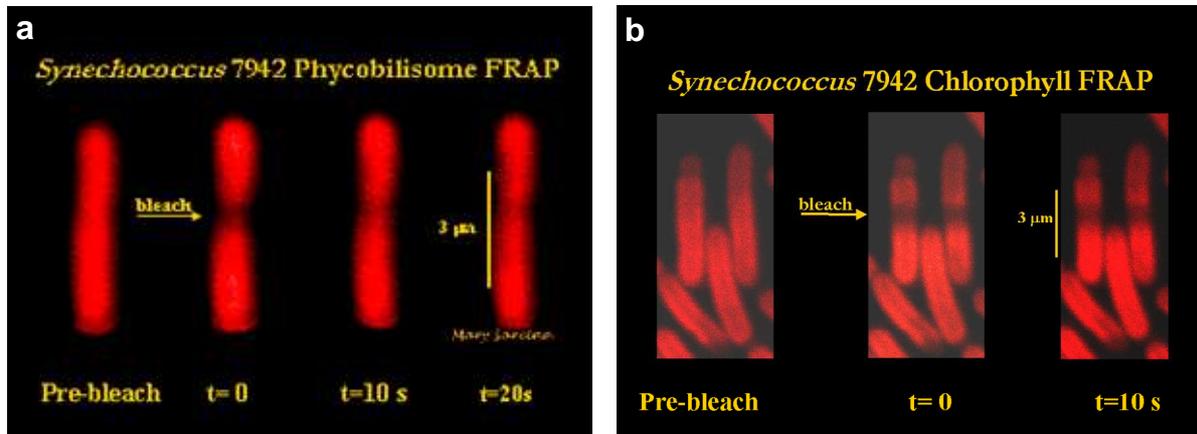


FIG. 3-1 Images de FRAP (redistribution de fluorescence après photoblanchiment) de la cyanobactérie *Synechococcus sp. strain PCC 7942*. a) Les phycobilisomes sont excités à 633 nm. Après le photoblanchiment on observe la diffusion des phycobilisomes dans la bactérie. b) La chlorophylle est excitée à 442 nm, et a une faible mobilité dans la cellule.

(D'après Sarcina, M. <http://srs.dl.ac.uk/VUV/home-page/BIOIMAGING/Recent%20Images.htm>)

Croissance

La contamination est un phénomène indésirable, mais courant, lors des manipulations d'organismes vivants en biologie. Ce terme désigne ici l'invasion des cultures cellulaires étudiées par des microorganismes vivants étrangers. C'est pourquoi, afin d'éviter toute forme de contamination inopinée, nous manipulons les cultures cellulaires sous une hotte à flux laminaire. Les souches peuvent être cultivées dans leur milieu de culture solide ou liquide. La seule différence entre les deux milieux étant l'ajout d'un gélifiant, l'agar, pour le milieu solide. La composition chimique du milieu de culture (FIG. 3-2) est prévue pour apporter aux cellules tous les nutriments nécessaires à leur croissance (hormis le CO₂ et le O₂ indispensables à la respiration et la photosynthèse).

Les cultures en milieu solide sont réalisées dans des boîtes de Pétri, les cellules étant étalées à la surface du milieu avec des pointes en plastique stériles. La boîte de Pétri est ensuite fermée par son couvercle puis scellée avec un film de paraffine pour prévenir toute forme de contamination et d'évaporation.

Puis les cellules ainsi cultivées sont mises à croître en milieu liquide dans des fioles fermées par du papier d'aluminium (FIG. 3-3). Par la suite, nous avons été amenés à mélanger des souches sauvages, et des souches possédant le rapporteur de la luciférase, c'est pourquoi nous réalisons nos cultures liquides en l'absence d'antibiotiques, afin de ne pas détruire les souches qui ne possèdent pas les gènes résistant aux antibiotiques lors de ces mélanges. Les

inserts étant petits, et situés directement sur le chromosome, la bactérie n'a qu'un faible risque de les perdre au cours des divisions cellulaires.

NaNO ₃	1.5 g	H ₃ BO ₃	2.86 g
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0.04 g	MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.81 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.075 g	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.222 g
Citrate ferrique d'ammonium	0.012 g	NaMoO ₄ ·5H ₂ O	0.39 g
EDTA	0.001 g	Cu(SO ₄) ₂ ·5H ₂ O	0.079 g
Na ₂ CO ₃	0.02g	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	49.4 mg
Oligo-éléments	1 ml	Eau désionisée	1.0 litre
Eau désionisée	1 litre		
Agar (si milieu solide)	10.0 g		
spectinomycine (si nécessaire)	5 mg		
chloramphénicol (si nécessaire)	7.5 mg		

Oligo - éléments

FIG. 3-2 Composition chimique du milieu de culture utilisée pour les cyanobactéries

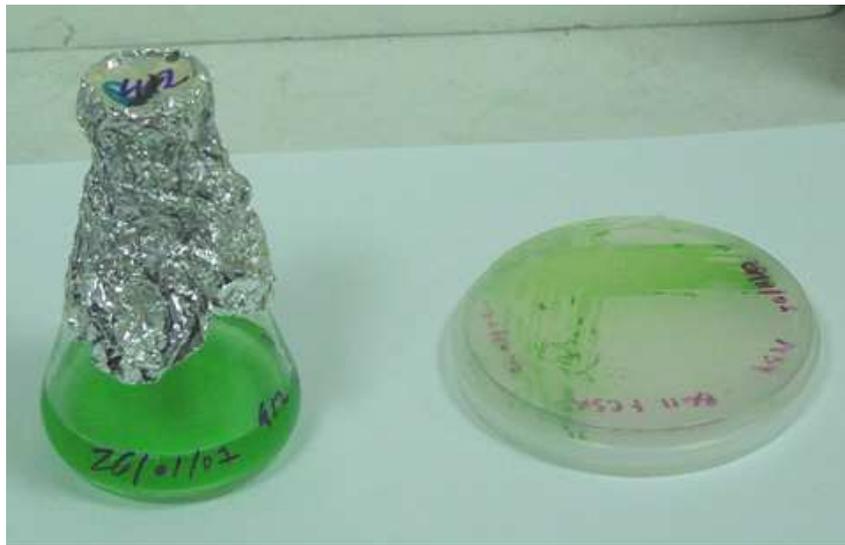


FIG. 3-3 Cultures cellulaires liquide (à gauche), et sur boîte de Pétri (à droite). Les cyanobactéries sont des organismes photosynthétiques, la couleur verte des cultures témoigne d'une bonne croissance cellulaire.

Les cultures sont conservées dans un incubateur, qui est une enceinte isolée de l'environnement externe, optimisée pour permettre la croissance cellulaire, grâce à un contrôle externe de la température, de la lumière et du taux de CO₂ dans l'enceinte. Ainsi, en dehors des périodes d'entraînement, les cultures sont exposées à une lumière blanche constante de 900 lux, à 30°C, et sous un taux de CO₂ de 1400 ppm. Pour les expériences nécessitant des cultures cellulaires entraînées, nous programmons l'incubateur pour qu'il règne dans l'enceinte des conditions périodiques de lumière : les cellules sont ainsi soumises à un cycle de période 24h constitué de 12 heures de « jour » (à 900 lux), suivi de 12 heures d'obscurité complète, la température et le taux de CO₂ étant identiques à ceux sans entraînement.

Les fioles contenant les cultures liquides sont disposées sur une plate-forme rotative, assurant ainsi l'homogénéisation des conditions de croissance (contact avec le milieu, lumière reçue...) de toutes les cellules d'une fiole. Cette enceinte permet ainsi d'assurer, d'une part une croissance cellulaire optimale, et d'autre part un entraînement de toutes les cultures présentes dans l'incubateur à la même phase.

Congélation

Enfin, il nous est possible de conserver à long terme des cultures cellulaires liquides grâce à la congélation : pour ce faire, des cultures liquides sont introduites dans des cryotubes de 2 mL avec 150 $\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$ de glycérol. Le glycérol joue le rôle d'antigel, et permet ainsi d'éviter la formation de cristaux de glace à l'intérieur des cellules. Ce mélange cellules+glycérol est alors conservé dans un congélateur, à une température de -80°C. Par la suite, en cas de besoin, ces cellules sont décongelées, puis diluées environ 5 fois dans du milieu de culture avant d'être mises à croître dans l'incubateur. L'ajout de milieu permet ainsi de diluer le glycérol, et de favoriser la croissance cellulaire. En effet, suite à la décongélation, les cellules n'entrent pas en phase de croissance immédiatement : elles ont une période de « latence » de quelques heures. On ne peut utiliser ces cellules pour nos expériences qu'après un bref séjour dans l'incubateur. Comme les expériences en population sont réalisées avec des cultures de densité optique initiale $DO_{750nm} \approx 0.1$ (3.1.3), nous nous assurons que les cultures congelées ont une concentration $DO_{750nm} > 0.5$ ($DO_{750nm} \approx 1-2$), afin de garantir après dilution, une concentration cellulaire $DO_{750nm} \approx 0.1$.

3.1.2 Mesure de la densité cellulaire de cultures

Grâce à la spectroscopie d'absorption, nous accédons à la densité cellulaire de nos cultures liquides. Les bactéries sont des particules micrométriques, colorées, qui se prêtent donc parfaitement à des mesures d'absorbance. L'absorbance inclut donc ici la diffusion de la lumière par les bactéries, ainsi que l'absorption de la lumière par les chromophores présents dans les cellules.

Détermination de la concentration cellulaire : cellule de numération de *Thoma*

Afin de réaliser une courbe d'étalonnage de la concentration cellulaire en fonction de la densité optique à une longueur d'onde donnée, nous avons besoin d'un échantillon dont nous connaissons la concentration cellulaire. Pour ce faire, nous utilisons une cellule de numération de *Thoma* : cette cellule consiste (FIG. 3-4) en un ensemble de chambres carrées, de 250 μm de côté, divisées en 16 petits carrés de dimension $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ et de 0.1 mm de profondeur. Chaque petit carré a donc un volume $V = 1/4000 \text{ mm}^3$. Une fraction d'échantillon cellulaire est déposée dans cette cellule de numération ; puis nous comptons sous microscope les cyanobactéries présentes dans les petites chambres.

Connaissant le volume des chambres, nous pouvons en déduire la concentration cellulaire de notre culture : $[\text{cellules}] = \frac{N_{\text{cellules}}}{V \cdot N_{\text{chambres}}}$, où N_{cellules} est le nombre total de cellules comptées, et N_{chambres} le nombre total de chambres utilisées pour le comptage des cyanobactéries.

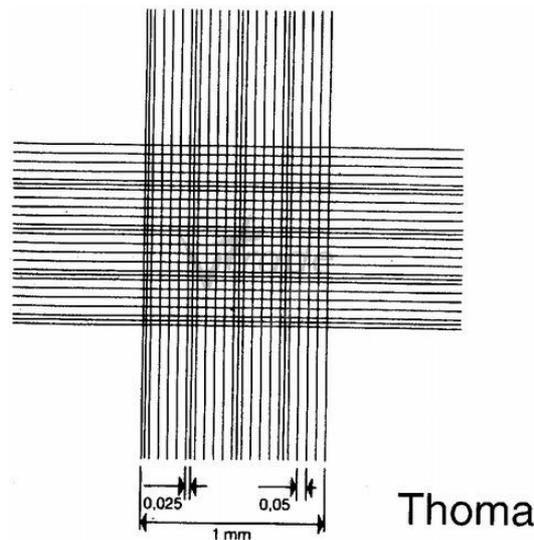


FIG. 3-4 Schéma d'une cellule de numération de Thoma La cellule est constituée de 16 carrés divisés en 16 petites chambres de dimension $50 \times 50 \mu\text{m}^3$ et de 0.1 mm de profondeur. Les cyanobactéries sont déposées dans les chambres, puis comptées sous microscope.

(D'après Jaspar, X., <http://www.vtrade.be/fr/base/shop/article.php?id=8078>)

Spectre d'absorption d'un échantillon de concentration cellulaire connue

Nous utilisons un spectrophotomètre *Perkin Elmer Lambda 9* pour faire ces mesures d'absorption, l'intensité transmise par la culture est donnée par l'expression (loi de Beer-Lambert) :

$$I(\lambda) = I_0 e^{-\sigma_\lambda \cdot L \cdot C} \quad \{3.1.1\}$$

Où I_0 est l'intensité du faisceau monochromatique incident,

σ_λ la section efficace d'absorption d'une cellule à la longueur d'onde λ ,

L la longueur du trajet optique,

et C la concentration cellulaire de la culture étudiée.

La densité optique (ou absorbance) à la longueur d'onde λ s'exprime alors :

$$DO_\lambda = -\log\left(\frac{I_0}{I}\right) \quad \{3.1.2\}$$

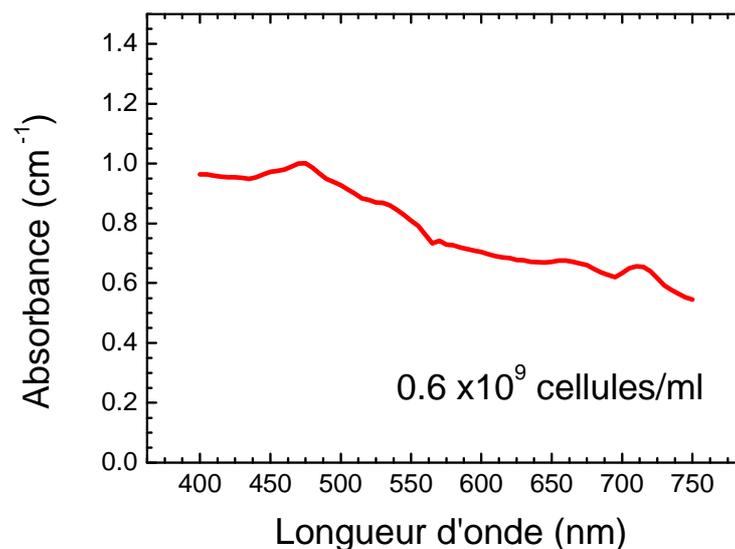


FIG. 3-5 Spectres d'absorption dans le visible d'une culture de cyanobactérie contenant $0.6 \cdot 10^9$ cellules/ml.

Dans ce domaine de longueur d'onde, l'absorbance est due aux principaux pigments présents dans la cyanobactérie : la chlorophylle a, les caroténoïdes, et les phycobillines. Au-delà de 700 nm, pour une culture de cyanobactéries, l'atténuation de la lumière transmise est principalement due à la diffusion des ondes par les cellules.

Nous réalisons dans un premier temps le spectre d'absorption dans le visible d'une culture de concentration cellulaire égale à $0.6 \cdot 10^9$ cellules/mL (FIG. 3-5a).

Dans ce domaine de longueur d'onde, l'atténuation du faisceau transmis est due à la diffusion de la lumière par les cellules, et à la présence de pigments dans la bactérie : la chlorophylle a, les caroténoïdes, et les phycobillines [79]. Cependant, la proportion de ces chromophores varie en fonction de l'état métabolique des cellules. C'est pourquoi, pour déterminer précisément la concentration d'une culture cellulaire à partir de sa densité optique, il vaut mieux se placer dans une gamme de longueur où l'absorption des colorants est minimale. Ainsi, l'atténuation du faisceau n'est due qu'à la diffusion de la lumière par les particules, indépendamment de leur état métabolique. C'est pourquoi, pour déterminer la concentration cellulaire d'une culture de bactéries, nous effectuons les mesures de densités optiques à la longueur d'onde $\lambda = 750$ nm .

Détermination de la concentration cellulaire à partir de la densité optique d'une culture

Afin d'établir l'évolution de la densité optique en fonction de la concentration, nous diluons un échantillon cellulaire et mesurons l'absorption à 750 nm pour chaque échantillon dilué. Ainsi, connaissant la concentration cellulaire d'un des échantillons dilués, et les facteurs des différentes dilutions effectuées, nous pouvons en déduire la courbe reliant la densité optique à 750 nm à la concentration cellulaire (FIG. 3-6).

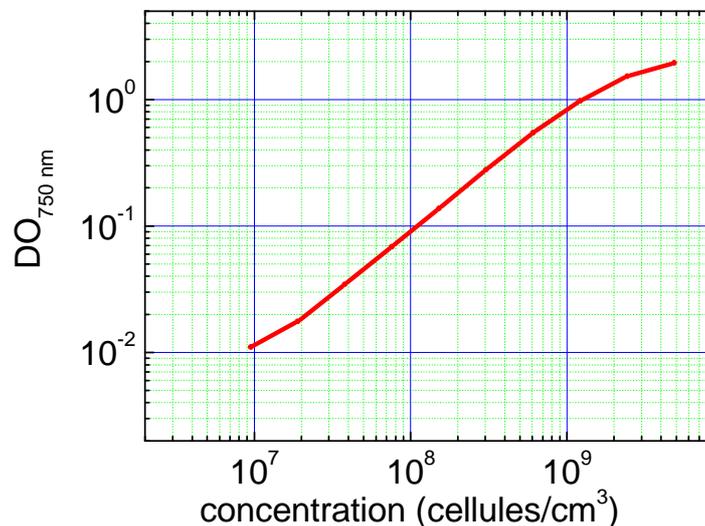


FIG. 3-6 Densité optique en fonction de la concentration cellulaire. Un échantillon de concentration connue est dilué à différents facteurs de dilution connus ; puis la densité optique à 750 nm est mesurée. L'absorption évolue linéairement avec la concentration cellulaire pour des densités inférieures à 0.5.

Pour une densité optique $DO_{750nm} < 0.5$, l'absorption augmente linéairement avec la concentration cellulaire. Ainsi, pour toutes les expériences ultérieures, une mesure de la densité optique à 750 nm permettra d'estimer la concentration de la culture correspondante.

Par ailleurs, nous verrons en 3.2.1 qu'il est utile de connaître le coefficient d'absorption des cyanobactéries à 550 nm ; la loi de Beer-Lambert {3.1.1} donne un accès direct à ce coefficient : $\sigma_\lambda = \frac{DO_\lambda}{l \cdot [\text{cellules}]}$. La mesure de la densité optique à 550 nm (FIG. 3-5b) de la

culture cellulaire de concentration $0.6 \cdot 10^9$ cellules/mL permet de calculer cette section efficace d'absorption : $\sigma_{550nm} \approx 1.6 \cdot 10^{-9}$ cm². A titre de comparaison, on peut remarquer que la surface d'une cyanobactérie est $S_{cell} = 1.5 \times 5 \mu\text{m}^2 = 7.5 \cdot 10^{-8}$ cm². Ce qui signifie que à cette longueur d'onde, seuls 1/50 des photons reçus sont détectés par les cellules.

3.1.3 Acquisition de la bioluminescence d'une population d'oscillateurs

Le suivi de la bioluminescence d'une population de cyanobactéries est effectué grâce à un compteur de luminescence pour microplaques de 96 puits Packard TopCount NXT. Ce compteur est constitué de 3 parties principales (FIG. 3-7a) : *i*) le module comprenant les 2 photomultiplicateurs, permettant ainsi le comptage de 2 puits simultanément ; *ii*) un ordinateur permettant de contrôler les options de comptage, et de faire l'acquisition du nombre de photons comptés en temps réel ; *iii*) la zone de chargement des microplaques.

La chambre de croissance

Nous avons installé autour de la zone de chargement des microplaques, une boîte isolée thermiquement par de la mousse, afin de créer une chambre de croissance appropriée aux cellules contenues dans les microplaques. La température de cette chambre est fixée à 30°C grâce à une régulation thermique à base de modules à effet Peltier. Nous contrôlons également le taux de CO₂ dans la chambre. Enfin, la chambre est placée sous lumière artificielle blanche, assurant ainsi aux cellules une intensité lumineuse de 900 lux. Tous les paramètres de température, CO₂, et intensité lumineuse sont contrôlés et constants, afin d'éviter toute éventualité d'entraînement par des variations circadiennes de l'environnement externe.

Les microplaques

Il existe différents types de microplaques permettant le comptage de la bioluminescence. Celles que nous choisissons pour nos mesures sont blanches, ce qui limite l'absorption par les plaques des photons provenant de la bioluminescence. Les plaques sont composées de 96 puits identiques, de 1 cm de profondeur, et de volume 300 μl .

La lecture de la bioluminescence est effectuée par un couple de photomultiplicateurs se plaçant au dessus des puits, la cellule photosensible ayant une forme circulaire de même

dimension que celle des puits. Il se peut que lors du comptage des photons d'un puits donné, les photons provenant des puits adjacents soient aussi détectés par le photomultiplicateur ; on parle alors de « cross-talk ».

Les microplaques choisies permettent de limiter ce phénomène, grâce à un écart suffisant entre deux puits voisins. En outre, lorsque sur une même plaque, se trouvent des cultures émettant des intensités de bioluminescence d'ordres de grandeurs différents, nous séparons les puits contenant les cultures par des puits vides. La FIG. 3-7b montre un exemple de plaque dont les 16 puits de gauche contiennent des cultures fortement luminescentes. Les 8 puits vides assurent que pour le reste de la plaque (contenant des souches émettant ici 20 fois moins de photons), et en particulier pour la 4^{ème} colonne de gauche, les photons détectés par les photomultiplicateurs ne proviennent pas des cultures fortement luminescentes voisines.

Préparation des échantillons

Les puits de chaque microplaque sont emplis de 250 μl de cellules, à une $DO_{750\text{nm}} = 0.1$, soit environ 3.10^7 cellules/puits (ce choix de DO est justifiée 3.2.2). La chambre de croissance dans laquelle les plaques séjournent n'est pas stérile, et nous devons par conséquent recouvrir les puits afin de réduire les risques de contamination. La présence de lumière, de CO_2 et de O_2 étant indispensable à la bonne croissance cellulaire, nous les scellons à l'aide d'un film adhésif plastique transparent, perforé manuellement au dessus de chaque puits à l'aide d'un bistouri stérile. Il existe des films transparents perméables aux gaz, mais une expérience nous a montré que, avec ce type de film, l'apport en gaz n'était pas suffisant, puisque les cellules ont péri après seulement quelques jours en plaques.

Acquisition de la bioluminescence

Toutes les 30 minutes environ, la plaque est automatiquement transférée dans la chambre noire contenant les photomultiplicateurs ; puis un délai de 2 minutes est programmé avant que sa luminescence ne soit lue par les photomultiplicateurs. Ce délai permet d'éviter que les photons parasites - dus à la phosphorescence et aux chromophores cellulaires - soient pris en compte. Chaque photomultiplicateur lit au total la moitié de la plaque (48 puits), durant 5 sec/puits, ce qui fait un total de 4 minutes/plaque. Les perturbations que subissent les cellules dans la plaque ont donc une durée de l'ordre de 7 minutes ; cette durée est minime comparée à la période d'oscillation des cellules (~ 24 h), ce qui nous assure que cette méthode d'acquisition de la bioluminescence n'influe pas sur la phase de l'oscillation circadienne des cyanobactéries. Le bruit de fond du comptage des photons est estimé en mesurant la bioluminescence de puits ne contenant que du milieu de culture ; on l'estime à environ 173 coups par tranche de 5 secondes de comptage. Par la suite, toutes les courbes de bioluminescence seront présentées avec cette valeur de bruit de fond déjà soustraite (FIG. 3-8).

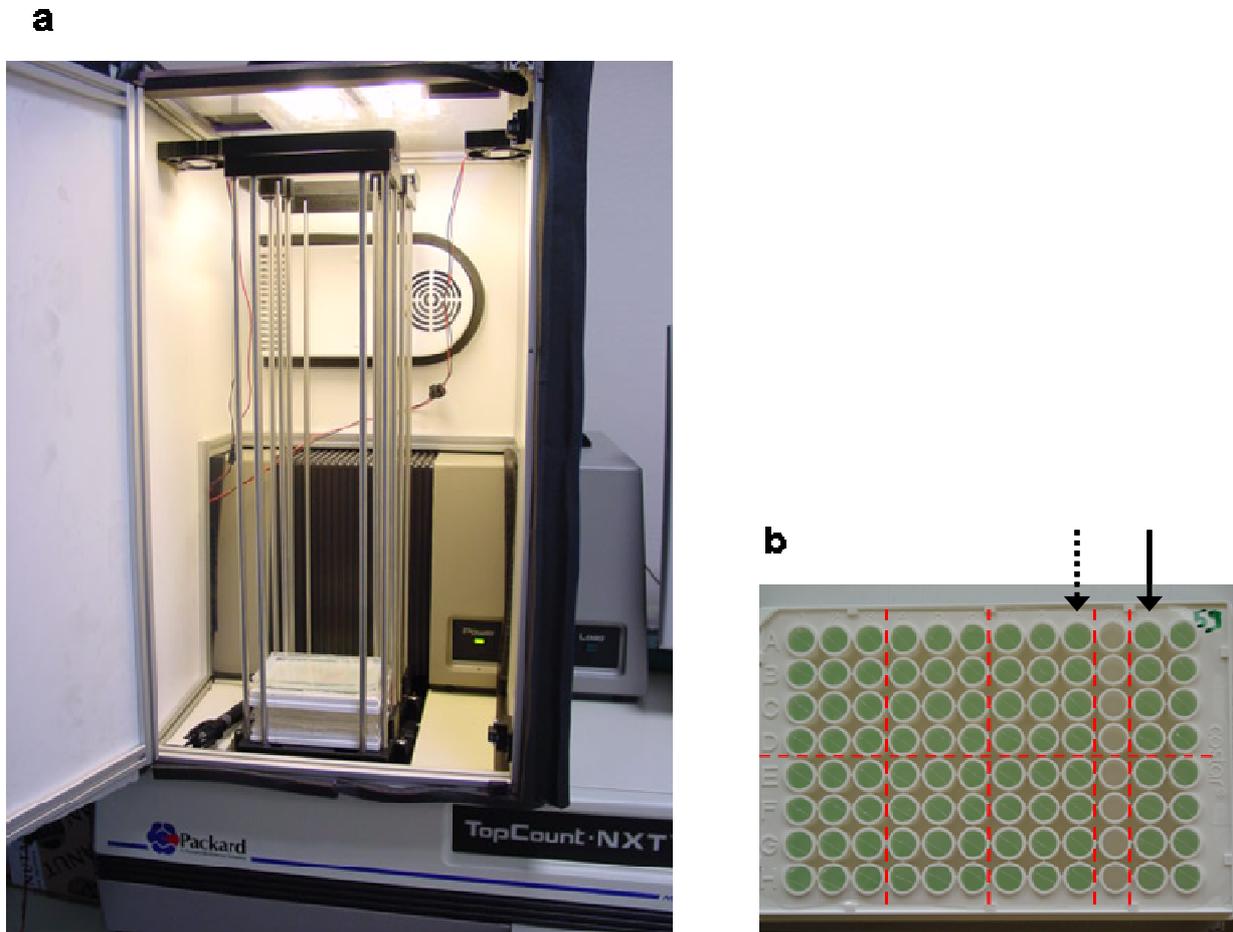


FIG. 3-7 Dispositif expérimental permettant le suivi de la bioluminescence en population. **a)** La zone de chargement des plaques, est située au 1^{er} plan. Le module comportant les 2 photomultiplicateurs se trouve au second plan. Une chambre de croissance (boîte entourant la zone de chargement) complète ce dispositif ; elle est constituée d'une boîte permettant d'isoler de l'environnement extérieur les plaques stockées dans la zone de chargement. Afin d'assurer une croissance optimale des cellules des plaques, en évitant tout entraînement indésirable, nous régulons la lumière, la température et le taux de CO₂ dans la chambre afin que tous ces paramètres soient constants (resp. 900 lux, 30°C, 1400 ppm) **b)** 250 microlitres de culture sont disposés dans chacun des 96 puits constituant la microplaque. La plaque est alors installée dans la zone de chargement ; le passage dans la chambre contenant les photomultiplicateurs est automatisé. Les photons sont comptés pendant 5 secondes/puits. Quand la lecture de la plaque est achevée, celle-ci est renvoyée dans la zone de chargement. La bioluminescence est comptée toutes les 30 minutes. Les pointillés rouges montrent l'organisation spatiale de la plaque. Au sein de chacun des groupes délimités par les pointillés, les puits contiennent des cultures cellulaires strictement identiques (en terme de concentration, d'entraînement, de choix de la souche...). Sur une même plaque, il est donc possible de réaliser 8 à 10 séries de mesures différentes. Sur cette plaque, la 3^{ème} colonne de droite est vide, et permet d'éviter le « crosstalk », entre les puits contenant des cultures fortement lumineuses (colonne désignée par une flèche pleine), et les puits faiblement émetteurs de photons (flèche pointillée).

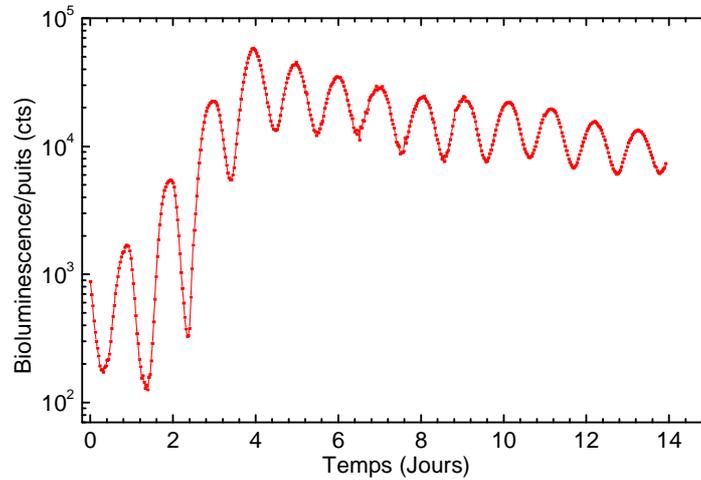


FIG. 3-8 Oscillations de bioluminescence d'un puits contenant 250 μl d'une culture de AMC 462 entraînée de densité optique initiale $DO_{750\text{ nm}} = 0.01$.

Limites du protocole

Nous verrons 4.1.3 que pour des expériences longues (supérieures à une dizaine de jours), nous sommes amenés à compenser l'évaporation du milieu en ajoutant du milieu « frais » dans les puits une fois par semaine. Quand le milieu cellulaire est en partie évaporé dans les puits, nous sortons les plaques de leur chambre de croissance, et après avoir ôté le film plastique les recouvrant, complétons les puits à 250 μl avec du milieu de culture à 30°C. La fin de la préparation est identique à celle expliquée en 3.1.3. les plaques sont scellées, puis le film transparent perforé avant de remettre ces plaques dans leur chambre de croissance. L'ajout du milieu est un procédé qui nécessite une minutie particulière afin de ne pas « casser » le dépôt cellulaire formé dans le fond du puits, et ainsi éviter toute perturbation éventuelle de rythme circadien des cellules.

Nous avons vu que cette technique permet de réaliser sur une même plaque, plusieurs conditions expérimentales. Ainsi, au cours d'une même expérience, nous pouvons suivre par exemple la bioluminescence de cultures entraînés à des phases différentes, ou encore de cultures contenant des mélanges de souches, etc. Mais nous veillons toutefois à conserver initialement 8 à 16 puits par type de condition expérimentale, pour s'assurer de la bonne reproductibilité de nos mesures. Pour une même condition expérimentale, toutes les précautions sont prises pour réaliser des puits strictement identiques. La culture liquide est agitée pour l'homogénéiser avant l'introduction dans chacun des puits ; nous perforons le film plastique au dessus de chaque puits

aussi régulièrement que possible. Cependant, les puits n'ont pas nécessairement une évolution strictement identique pour autant. En effet, ils ne sont pas à l'abri d'une contamination, et la taille des fentes, n'est pas exactement la même pour chacun des puits, ce qui peut engendrer une évaporation plus ou moins rapide du milieu cellulaire, ou une aération insuffisante des cultures. Nous sommes alors souvent amenés à exclure certains puits d'une même condition lors de notre analyse (cf. 3.3.1).

3.1.4 Principe de l'imagerie de cellule unique

Nous avons vu que l'utilisation de souches de cyanobactéries dotées du rapporteur de la luciférase constitue une méthode efficace pour accéder au rythme circadien d'une population de cellules. Néanmoins, l'étude d'un oscillateur individuel, c'est-à-dire d'une bactérie, soulève le problème de la limite de la détection. Le plus fort promoteur de la cyanobactérie est *PpsbAI* [27], c'est pourquoi, nous utilisons la souche AMC 412 pour ce genre d'expérience sur cellule unique.

La cyanobactérie étudiée est une cellule d'environ 2-6 μm ; cette petite taille, et le faible nombre de photons émis rendent d'autant plus difficile la détection et l'imagerie de cellule unique. La sensibilité adéquate pour ce type de mesure est obtenue grâce à l'utilisation parallèle d'une caméra CCD extrêmement performante et d'un microscope optique à fort agrandissement (FIG. 3-9).

Nous allons voir plus en détails le type d'échantillons utilisés pour ces expériences, ainsi que le principe de l'acquisition de la bioluminescence d'une cellule individuelle.

Préparation de l'échantillon

La difficulté principale réside dans la préparation d'un échantillon dans lequel les cellules sont immobiles, afin de rendre possible un suivi des oscillations de bioluminescence sur plusieurs jours. Les échantillons sont constitués (FIG. 3-9) d'une boîte de Pétri de 50×10 mm solidaire d'une lamelle de 0.11 ± 0.02 mm, sur laquelle sont déposés 2 à 3 μl de cellules. Les cellules sont recouvertes de 100 μl d'un gel constitué d'agarose à 3% dans du milieu de culture. L'agarose utilisé fond à basse température (inférieure à 65°C), et se gélifie autour de 26-30°C. Ce gel a pour but de « figer » les cellules, puisque l'immobilité des cellules est une condition capitale dans l'acquisition correcte des images. L'ensemble est alors immédiatement recouvert d'une membrane en cellulose perméable aux gaz, le tout scellé grâce à de la paraffine, permettant une étanchéité parfaite de l'ensemble. Enfin, la boîte de Pétri est remplie de milieu de culture puis close. L'échantillon est installé sous le microscope (FIG. 3-10) dans une chambre munie d'un système de régulation thermique à base de modules à effet Peltier, permettant de fixer la température à 30 ± 0.1 °C.

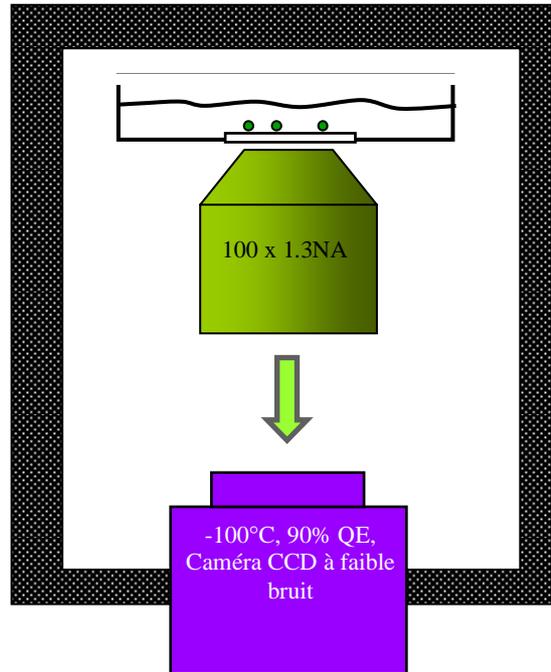


FIG. 3-10 Détection et imagerie de cellules individuelles : La boîte de Pétri contenant les cellules est placée dans une chambre régulée à 30°C, sous éclairage constant de 500 lux (excepté lors de l'acquisition de images en contraste de phase et de bioluminescence). Le microscope est à objectif inversé.

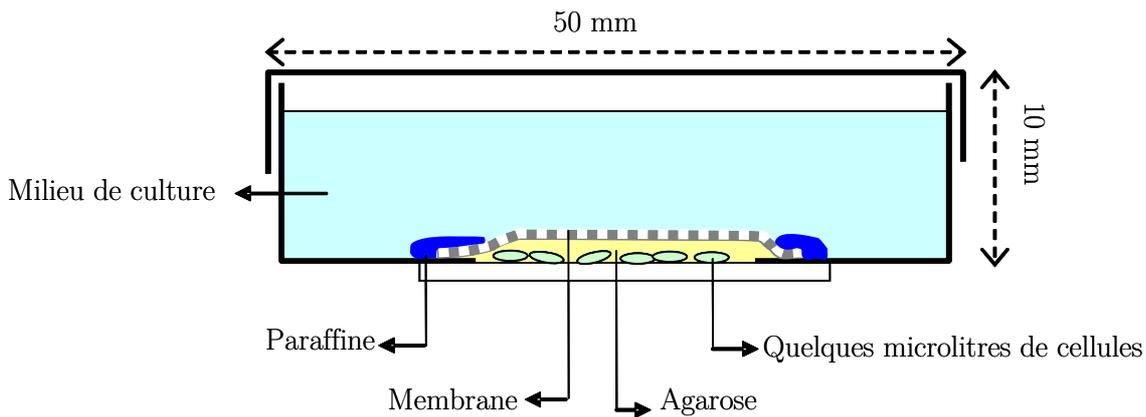


FIG. 3-9 Echantillon destiné à la microscopie de bioluminescence : quelques microlitres de cellules (soient environ 10^6 cellules) sont déposés sur une lamelle de microscope d'épaisseur 0.11 ± 0.02 mm (solidaire de la cuve), puis figés grâce à un gel d'agarose. Le gel est alors recouvert d'une membrane perméable. L'ensemble est ensuite scellé par de la paraffine, afin d'assurer une étanchéité parfaite de l'échantillon, puis recouvert par le milieu de culture.

Limites et précautions spéciales

L'immobilité relative des cellules sur l'échantillon est l'étape indispensable à l'obtention d'images en contraste de phase et de bioluminescence significatives. Il s'agit de trouver le bon compromis entre des cellules suffisamment fixes pour une bonne acquisition de la bioluminescence, et un mouvement minimum, qui permette une croissance bidimensionnelle. En effet, dans le cas extrême où les cellules sont extrêmement figées, du fait des tensions, la croissance a lieu en 3 dimensions.

A priori, le gel d'agarose garantit cette immobilité, mais si une bulle d'air ou de milieu liquide s'introduit malencontreusement sous la membrane, les cellules se mettent à « nager » et l'échantillon devient inexploitable.

Par ailleurs, nous avons vu que l'agarose utilisé gélifie autour de 25-30°C. Afin d'éviter un choc thermique important aux cellules déposées sur la lamelle, il faut éviter de déposer de l'agarose trop chaud sur les cellules. La marge de température est donc limitée, pour déposer l'agarose encore liquide, mais à une température ne perturbant pas (ou très peu) le métabolisme cellulaire.

Une fois que nous avons réalisé un échantillon dans lequel les cellules sont figées, le choix de l'emplacement de l'objectif du microscope en dessous de l'échantillon est guidé par la recherche d'un endroit où les cellules sont toutes dans le même plan. Ceci permet d'obtenir une image nette de l'ensemble des cellules en les plaçant dans le plan focal du microscope. L'idéal est donc que lors des divisions cellulaires ultérieures, les microcolonies poussent en 2 dimensions. C'est le cas jusqu'à environ 4-5 divisions cellulaires. Mais au-delà, il arrive souvent que les cellules poussent en multicouches, c'est-à-dire en 3 dimensions ; dans ce cas, les cellules situées dans les plans supérieurs ne sont plus dans le plan focal du microscope, et la bioluminescence émise ne peut être exploitée (cf. 3.3.2 pour plus de précisions). Nous avons donc tout intérêt à limiter la croissance des microcolonies, ce qui ne perturbe pas le cycle circadien, puisque celui-ci est indépendant du cycle de division cellulaire ([31], §1.2.3). Nous verrons aussi en 3.3.2 que c'est essentiellement ce phénomène de croissance à 3 dimensions qui impose une limite temporelle de 1 à 2 semaines aux expériences sur cellule individuelle.

Acquisition de la bioluminescence

La caméra CCD que nous utilisons a une puce de 1340×1300 pixels, chacun mesurant 20×20 μm^2 . Elle est refroidie à -100°C, et a un rendement quantique, dans le domaine des longueurs d'onde de la luciférase, égal à 90%. (Roper Scientific-Princeton Instruments Camera CT 1300B Cryotiger). Cette caméra présente un bruit électronique extrêmement faible : le courant d'obscurité est inférieur à 1 électron/pixel/heure, et le bruit de lecture de l'ordre de 2 électrons/pixel. L'imagerie des cyanobactéries est réalisée grâce à un microscope optique Zeiss Axiovert 200, muni d'un objectif à immersion à huile, d'agrandissement $\times 100$, d'ouverture numérique égale à 1.3.

L'acquisition par la caméra CCD des photons provenant de la bioluminescence nécessite une chambre parfaitement obscure afin que seul le signal provenant des cyanobactéries soit détecté. C'est pourquoi l'intérieur de la chambre est recouvert de mousse noire (ce qui optimise en même temps l'isolation thermique).

L'acquisition des images, la mise au plan focal, et le contrôle de l'éclairage sont entièrement automatisés. La mise au point du microscope est assurée grâce à l'acquisition d'une dizaine d'images en contraste de phase, en champ clair. Pour chacune de ces images, l'échantillon est exposé durant 150 ms à une intensité lumineuse réduite. Chaque mise au point dure environ 1 minute.

Avant de faire l'acquisition de la bioluminescence, les cellules sont mises dans le noir pendant 2 minutes, afin d'éviter la phosphorescence des chromophores intracellulaires. En outre, les cyanobactéries émettant un nombre relativement faible de photons (10 à 20 photons/min/bactérie [10]), nous choisissons ensuite d'intégrer la bioluminescence sur 30 minutes, afin de maximiser le rapport signal sur bruit sans que cela n'influe sur la phase de l'oscillation circadienne. Le comptage des photons par la caméra se fait en regroupant les pixels 3 par 3, afin de diminuer le bruit de lecture de la caméra.

A la fin de l'acquisition, et pour assurer la croissance cellulaire, l'échantillon est exposé pendant 60 minutes à la lumière provenant d'un anneau lumineux composé de diodes électroluminescentes blanches. L'intensité lumineuse émise par l'anneau est réglable, et nous la fixons à 500 lux, afin d'éviter une croissance cellulaire trop rapide. Au terme de ces 60 minutes, un nouveau cycle d'acquisition (mise au plan focal de l'échantillon+acquisition de la bioluminescence) d'environ 35 minutes se répète, et ainsi de suite. La FIG. 3-11 montre les images en contraste de phase et en bioluminescence obtenues après 3 jours d'expérience. Au cours du temps, on observe (FIG. 3-11a) la croissance de la microcolonie initiale, ainsi que les oscillations de bioluminescence correspondantes (FIG. 3-11b).

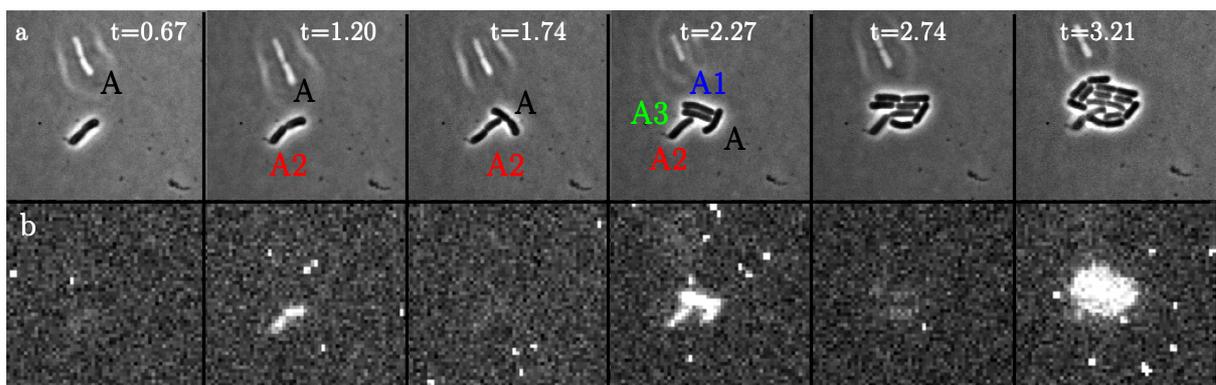


FIG. 3-11 Oscillations circadiennes de bioluminescence observées sur des cyanobactéries individuelles :
a) Images en contraste de phase d'une colonie de cellules prises à différentes dates t (le temps est indiqué en jours) et **b)** Images de la bioluminescence correspondante. Afin d'améliorer le rapport signal/bruit, les pixels sont groupés 3 par 3 avant l'acquisition des images de bioluminescence.

L'exploitation de ces images (3.3.2) permet d'extraire pour les cellules de chaque colonie l'oscillation moyenne de bioluminescence. La FIG. 3-12a montre les oscillations circadiennes obtenues pour la colonie présentée FIG. 3-11 : nous retrouvons bien la synchronisation de l'ensemble des cellules issues d'une même colonie [10].

La FIG. 3-12b montre les oscillations de cellules individuelles de AMC 462 (dont le gène *luxAB* est cette fois derrière le promoteur de l'opéron *KaiBC*) ; l'intensité de bioluminescence émise par les cellules est plus faible, puisque le promoteur *PkaiBC* est moins fort que *PpsbAI*. Nous atteignons ici un seuil de détection de cette méthode d'acquisition de la bioluminescence. Pour ces cellules qui émettent environ 4 photons/cellule/minute, l'imagerie de bioluminescence devient difficile.

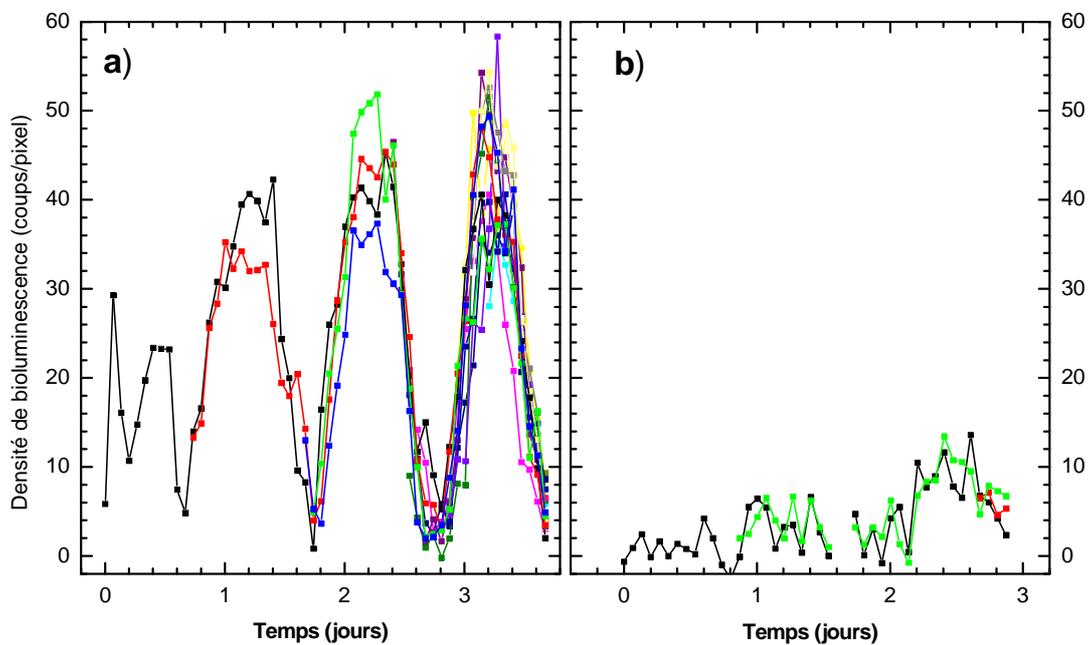


FIG. 3-12 Oscillations de bioluminescence de cellules individuelles. **a)** Pour des cellules de la souche AMC 412. Oscillations de bioluminescence moyenne d'une première cellule (courbe noire) et l'ensemble de sa descendance ; chaque couleur se référant à une cellule de la colonie étudiée. On retrouve bien la synchronisation de toutes les cellules issues d'une même colonie. **b)** Bioluminescence de cellules individuelles de la souche AMC 462. Le signal est moins intense, le rapport signal/bruit est moins bon que pour la souche AMC 412 et les oscillations n'apparaissent pas clairement sur le graphique.

Cependant, nous connaissons le rôle fondamental que tient la protéine KaiC dans le fonctionnement du rythme circadien chez notre cyanobactérie, c'est pourquoi nous nous sommes

penchés aussi sur l'étude de l'oscillation circadienne de la souche AMC 462. Pour cette souche, nous ne pouvons pas faire d'étude sur cellule individuelle, car outre le faible rapport signal sur bruit, se pose le problème de la limite temporelle de ces expériences. Nous verrons en effet (4.1) que l'investigation du couplage entre oscillateurs nécessite de suivre l'évolution temporelle de la bioluminescence sur plusieurs semaines. Cependant, nous venons de voir que par cette technique de microscopie, une étude de la bioluminescence à long terme (supérieure à une quinzaine de jour) est inenvisageable. C'est pourquoi, avons dû nous limiter (comme c'est le cas de la plupart des études déjà réalisées), à l'étude du cycle circadien d'une population entière d'oscillateurs.

Nous venons de voir deux techniques complémentaires d'acquisition de l'oscillation circadienne de bioluminescence chez notre cyanobactérie. Nous allons à présent caractériser ces oscillations de bioluminescence, en nous intéressant dans un premier temps à la sensibilité de l'oscillateur circadien aux conditions externes d'éclairage. Puis nous nous pencherons sur l'étude de quelques facteurs externes pouvant affecter la phase des oscillateurs cyanobactériens. Enfin, nous caractériserons la largeur de distribution de phases au sein d'une assemblée d'oscillateurs.

3.2 Bioluminescence d'une population de cyanobactéries

3.2.1 Intensité de bioluminescence émise par un puits

Nous avons présenté dans la partie 3.1.3 une méthode permettant de suivre l'évolution temporelle des oscillations de bioluminescence d'une population entière d'oscillateurs. Dans cette partie, nous allons décrire quantitativement le signal de bioluminescence détecté par les photomultiplicateurs au-dessus des puits.

Les cyanobactéries sont des organismes photosynthétiques. La présence de lumière est donc indispensable pour assurer une croissance cellulaire. Les cellules contiennent des pigments leur permettant de capturer les photons dans une large gamme spectrale, depuis le proche ultraviolet, jusqu'à l'infrarouge [79]. Ainsi, le calcul de la quantité de photons émise par un puits n'est pas trivial, puisqu'il faut tenir compte du caractère absorbant de l'ensemble des cellules. Pour effectuer ce calcul, nous nous plaçons dans le cas général d'un puits contenant un mélange de cellules émettrices et non émettrices de photons (donc respectivement porteuses et non porteuses du gène rapporteur de la luciférase).

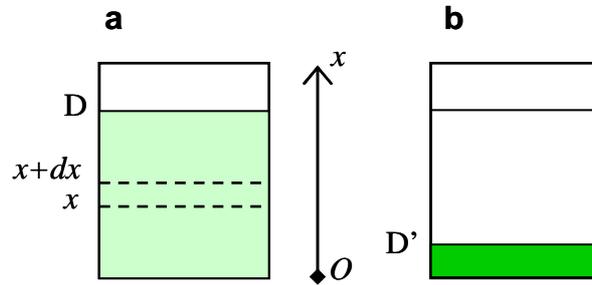


FIG. 3-13 Schématisation d'un puits d'une plaque, a) contenant une hauteur D de cellules réparties uniformément dans le puits, i.e. pendant les 2-3 premiers jours de l'expérience. **b)** Les cellules sédimentent au fond du puits en une couche de hauteur D' concentrée, après quelques jours passés dans le puits.

Soit $n_E(t)$ la concentration volumique absolue de cellules émettrices, et $s_i(t)$ le signal émis par chaque cellule i ; la variation de l'intensité lumineuse B à la profondeur x (FIG. 3-13) s'écrit alors:

$$B(x + dx) - B(x) = \frac{1}{S} \sum_{\substack{\text{cellules } i \\ \in [x; x+dx]}} s_i(t) - \alpha \cdot B \cdot dx \quad \{3.2.1\}$$

Où S est la surface d'un puits.

Ou encore :

$$B(x + dx) - B(x) = n_E \cdot dx \cdot \langle s(t) \rangle - \alpha \cdot B \cdot dx \quad \{3.2.2\}$$

Où $\langle s(t) \rangle$ est la valeur moyenne du signal émis par les cellules de la tranche dx , et α le coefficient d'absorption de la culture dans le puits. Nous considérons que ce coefficient est directement proportionnel à la concentration cellulaire totale (puisque les cellules émettrices et non émettrices constituent des centres absorbant du fait de leur pigmentation) : $\alpha = n_T \cdot \sigma_{550nm}$, avec $\sigma_{550nm} \cong 4.10^{-9} \text{ cm}^2$ la section efficace d'absorption à 550 nm.

Nous pouvons ensuite simplifier {3.2.2}:

$$\frac{dB}{dx} = n_E \cdot \langle s(t) \rangle - \alpha \cdot B \quad \{3.2.3\}$$

Pour estimer $\langle s(t) \rangle$, il faut prendre en compte le fait que la bioluminescence émise par une cellule i , $s_i(t)$, dépend de ses ressources énergétiques, comme par exemple la lumière ou les nutriments. Les cellules situées au fond d'un puits reçoivent moins de lumière que celles situées à la surface, et vont donc émettre moins de photons. D'autre part, la quantité de lumière reçue par les cellules influe également sur la phase de l'horloge circadienne, mais dans une moindre mesure, comme nous le verrons dans 3.2.3. Par conséquent, nous pouvons écrire le signal de bioluminescence émis par une cellule en dissociant l'oscillation circadienne proprement dite du gain g du rapporteur : $s_i(t) = g \cdot y_j(t)$, avec $y_j(t) = 1 + b \cos(\omega_0 t + \varphi_j)$. Nous supposons que le gain du rapporteur augmente linéairement avec l'intensité lumineuse externe reçue (cf. 3.2.3), laquelle varie exponentiellement avec la profondeur (loi de Beer-Lambert). L'équation {3.2.3} devient alors :

$$\frac{dB}{dx} = n_E \cdot g_0 \cdot \langle y(t) \rangle \cdot e^{\alpha(x-D)} - \alpha \cdot B \quad \{3.2.4\}$$

Où g_0 est le gain maximum du rapporteur, c'est-à-dire sous éclairage maximal (*i.e.* sur le dessus du puits), et $\langle y(t) \rangle$ est la moyenne du signal purement circadien émis par l'ensemble des cellules. D'après ce que nous avons vu dans la partie 2.4.3 $\langle y(t) \rangle = 1 + b\rho \cos(\omega_0 t + \mu)$, où ρ et μ désignent respectivement le paramètre d'ordre et la valeur moyenne tels qu'ils ont été définis précédemment.

La résolution de {3.2.4} donne : $B(x) = \frac{n_E \cdot g_0}{2\alpha} \langle y(t) \rangle e^{\alpha(x-D)} (1 - e^{-2\alpha x})$. Ainsi, le nombre total de photons détectés à la surface du puits est :

$$I_{biol}(t) = B(x=D) \cdot S \cdot \tau = \frac{n_E}{n_T} g_0 \cdot \langle y(t) \rangle \cdot \frac{S \cdot \tau}{2\sigma_{550\text{ nm}}} (1 - e^{-2\alpha D}) \quad \{3.2.5\}$$

Où τ est le temps de lecture d'un photomultiplicateur.

Cette expression permet de distinguer 2 régimes de détection des photons à la surface du puits :

Pour un puits de faible absorption ($2\alpha D \ll 1$), les photons émis par la totalité des cellules émettrices N_E du puits parviennent à la surface du puits et sont donc comptés par le détecteur, il s'agit d'un régime de détection « en volume ». Dans la limite d'une absorption faible, la bioluminescence détectée à la surface du puits augmente linéairement avec le nombre total de cellules luminescentes :

$$I_{biol}(t) = n_E \cdot S \cdot D \cdot \tau \cdot g_0 \cdot \langle y(t) \rangle = N_E \cdot \tau \cdot g_0 \cdot \langle y(t) \rangle \quad \{3.2.6\}$$

Mais au fur et à mesure des divisions cellulaires, la densité de cellules dans le puits augmente, accroissant ainsi le coefficient d'absorption du puits, et pour $2\alpha D \gg 1$, la quantité

de photons détectés en surface atteint une limite supérieure, cette limite étant fixée par la concentration relative de cellules émettrices :

$$I_{biol}(t) = \frac{n_E}{n_T} \frac{S \cdot \tau}{2\sigma} g_0 \cdot \langle y(t) \rangle \quad \{3.2.7\}$$

Cette limite supérieure correspond à la détection des photons émis par les cellules émettrices se trouvant dans les couches supérieures du puits : les photons émis par les couches inférieures sont absorbés et n'atteignent donc pas la surface du puits : il s'agit du régime de détection de surface : même si le nombre d'émetteurs augmente (les puits verdissent de plus en plus), la quantité de bioluminescence détectée atteint un palier (FIG. 3-13). La bioluminescence détectée n'est plus proportionnelle au nombre total d'émetteurs. Ainsi, une densité optique initiale $DO_{750nm} = 0.1$ est suffisante pour atteindre un régime de détection des seules couches supérieures (FIG. 3-14).

D'autre part, excepté lors des ajouts hebdomadaires de milieu dans les puits, la quantité de nutriments disponible par cellule ne cesse de diminuer, puisque les cellules se multiplient. Le gain g_0 du rapporteur décroît donc dans le temps. L'intensité moyenne de bioluminescence émise par un puits diminue progressivement au cours du temps ; les discontinuités observées (FIG. 3-14) correspondent à des ajouts de milieu, et donc une brève augmentation du gain.

En réalité, l'expérience montre que les cellules sédimentent au fond du puits quelques jours après la mise en plaque. Les cellules qui étaient initialement dispersées sur une épaisseur D sont donc en réalité concentrées sur une épaisseur inférieure D' . Puisque le milieu cellulaire au dessus de cette couche est transparent, la bioluminescence détectée à la surface du puits reste inchangée qu'il y ait accumulation de cellules ou non. En effet, {3.2.5} peut s'écrire indépendamment de l'épaisseur sur laquelle sont dispersées les cellules :

$$I_{biol}(t) = \frac{N_E}{N_T} g_0 \cdot \langle y(t) \rangle \cdot \frac{S \cdot \tau}{2\sigma} \left(1 - e^{-\frac{2\sigma}{S} N_T} \right) \quad (N_T \text{ étant le nombre total de centres absorbants}).$$

Dans l'étude précédente nous avons fait abstraction du fait que l'amplitude des oscillations b dépend de l'éclairage reçu par les cellules. Nous verrons (3.2.3) que cette dépendance n'est, en réalité pas négligeable. Cependant, cet effet ne modifie pas fondamentalement la conclusion concernant les 2 régimes de détection des photons. En effet, un calcul complet, supposant une variation linéaire de b avec l'intensité lumineuse externe (avec $1/2 \leq b \leq 1$, (cf. 3.2.3)) , permet également d'obtenir les deux régimes de détection suivant la valeur de αD :

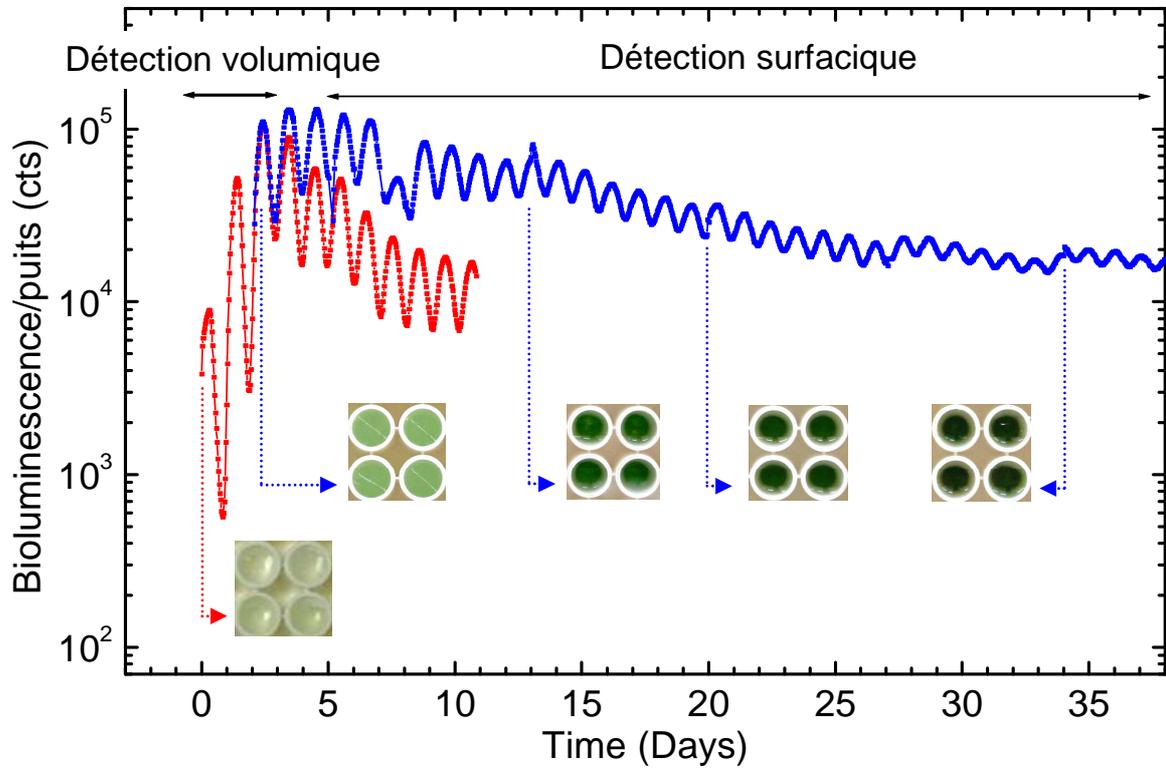


FIG. 3-14 Oscillation de bioluminescence en fonction du temps de puits contenant initialement des cultures de densités cellulaires différentes : $OD_{750nm}=0.1$ (courbe bleue), et une densité optique 10 fois plus faible : $OD_{750nm}=0.01$ (courbe rouge). Cette dernière présente 2 régimes de détection de bioluminescence. La détection « volumique » pendant les 3-4 premiers jours de l'expérience : les puits sont transparents, et l'intégralité des photons émis par les cellules est détectée. La quantité de cellules croît exponentiellement, d'où l'augmentation de l'intensité de bioluminescence. La détection surfacique commence autour du 4^{ème} jour d'expérience : la bioluminescence émise continue d'osciller, mais atteint un maximum d'intensité. En dépit de l'augmentation du nombre d'émetteurs (les puits verdissent de plus en plus), l'intensité de bioluminescence détectée atteint un palier, et décroît même légèrement. En effet, la densité cellulaire augmentant, la quantité de nutriments disponible par cellule diminue dans le temps. Ceci entraîne une diminution du gain du rapporteur de la luciférase. Les flèches indiquent les dates auxquelles les photos des puits ont été prises.

$$\begin{aligned}
 I_{biol}(t) &= N_E \cdot \tau \cdot g_0 \cdot \langle y(t) \rangle & \text{si } 3\alpha D \ll 1 \\
 \text{et } I_{biol}(t) &= \frac{5}{6} \frac{n_E}{n_T} \frac{S\tau}{2\sigma_{550nm}} \left(\frac{1}{5} + \langle y(t) \rangle \right) & \text{si } 2\alpha D \gg 1
 \end{aligned} \tag{3.2.8}$$

Nous retrouvons bien pour $3\alpha D \ll 1$, le régime de détection volumique, et pour $2\alpha D \gg 1$ la détection surfacique.

Il faut en effet bien comprendre ici l'origine physique de ces 2 régimes de détection ; ils sont dus au fait que les cellules contenues dans les puits sont des centres absorbants. Ainsi, les variations de b et g ne modifient pas le passage de la détection volumique à la détection surfacique. C'est pourquoi nous pouvons nous permettre de supposer que b est le même pour toutes les couches de cellules considérées, sans changer fondamentalement les conclusions physiques de l'analyse.

3.2.2 Choix de la densité optique initiale des cultures

D'après ce que nous venons de voir, pour des cultures de densité optique de l'ordre de $DO_{750\text{nm}} = 0.01$, la bioluminescence émise par un puits présente une rupture de pente lors du passage de la détection volumique à la détection surfacique. Nous allons montrer à présent, que du fait de notre méthode de détermination de la phase des oscillations, il est préférable de choisir une densité optique suffisante pour que la détection des photons soit proche du régime surfacique dès le début des expériences.

Pour illustrer ceci, prenons le cas de deux cultures entraînées, de concentrations cellulaires initiales différentes : $DO_{750\text{nm}} = 0.025$ et $DO_{750\text{nm}} = 0.1$. Nous verrons en 3.3.1 une méthode analytique permettant de découpler les variations de l'intensité moyenne de bioluminescence (ou ligne de base) de l'oscillation circadienne proprement dite, et d'en déduire ainsi la phase et la pulsation d'oscillation. La FIG. 3-15 montre pour chacune de ces cultures, les oscillations de bioluminescence, les lignes de base et les pulsations correspondantes.

Pour la culture de plus faible densité optique, la pulsation présente une rupture de pente, due au changement de régime de détection. En effet, du fait de la rupture de pente de la courbe d'évolution temporelle de la bioluminescence émise, la détermination de la ligne de base est moins précise, ce qui influe sur le calcul de la phase des oscillations, et donc sur la pulsation.

Nous vérifions ainsi (FIG. 3-15) que pour la culture de densité optique initiale $DO_{750\text{nm}} = 0.1$, nous nous affranchissons de la variation brutale de l'intensité moyenne de bioluminescence, ce qui rend plus précise l'extraction de la ligne de base, et donc des oscillations de bioluminescence. La FIG. 3-15 montre que la pulsation d'oscillation ne présente pas de changement important.

C'est pourquoi, par la suite, nous débuterons nos expériences avec des cultures de densité optique initiale $DO_{750\text{nm}} = 0.1$.

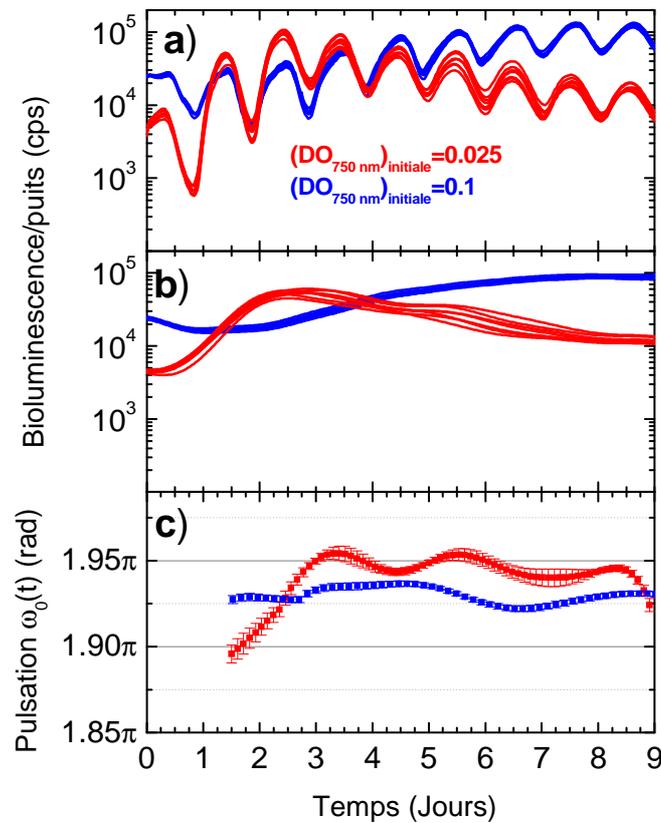


FIG. 3-15 Choix de la densité optique initiale. **a)** Oscillations de bioluminescence de puits contenant initialement 2 cultures entraînées de densités optiques initiales $DO_{750\text{ nm}} = 0.025$ (en rouge) et $DO_{750\text{ nm}} = 0.1$ (en bleu). **b)** Evolution des lignes de base, et **c)** des pulsations des oscillations correspondantes. Du fait des conditions aux limites (cf. 3.3.1) du calcul de la phase des oscillations, le 1^{er} jour d'évolution de la pulsation n'est pas significatif, il ne figure donc pas sur le graphique. Du fait de la rupture de pente de la ligne de base pour une densité optique initiale $OD_{750\text{ nm}} = 0.025$, la pulsation présente une rupture de pente.

3.2.3 Influence de la lumière externe sur le rapporteur de la luciférase

La lumière est une des sources d'énergie des cyanobactéries ; de plus, l'émission de bioluminescence nécessite une dépense d'énergie supplémentaire pour les cellules possédant le gène rapporteur de la luciférase. Le but de cette partie est de quantifier le gain du rapporteur en fonction de la lumière extérieure reçue par les cyanobactéries.

Le dispositif expérimental décrit en 3.1.3 reste le même pour cette étude. Le contrôle de l'intensité de la lumière reçue par les puits est effectué grâce à des filtres neutres d'opacité croissante réalisés pour se superposer parfaitement avec des groupes de 4×4 puits voisins. Rappelons que sans les filtres, la plaque reçoit une intensité lumineuse de 900 lux. L'utilisation

des filtres permet de faire varier l'intensité reçue par un groupe de 4×4 puits voisins entre 40 lux (pour le filtre le plus opaque), et 700 lux (pour le filtre le moins opaque). Ainsi, une même plaque permettra de réaliser 6 conditions d'éclairage différentes.

Une culture cellulaire de la souche AMC 412 est entraînée pendant quelques jours puis mise en plaque, chacun des 96 puits contenant 250 μl de cette culture, à $DO_{750nm} = 0.1$. A cette plaque sont alors superposés les caches d'opacité croissante, permettant ainsi de faire varier la lumière reçue par les puits de 0 lux à 900 lux. La bioluminescence des puits est suivie pendant 4 jours, au terme desquels les filtres sont ôtés, procurant ainsi à l'ensemble des puits un éclairage homogène de 900 lux (FIG. 3-16a). La modification de l'intensité lumineuse affecte l'intensité moyenne de bioluminescence, ainsi que l'amplitude des oscillations. D'autre part, nous vérifions bien que lorsque les oscillateurs sont de nouveau soumis à un éclairage optimal de 900 lux, l'ensemble des puits émet un niveau de bioluminescence identique, assurant ainsi que tous les oscillateurs sont dans le même état.

Nous quantifions les modifications liées aux différentes intensités d'éclairage en calculant le gain du rapporteur (FIG. 3-16b), et l'amplitude relative d'oscillation b de l'activité de *PpsbAI* (FIG. 3-16c). Pour cela, nous exprimons l'intensité de la bioluminescence émise par un puits : d'après {3.2.7}, $I_{biol}(t) = K \cdot g_0 \cdot [1 + b \cdot \rho \cdot \cos(\omega_0 t + \mu)]$, avec $K = \frac{S \cdot \tau}{2\sigma}$ indépendant de la lumière extérieure. Le minimum et le maximum d'intensité de bioluminescence théoriques sont donc : $I_{\min} = K \cdot g_0 \cdot [1 - b \cdot \rho]$ et $I_{\max} = K \cdot g_0 \cdot [1 + b \cdot \rho]$, ceci permet alors d'exprimer : $Kg_0 = \frac{I_{\max} + I_{\min}}{2}$ et $b\rho = \frac{I_{\max} - I_{\min}}{I_{\max} + I_{\min}}$, où I_{\min} est la bioluminescence maximale à $t = 1.9$ jours, et I_{\max} est la bioluminescence minimale à $t = 2.5$ jours. D'autre part, dans cette étude, nous supposons que la modification de l'éclairage a des effets bien plus importants sur l'activité du promoteur que sur le paramètre d'ordre ρ . Ainsi, nous attribuons les changements d'amplitude d'oscillation à b , et considérons que ρ est constant quel que soit l'éclairage.

L'amplitude relative des oscillations sous un éclairage de 1000 lux est connue est vaut $b_{1000lux} \approx 1$, nous pouvons donc calculer le gain et l'amplitude relative des oscillations par cellule normalisés avec les conditions optimales d'éclairage (*i.e.* 1000 lux) : $g_{rel} = \frac{Kg_0}{(Kg)_{1000lux}}$ et

$b = \frac{b\rho}{(b\rho)_{1000lux}}$. La FIG. 3-16bc montre que l'amplitude du rapporteur de la luciférase varie

linéairement avec la lumière extérieure, puis sature aux fortes intensités. De même, le gain relatif des oscillations circadiennes de l'activité du promoteur *PpsbAI* augmente avec l'éclairage.

Une étude similaire a été également réalisée [75], pour étudier cette fois la dépendance à l'éclairage externe du rapporteur de la luciférase de la souche AMC 462, c'est-à-dire lorsque la luciférase est sous le contrôle de *PkaiC*. La FIG. 3-16 montre que les évolutions du gain relatif

et de l'amplitude des oscillations sont semblables à celles observées pour la souche AMC 412. On remarque néanmoins que pour cette souche, le gain du rapporteur augmente clairement linéairement avec l'éclairage jusqu'à une intensité de 600 lux.

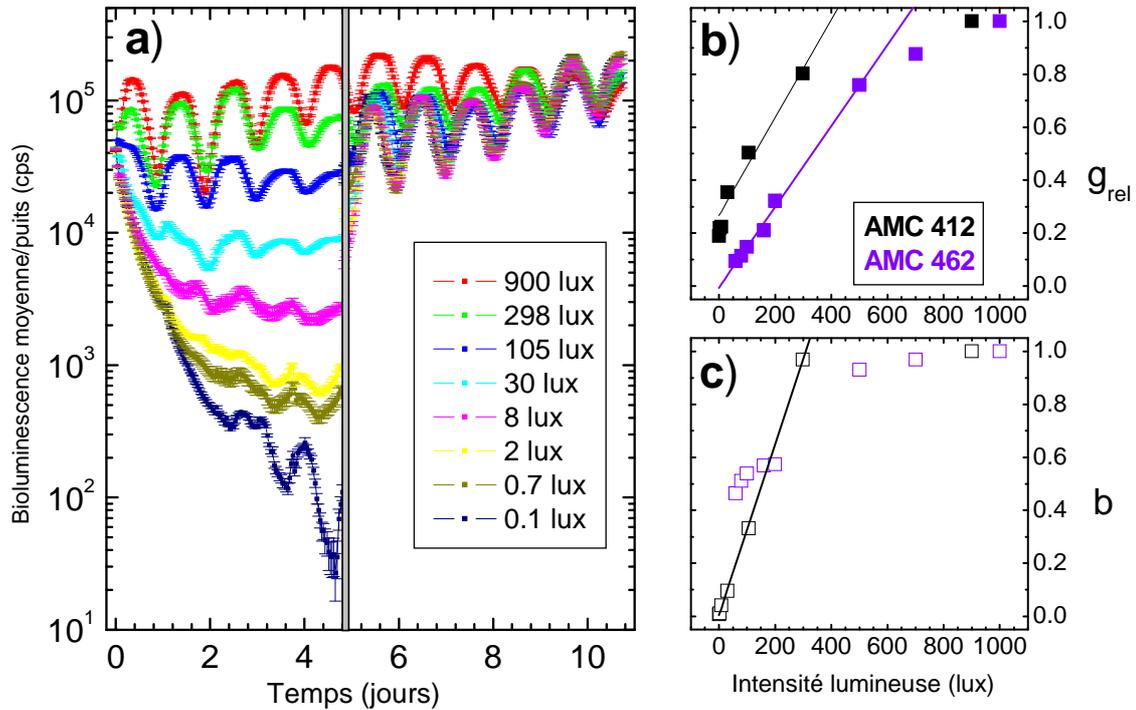


FIG. 3-16 Réponse du rapporteur de la bioluminescence aux conditions d'éclairage. **a)** Pendant les 4 premiers jours, des groupes de 4x4 puits contenant la souche AMC 412 sont soumis à une intensité d'éclairage variant de 0.1 à 900 lux. On impose ensuite un éclairage uniforme à l'ensemble de la plaque (900 lux). La bioluminescence moyenne de chaque groupement de puits est représentée, ainsi que les erreurs standard sur la moyenne. La double barre grisée indique la transition d'un éclairage variable selon le groupe de puits, à un éclairage uniforme de l'ensemble de puits. **b)** Le gain du rapporteur (en noir) augmente linéairement avec l'intensité de l'éclairage, et sature aux plus fortes intensités. Pour comparaison, figure en violet le gain relatif pour la souche AMC 462. **c)** De même, l'amplitude des oscillations (en noir) croît avec l'intensité de la lumière, et sature à $b=1$ pour les forts éclairages. L'amplitude des oscillations pour la souche AMC 462 est représentée en violet. Les droites continues sont les ajustements linéaires des paramètres.

3.2.4 Comparaison bioluminescence/lumière extérieure

Nous savons que la lumière est un facteur qui joue un rôle majeur dans le comportement de l'horloge circadienne chez la cyanobactérie : une variation périodique de lumière permet de changer la phase et la période de l'oscillation, l'intensité lumineuse reçue affecte également l'amplitude d'oscillation, et le gain du rapporteur de la luciférase. Avant d'aller plus loin dans l'analyse des courbes de bioluminescence, nous devons nous assurer que dans un puits, la quantité de lumière reçue par une bactérie via l'éclairage externe est bien plus importante que celle reçue de la part des autres bactéries. Nous allons ainsi montrer qu'une bactérie reçoit environ 10^7 fois plus de photons provenant de l'éclairage externe que de photons provenant de la bioluminescence des cellules environnantes. Pour ce faire, nous allons calculer la bioluminescence totale émise par les cellules dans un puits et la comparer à l'intensité lumineuse extérieure.

Une bactérie possédant le rapporteur de la luciférase *PkaiBC::luxAB* et *PpsbAI::luxCDE* émet environ $g_0 = 4$ photons/minute (cf. 3.1.4). Dans cette partie, nous négligerons l'oscillation circadienne de l'activité du rapporteur et approcherons la moyenne de l'oscillation circadienne $\langle y(t) \rangle$ par sa moyenne temporelle $\overline{\langle y(t) \rangle} = 1$.

L'intensité de bioluminescence dans un puits, mesurée à la profondeur x , est la somme de la contribution des couches supérieures émettant vers le bas $B_{\downarrow}(x)$ et des couches inférieures émettant vers le haut $B_{\uparrow}(x)$ (FIG. 3-17).

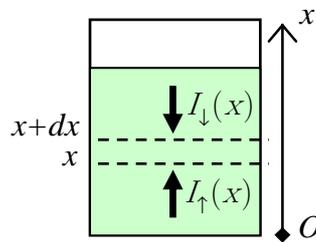


FIG. 3-17 Schématisation d'un puits d'une plaque. A une profondeur donnée x , l'intensité de bioluminescence est la somme des photons provenant des couches supérieures $B_{\downarrow}(x)$ et de ceux émis par les couches inférieures $B_{\uparrow}(x)$.

Dans la partie précédente (3.2.1), nous avons montré que l'intensité émise par les couches inférieures était : $B_{\uparrow}(x) = \frac{n_E \cdot g_0}{2\alpha} e^{\alpha(x-D)} (1 - e^{-2\alpha x})$. Un raisonnement similaire permet de déterminer la variation de l'intensité émise par les couches supérieures vers le bas : $\frac{dB_{\downarrow}}{dx} = \alpha \cdot B_{\downarrow} - n_E \cdot g_0 \cdot e^{\alpha(x-D)}$, d'où l'on déduit l'intensité : $B_{\downarrow}(x) = n_E \cdot g_0 \cdot e^{\alpha(x-D)} \cdot (D - x)$. Nous

en déduisons de ce fait l'intensité totale de bioluminescence reçue par les cellules à la profondeur x :

$$B_{totale}(x) = C_0 \cdot e^{\alpha(x-D)} \cdot \left[\frac{1 - e^{-2\alpha \cdot x}}{2} + \alpha \cdot (D - x) \right] \quad \{3.2.9\}$$

Où $C_0 = \frac{g_0}{\sigma} \cdot \frac{n_E}{n_T}$ est une borne supérieure de la bioluminescence générée par les cellules. Dans le cas où le puits ne contient que des émetteurs, on a $n_E/n_T = 1$, d'où $C_0 \cong 1.6 \cdot 10^{11}$ photons \cdot m⁻² \cdot s⁻¹.

D'autre part, nous avons vu dans la section précédente que l'intensité de la lumière externe se propageant dans le puits décroît exponentiellement avec la profondeur du puits : $I_{ext}(x) = I_0 \cdot e^{-\alpha(D-x)}$ avec $I_0 = 900$ lux $\cong 10^{19}$ photons \cdot m⁻² \cdot s⁻¹ l'intensité lumineuse reçue à la surface d'un puits. C'est au fond du puits que la lumière provenant de l'extérieur est la plus atténuée ; donc le rapport maximal entre l'intensité de la bioluminescence interne et l'intensité de l'éclairage externe s'écrit : $\frac{B_{totale}(x=0)}{I_{ext}(x=0)} = \frac{C_0 \cdot \alpha \cdot D}{I_0}$. Les puits contiennent initialement $n_T = 1.2 \cdot 10^8$ cellules/cm³. Rappelons que $\alpha = n_T \cdot \sigma_{550nm}$, avec $\sigma_{550nm} \cong 4.10^{-9}$ cm², et $D \approx 1$ cm. Ce qui permet d'estimer que la bioluminescence interne est $2 \cdot 10^8$ fois plus faible que la lumière externe au début, et reste au moins $2 \cdot 10^7$ fois plus faible en fin d'expérience (ce qui correspond à $DO_{750nm} = 10$).

L'éclairage produit par la bioluminescence interne est donc négligeable devant la lumière externe ; nous pouvons donc conclure que les photons provenant de la bioluminescence n'ont pas d'effet sur l'oscillation circadienne de bioluminescence des cellules.

Remarque : comparaison entre l'émission d'une cellule et la lumière externe

C'est à la surface d'un puits qu'une cellule émet le plus de photons. Les cyanobactéries situées dans les couches supérieures reçoivent une quantité de photons i_0 de la part de l'éclairage externe, avec $i_0 = \sigma_{550nm} \cdot I_0 = 4.10^6$ photons/cellule/s. Cette quantité est sept ordres de grandeur supérieure à la quantité de photons émise par une seule cellule. Par conséquent, même si le calcul précédent n'a considéré l'émission des photons que dans une direction, la conclusion reste la même : si on considère deux cellules infiniment proches, la quantité de photons que l'une reçoit de l'autre est négligeable devant la quantité de photons reçue via l'éclairage externe.

3.2.5 Effet de la congélation sur l'horloge circadienne

Nous avons vu qu'il était possible d'entraîner les cyanobactéries grâce à une variation périodique de leur environnement extérieur. Nous allons voir maintenant que la congélation permet d'imposer des déphasages entre populations d'oscillateurs.

Pour ce faire, nous entraînons dans l'incubateur une culture de cyanobactéries provenant de la souche AMC 462, puis nous congelons plusieurs cryotubes de cette culture, selon le protocole explicité en 3.1.1. Nous décongelons ensuite successivement des tubes à intervalles de temps réguliers $\Delta t = 6$ heures, et plaçons les cultures dans l'incubateur sous lumière constante jusqu'à ce que la dernière décongélation ait été faite. Ces cultures sont ensuite mises en plaques, à une $DO_{750nm} \approx 0.1$, pour le suivi de la bioluminescence (FIG. 3-18a). Nous disposons de 8 puits pour chaque culture. La FIG. 3-18b montre la phase relative des oscillations des populations *A*, *B*, *C*, *D*. La phase de référence choisie est la phase moyenne de la population *A*, calculée en moyennant sur l'ensemble des puits contenant cette culture.

Il apparaît un déphasage entre populations, directement proportionnel au temps qui sépare les décongélations : $\Delta\varphi \approx 2\pi \frac{\Delta t}{T}$; ainsi, deux populations décongelées à 6h d'intervalle sont déphasées de $\Delta\varphi \approx \pi/2$. Grâce à une congélation simultanée et une décongélation progressive, il est par conséquent possible d'imposer des déphasages bien déterminés entre populations d'oscillateurs.

Nous pouvons expliquer ce phénomène du point de vue du métabolisme de la cellule ; en effet, même si la congélation est perturbatrice pour la cellule, la perturbation est la même pour tous les tubes, puisqu'ils sont congelés simultanément, au même instant du cycle circadien. De même, la décongélation génère également des perturbations du rythme circadien, mais qui sont les mêmes pour chacun des tubes.

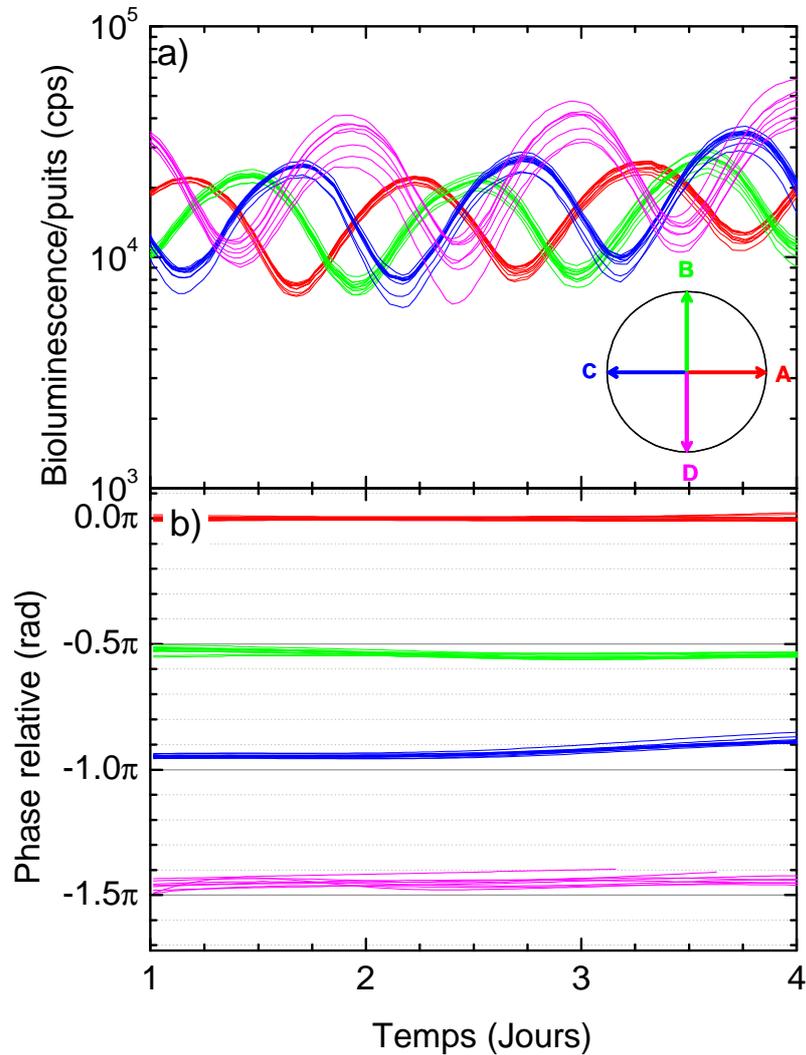


FIG. 3-18 Effet de la congélation simultanée et de la décongélation successive de cultures entraînées.

a) Oscillations de bioluminescence de puits individuels. Des cryotubes contenant la même culture de cyanobactéries entraînées sont congelées simultanément, et décongelées progressivement tous les $\Delta t = 6$ heures. Chaque couleur se réfère à une décongélation différente. A étant la 1^{ère} population décongelée, B la 2nde, ..., D la dernière. **Insert** : les décongélation successive sont séparées de 6h, engendrant une quadrature de phase entre les populations : A est en avance sur B, en opposition de phase avec C, et en retard sur D. b) Phase relative des oscillations, en prenant comme référence la phase moyenne des oscillations de la population A. La moyenne est calculée en faisant la statistique sur toutes les phases des oscillations de la population A. La différence de phase apparaissant entre chaque population est proportionnelle au temps séparant les décongélation : $\Delta\varphi = 2\pi \frac{\Delta t}{T}$.

3.2.6 Influence de la dilution sur la phase des oscillations

La dilution des cultures cellulaires est une étape indispensable dans le processus de préparation des cultures destinées à être mises en plaques et intervient principalement lors de la décongélation, puisque nous avons vu que les cultures congelées sont diluées environ 5 fois avec du milieu de culture. Il est donc indispensable de mesurer les effets de la dilution sur la phase de l'oscillation circadienne d'une population de cyanobactéries.

Pour ce faire, nous entraînons une population d'oscillateurs concentrée ($DO_{750nm} \approx 3-4$), avec quelques cycles de 12h de jour/12h de nuit dans l'incubateur, puis nous la plaçons en lumière constante. Ensuite, nous effectuons des dilutions de cette culture toutes les 3 heures : la 1^{ère} dilution est effectuée 5.5 heures après la mise en lumière constante, et la dernière 32.5 heures après la mise en lumière constante ; la population concentrée est à chaque fois ramenée à une $DO_{750nm} \approx 0.1$.

Au fur et à mesure les cultures diluées sont placées dans l'incubateur, sous lumière constante, jusqu'à ce que la dernière dilution ait été réalisée, soit un total de 10 dilutions. Au terme de ces 10 dilutions, nous réalisons 2 microplaques contenant les 10 échantillons dilués, ainsi que la culture non diluée, qui tiendra lieu de témoin.

La FIG. 3-19 fait apparaître un décalage de phase entre l'oscillation de bioluminescence de la culture non diluée, et celles des cultures diluées.

Pour une description plus précise de ces changements de phase, nous étudions, pour chaque culture diluée, la phase des oscillations moyennes de bioluminescence (obtenues en moyennant sur l'ensemble des puits de chaque condition). Nous ajustons numériquement ces oscillations par la fonction $i(t) = A \cos(\omega_0 t + \varphi)$.

Tous les ajustements réalisés dans ce chapitre et dans les suivants utilisent l'algorithme de minimisation du χ^2 de Levenberg-Marquardt, et sont réalisés avec le logiciel Origin6.1 (OriginLab). Nous présentons systématiquement les valeurs des paramètres accompagnées de leur intervalle de confiance à 95%. Le seul paramètre fixe est la pulsation ω_0 , que nous supposons égale pour toutes les cultures. Pour la déterminer, nous ajustons l'oscillation moyenne de bioluminescence de la culture non diluée par cette fonction, en laissant tous les paramètres libres ; nous estimons ainsi : $\omega_0 = 6.06 \pm 0.07$ rad/jour. Nous déterminons alors la phase d'oscillation pour chacune des cultures diluées. La FIG. 3-20a montre le déphasage entre les oscillations des cultures diluées et non diluées, en fonction de l'instant auquel les dilutions ont été faites. Tous les déphasages observés sont positifs, ce qui signifie que les oscillations circadiennes des populations diluées sont en avance sur celles de la population non diluée. Le décalage de phase qui apparaît entre la population concentrée et les populations diluées est fonction de l'heure circadienne à laquelle la dilution est réalisée.

Le déphasage engendré par la dilution est maximum autour de $t \approx 14$ h. Du point de vue des cellules de la population concernée, une dilution correspond à une augmentation de l'intensité lumineuse moyenne reçue par les cellules. En effet comme nous l'avons vu

précédemment, les cyanobactéries contiennent de nombreux pigments, qui font d'elles des centres absorbants ; ainsi, plus une culture est concentrée, et plus le milieu est absorbant. Par ailleurs, la dilution a pour effet d'accroître la quantité de nutriments disponible par cellule, et influe donc sur son métabolisme.

La lumière est considérée comme le stimulus le plus important permettant de synchroniser l'horloge circadienne avec son environnement. L'oscillateur central constitué par au moins les 3 protéines KaiA, KaiB, et KaiC [35], reçoit des signaux environnementaux par l'intermédiaire des composants de l'horloge, dont la protéine CikA [80], la LdpA [81], et Pex [82].

Il a été montré que des cyanobactéries entraînées soumises à une impulsion de 4 heures d'obscurité oscillent ensuite en décalage de phase par rapport à des cellules restées en lumière constante [45]. Le décalage de phase dépend de l'instant auquel l'impulsion d'obscurité est faite. La FIG. 3-20b montre le déphasage engendré par des impulsions d'obscurité, en fonction de l'heure à laquelle l'impulsion est faite [45]. L'allure du graphique est analogue à celui de la FIG. 3-20a, relatif aux décalages engendrés par la dilution.

Néanmoins, il faut noter que les changements de phases maximaux engendrés par la dilution sont bien plus faibles que ceux causés par des impulsions d'obscurité. La FIG. 3-20c compare ces effets à ceux engendrés par une surexpression ponctuelle de la protéine KaiC dans notre cyanobactérie (FIG. 3-20c) [83].

Nous concluons qu'il est possible de s'affranchir des conséquences de la dilution pour des facteurs de dilution plus petits, de l'ordre de 5 à 6. D'ailleurs, nous avons vu (3.2.5) que les cultures décongelées successivement, puis diluées 5 fois oscillaient bien avec des déphasages proportionnels aux intervalles séparant les décongelations. Par conséquent, nous nous assurons pour toutes nos expériences que les dilutions que nous réalisons vérifient cette condition.

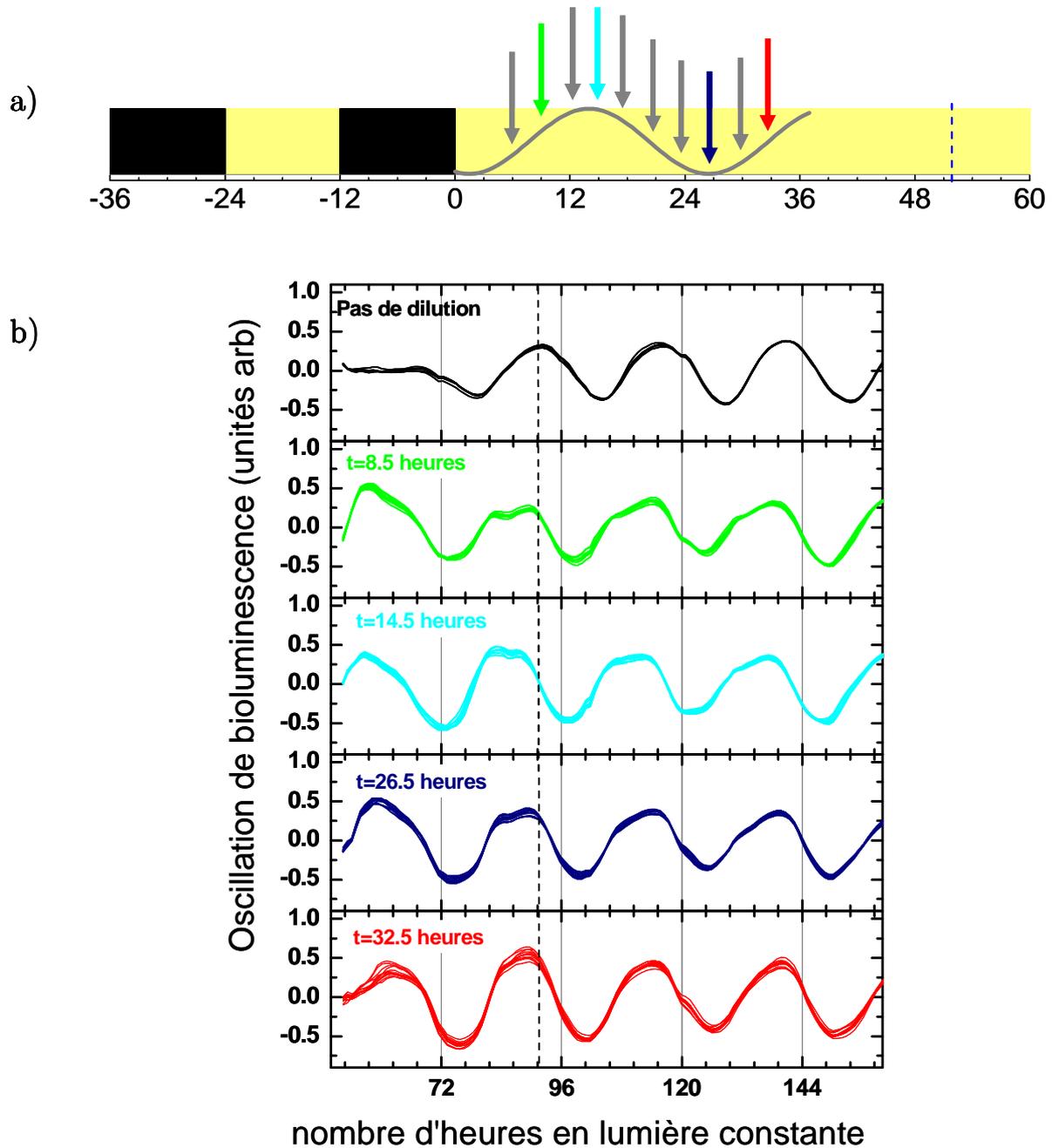


FIG. 3-19 Influence de la dilution d'une culture de cyanobactéries concentrées sur la phase de l'oscillation circadienne. a) Une culture de cellules concentrée est entraînée par plusieurs cycles LD 12 :12, puis diluée à différents instants (indiqués par les flèches). Les barres noires et jaunes correspondent aux périodes d'obscurité, et de lumière. En gris, figure l'oscillation circadienne théorique après entraînement. La ligne bleue en pointillés montre l'instant où les mesures de bioluminescence commencent.

b) Oscillations moyennes de bioluminescence de puits individuels d'une culture concentrée (ligne noire), et d'échantillons de cette culture diluée à différents intervalles de temps (même code de couleur que pour la figure a). Les populations diluées n'oscillent pas en phase avec la population concentrée. De plus, la phase d'oscillation dépend de l'heure de la dilution.

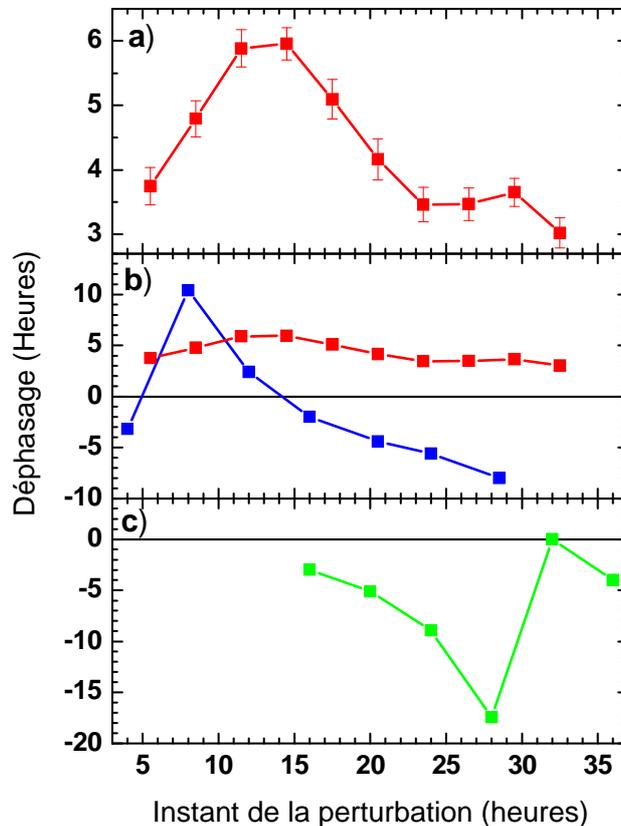


FIG. 3-20 Déphasage engendré par différentes perturbations des cyanobactéries : dans chaque cas, le déphasage est tracé en fonction de l'heure de la dilution. L'origine des temps correspondant à l'instant auquel les cellules sont mises en lumière constante après l'entraînement.

a) Dilution. Déphasage entre les oscillations circadiennes des populations diluées et de la population non diluée en fonction de l'heure de la dilution. Une dilution 30-40 fois d'une culture très concentrée engendre une avance de phase maximale autour du pic de production de luciférase.

b) Perturbation lumineuse. Des cyanobactéries mises à croître en lumière constante sur boîte de Pétri pendant 1-2 jours sont synchronisées par une période de 12 heures dans le noir. Puis elles sont replacées en lumière constante. Après le retour en lumière constante, elles sont soumises à une impulsion de 4 heures d'obscurité, à différentes heures. Le déphasage apparaissant (carrés bleus) est mesuré par comparaison à des bactéries n'ayant pas subi d'impulsion de 4 heures d'obscurité. (D'après Kiyohara, Y.B. *et al.* « *A novel mutation in KaiC affects resetting of the cyanobacterial circadian clock* » *J. Bacteriol.*, 2005. 187(8): p. 2559-2564.) Pour comparaison, cette courbe est superposée à la courbe des déphasages induits par les dilutions (carrés rouges).

c) Surexpression ponctuelle de kaiC. Déphasage engendré par des impulsions ponctuelles de protéine KaiC. (D'après Xu, Y. *et al.* « *Circadian clock-protein expression in cyanobacteria: rhythms and phase setting* » *EMBO J.*, 2000. 19(13): p. 3349-3357.)

3.2.7 Largeur de distribution de phase d'une population d'oscillateurs entraînés

Nous cherchons dans cette partie, à estimer la largeur de distribution au sein d'une population d'oscillateurs cyanobactériens préalablement entraînés, grâce aux deux techniques de suivi de la bioluminescence décrites précédemment.

Microscopie

Expérimentalement, nous entraînonns une culture de cyanobactéries pendant 4-5 jours, et réalisons un échantillon nous permettant de suivre les oscillations de bioluminescence des cellules individuelles d'une dizaine de colonies différentes, pendant 4-5 jours.

A cette échelle de temps, les bactéries d'une même lignée oscillent quasiment à la même période et la même phase, propre à la colonie correspondante.

De ce fait, pour caractériser la largeur de distribution de phase, nous ferons une statistique non pas sur les phases d'oscillations de chaque cellule, mais sur la phase d'oscillation de chaque colonie.

D'après 2.4.3, l'oscillation théorique de bioluminescence émise par une colonie j de cellules :

$$S_j(t) = A \cdot \left[1 + b \cdot e^{-Dt/2} \cdot \cos(\omega_0 t + \mu_j) \right] \quad \{3.2.10\}$$

Avec $D = 5.10^{-4} \pm 3.10^{-4}$ heure⁻¹ [10], et μ_j la phase moyenne de la colonie j .

Pour des suivis expérimentaux inférieurs à 7 jours, $Dt/2 \ll 1$, nous pouvons donc négliger la diffusion de phase, et réécrire l'oscillation théorique moyenne d'une colonie :

$$S_j(t) = A \cdot \left[1 + b \cdot \cos(\omega_0 t + \mu_j) \right] \quad \{3.2.11\}$$

Expérimentalement, l'oscillation moyenne de bioluminescence d'une colonie est obtenue en faisant la moyenne arithmétique des oscillations des cellules la composant.

Cas d'une culture entraînée de faible concentration cellulaire ($DO_{750nm} \approx 0.1 - 0.5$)

La technique d'analyse d'images permettant d'extraire les oscillations de bioluminescence de cellules individuelles à partir des images en contraste de phase et de bioluminescence est explicitée en 3.3.2. Pour chaque colonie étudiée, nous faisons la moyenne arithmétique des oscillations de bioluminescence émises par les cellules la constituant. La FIG. 3-21ab montre les oscillations de cellules issues d'une même lignée, ainsi que l'oscillation moyenne de la colonie. L'origine des temps correspond à la fin de la période d'entraînement, c'est-à-dire à la fin des dernières 12 heures de noir dans l'incubateur.

La bioluminescence des colonies est suivie sur une durée de 4 jours ; nous pouvons donc raisonnablement supposer que la pulsation propre ω_0 est constante et identique pour toutes les colonies étudiées. Pour déterminer la période propre d'oscillation, nous ajustons numériquement les oscillations moyennes de chaque colonie par l'expression : {3.2.11}, en laissant tous les paramètres libres. Nous posons alors que la période propre est la moyenne arithmétique des périodes de toutes les colonies. Nous calculons ainsi $T = 25.3 \pm 0.5$ heures, soit $\omega_0 = 5.96 \pm 0.11$ rad/jour. Puis, en posant comme seul paramètre fixe cette valeur de pulsation propre, nous ajustons numériquement à nouveau l'oscillation des colonies par l'expression {3.2.11}. Nous déterminons ainsi la phase de 9 colonies, ainsi que leur intervalle de confiance à 95%. Puis, comme montré dans l'analyse théorique du 3.3.2 nous déterminons la phase moyenne d'oscillation de l'ensemble des colonies ainsi que la déviation standard circulaire : $\mu = 2.73 \pm 0.63$ rad et $\sigma_\mu = 0.68 \pm 0.40$ rad (FIG. 3-22a).

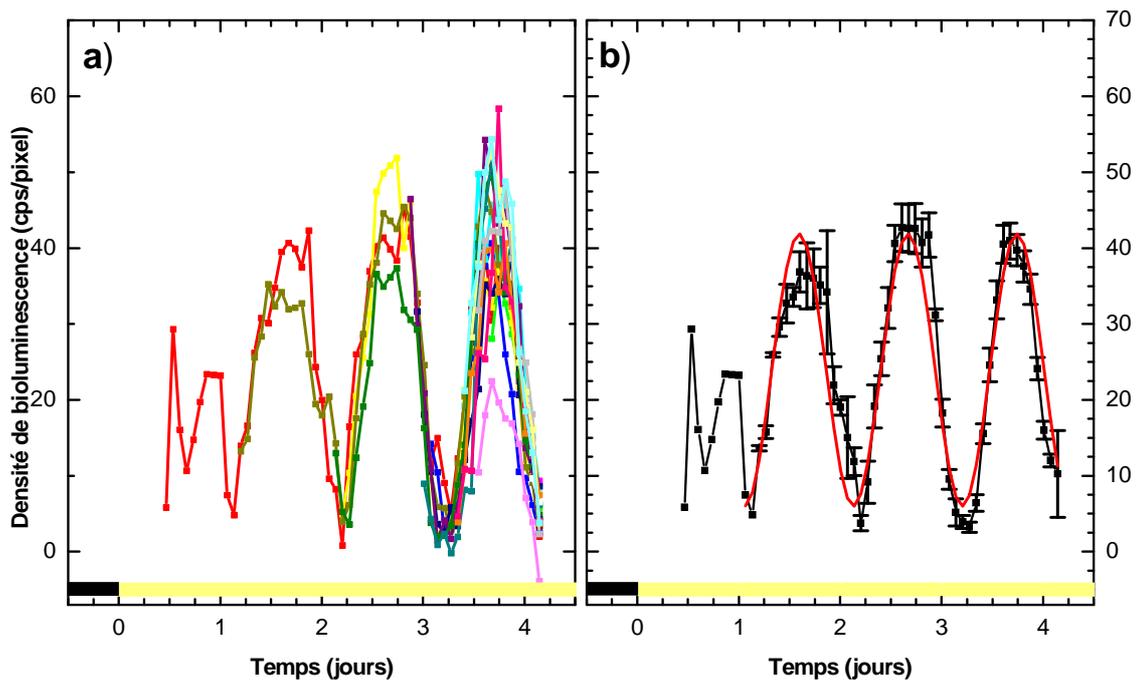


FIG. 3-21 Oscillation circadienne de bioluminescence a) de cellules individuelles d'une même colonie. Chaque couleur fait référence à une cellule. La barre noire et jaune se réfère à l'éclairage auquel les cellules sont soumises (resp. 0 lux et 500 lux). b) Moyenne des oscillations de ces mêmes cellules (en noir), et ajustement (courbe rouge) avec la fonction sinusoïdale $S(t) = A \cdot [1 + b \cdot \cos(\omega_0 t + \varphi_0)]$, où $\omega_0 = 5.96 \pm 0.11$ rad/jour.

Cas d'une culture entraînée de forte concentration cellulaire

Pour compléter cette étude, nous réalisons le même processus d'entraînement et d'élaboration de l'échantillon pour une culture cellulaire de densité optique 5 fois plus concentrée. Pour les ajustements numériques, nous supposons que la pulsation d'oscillation est la même que pour les cultures précédentes : $\omega_0 = 5.96 \pm 0.11$ rad/jour.

Les courbes de bioluminescence obtenues pour 17 colonies étudiées permettent d'estimer la largeur de distribution $\sigma_\mu = 0.95 \pm 0.33$ rad ainsi que la phase moyenne d'oscillation $\mu = 2.57 \pm 0.43$ rad de cette culture concentrée. Nous retrouvons dans le cas d'une population de forte densité optique une phase moyenne d'oscillation similaire à celle calculée pour la population faiblement concentrée (FIG. 3-22b) ; ce résultat n'est pas surprenant puisque les cellules ont dans les deux cas été entraînées dans des environnements identiques. Nous en déduisons donc qu'une population entraînée de AMC 412 atteint son 1^{er} pic de bioluminescence environ 14h après la mise en lumière constante. Une mesure directe sur une culture de AMC 412 mise en plaque, du signal de bioluminescence émis montre qu'effectivement, le 1^{er} maximum est atteint 14h après la mise en lumière constante [77]. Cet accord entre ces deux types de mesures montre que la préparation de l'échantillon du microscope, et en particulier le recouvrement des cellules par de l'agarose, ne perturbe pas beaucoup les cyanobactéries.

Cette largeur de distribution est déterminée dans le cas optimal d'une souche venant juste d'être entraînée ; nous cherchons maintenant à connaître les effets de la congélation sur la largeur de distribution de phase.

Cas d'une culture entraînée congelée

Pour ce faire, une population de cyanobactéries entraînée pendant 4-5 jours est congelée à -80°C . Puis les tubes sont décongelés, et les cellules sont mises dans l'incubateur, en lumière constante (900 lux), à 30°C , le taux de CO_2 étant régulé. Ces cellules séjournent dans l'incubateur pendant environ quelques jours, afin de favoriser la croissance cellulaire, car la congélation a entraîné une perte considérable de cellules. Suite à cette semaine de croissance, nous réalisons un échantillon permettant le suivi de bioluminescence sur cellule individuelle. De même que précédemment, nous déterminons la phase d'oscillation de chaque colonie, soit 24 au total (FIG. 3-22c), et en déduisons la largeur de distribution de phase au sein de cette population : $\sigma = 0.68 \pm 0.29$ rad.

Pour ces 3 expériences, la statistique est réalisée sur des échantillons de tailles différentes, et il est d'autant plus difficile de comparer les valeurs des largeurs de distribution σ que les intervalles de confiance diffèrent d'une expérience à l'autre. Cependant, en regardant l'allure des distributions de phases (FIG. 3-22), nous pouvons faire une première comparaison qualitative des largeurs de distribution obtenues pour chacune de nos 3 expériences.

Les colonies provenant de la population concentrée semblent avoir une distribution de phases plus large que celle de la culture plus faiblement concentrée. Il est possible que pour de fortes densités optiques, les cellules soient moins sensibles à l'entraînement par une variation de l'intensité lumineuse. En effet, nous avons vu que les pigments naturels présents dans la cyanobactérie en faisaient un centre absorbant; ainsi, pour de fortes densités optiques la lumière reçue par une cellule est fortement atténuée par les cellules environnantes; on peut alors supposer que les bactéries ne perçoivent pas complètement l'oscillation de lumière externe, mais qu'elles sont soumises à une oscillation de lumière de plus faible amplitude. Par ailleurs, les bactéries sont agitées dans les fioles et perçoivent un environnement différent selon qu'elles sont au centre de la fiole ou à sa périphérie. Ceci peut également expliquer pourquoi l'entraînement est moins efficace, puisque là encore, le flux lumineux perçu par les bactéries n'oscille pas comme l'environnement réel.

Concernant les souches congelées après entraînement, il apparaît FIG. 3-22 que la largeur de distribution est similaire à celle de la culture non congelée de faible concentration. La congélation est donc une méthode efficace permettant d'imposer des déphasages entre populations d'oscillateurs (3.2.5), sans altérer la dispersion de phases au sein des cultures congelées.

Détermination de la largeur de la distribution à partir de l'amplitude d'oscillation d'une population d'oscillateurs

Il est possible de faire une estimation de la largeur de la distribution de phases à partir de l'amplitude de l'oscillation moyenne de bioluminescence émise par une population de cyanobactéries. Nous verrons dans la partie 3.3.1 en détails comment accéder à l'évolution temporelle de cette amplitude. A partir du signal émis par une assemblée d'oscillateurs, il est possible de calculer le signal oscillant moyen (3.3.1) :

$$s(t) = b \cdot \rho \cdot \cos(\omega_0 t + \mu) \quad \{3.2.12\}$$

Où ρ est le paramètre d'ordre, b l'amplitude relative du signal émis par une cellule individuelle, avec $b \in [0;1]$, ω_0 la pulsation propre, et μ la phase moyenne d'oscillation.

Chaque expérience présentée ci-dessous consiste à entraîner une culture de bactéries provenant de la souche AMC 462, puis à la congeler. Ensuite, nous décongelons des cryotubes contenant ces cultures successivement 3-4 fois, afin d'imposer un déphasage entre elles, comme nous l'avons vu en 3.1.1. La FIG. 3-23 montre le signal oscillant en fonction du temps pour 5 expériences réalisées avec des cultures ayant subi ce traitement. (La densité optique initiale lors de la mise en plaque est la même pour chaque expérience : $DO_{750\text{nm}} = 0.1$).

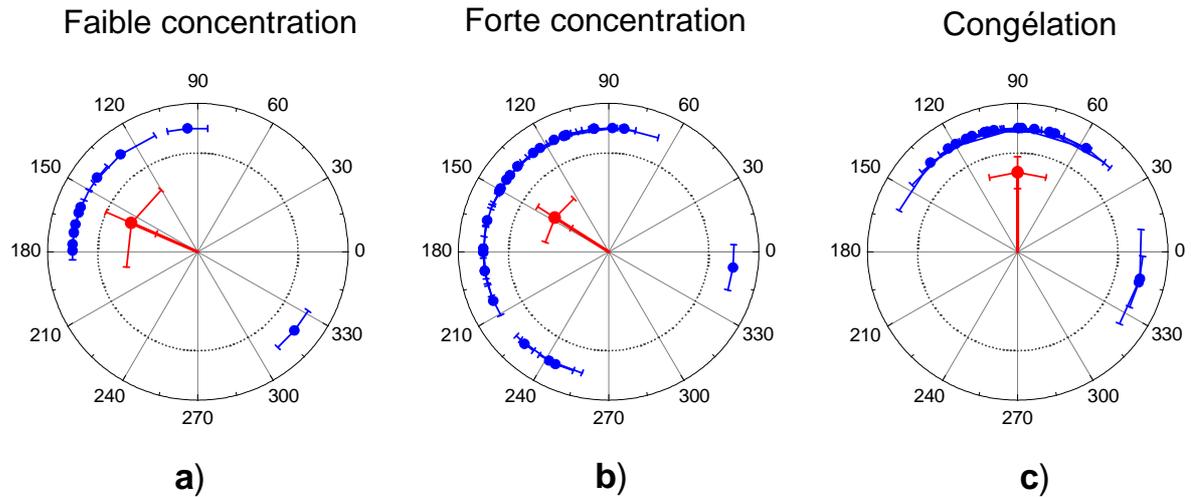


FIG. 3-22 Distribution de phase a) d'une culture entraînée de faible concentration, b) de forte concentration, et c) d'une culture congelée après l'entraînement. Chaque rond de couleur représente la phase moyenne d'une colonie obtenue en ajustant numériquement les oscillations des colonies par la fonction $S(t) = A \cdot [1 + b \cdot \cos(\omega_0 t + \varphi_0)]$, où $\omega_0 = 5.96 \pm 0.11$ rad/jour. Les phases sont représentées avec leur intervalle de confiance à 95%. Le vecteur au centre de chaque cercle (dont l'extrémité est un cercle), a une norme égale au paramètre d'ordre ρ et est orientée suivant la phase moyenne d'oscillation de l'ensemble des colonies, pour chaque expérience réalisée. Les barres d'erreur sont les intervalles de confiance à 95% de ρ et de la phase moyenne μ .

Le paramètre b reflète l'état métabolique dans lequel se trouvent les cellules, et au début de l'expérience $b \approx 1$ (cf. 3.3.1 et 4.4.3). Par conséquent, en repérant un maximum s_{\max} et un minimum s_{\min} des oscillations de bioluminescence (FIG. 3-23a), nous pouvons en déduire le paramètre d'ordre initial, et donc la déviation standard circulaire σ_μ juste après la mise en plaque, pour chaque expérience. En effet, d'après {3.2.12}, $\rho \approx \frac{s_{\max} - s_{\min}}{2}$. Nous connaissons

de plus la relation qui lie ρ à σ_μ : $\rho = e^{\frac{-1}{2}\sigma_\mu^2}$. Nous obtenons des valeurs de σ_μ variant de 0.74 à 1.21 rad (FIG. 3-23b). Nous vérifions bien que au sein de chaque expérience, les populations de phases différentes ont des valeurs de σ_μ similaires. Effectivement, ces populations de phases différentes proviennent d'une même culture, et ont donc été entraînées identiquement.

En faisant la moyenne arithmétique des déviations standard trouvées pour chaque expérience (FIG. 3-23b), on estime une largeur de distribution de

phases $\sigma_\mu = 1.01 \pm 0.29$ rad ; cette valeur est du même ordre de grandeur que celle estimée pour les cellules issues de la souche AMC 412 avec les expériences sur cellules individuelles.

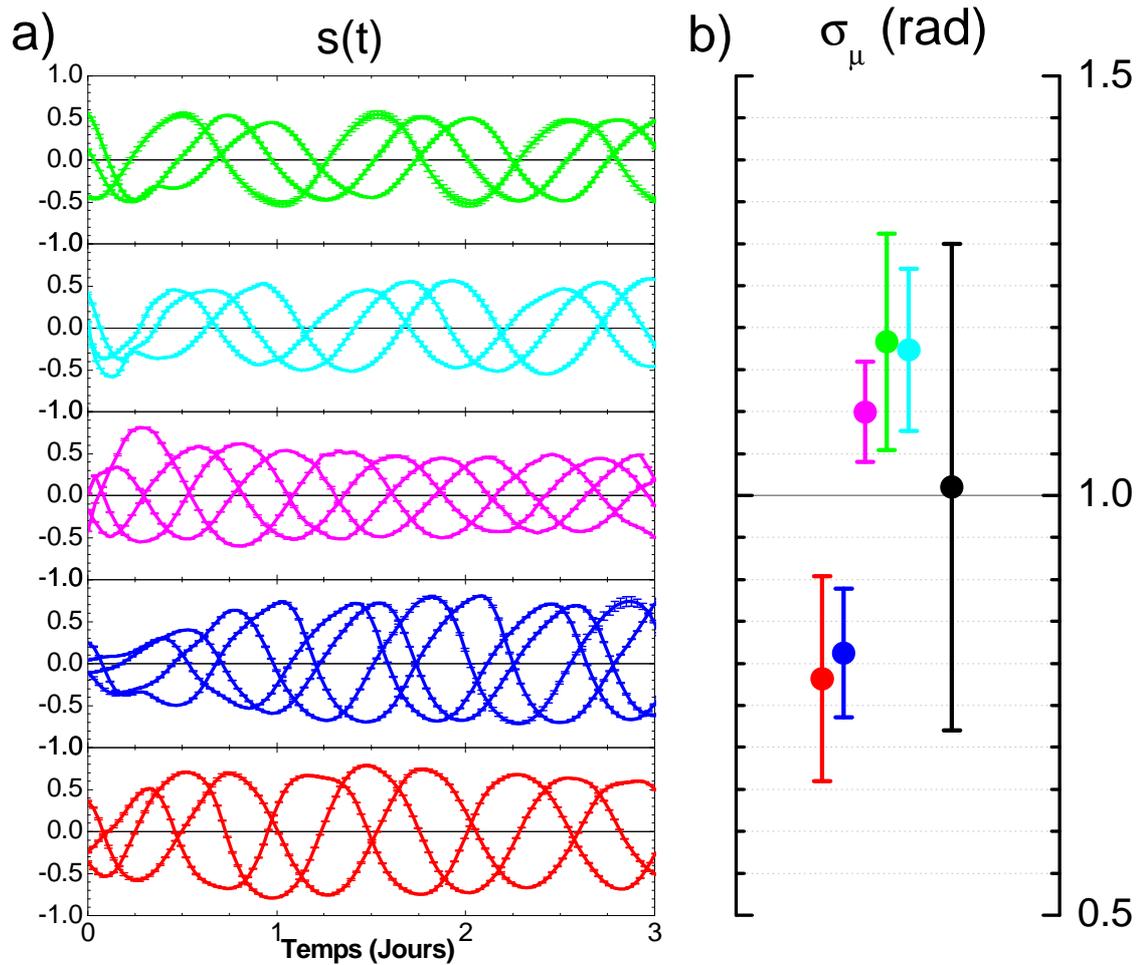


FIG. 3-23 Estimation de la largeur de distribution grâce à l'amplitude d'oscillation. Des cultures entraînées sont congelées, puis décongelées et mises 1-2 jours en lumière constante. Ce traitement est réalisé sur des cultures de AMC 462, au cours de 5 expériences différentes. **a)** Oscillations circadiennes en fonction du temps, pour chaque expérience (chaque couleur représente une expérience, donc une densité optique d'entraînement différente). Sur chaque graphique, chaque courbe est la valeur moyenne de l'oscillation circadienne d'une culture de phase donnée. En supposant que initialement, $b \approx 1$, alors l'amplitude initiale donne le paramètre d'ordre initial, qui est relié à la largeur de la distribution par $\rho = e^{-\sigma_\mu^2/2}$. **b)** Déviation standard sur la moyenne calculée pour chaque expérience précédente (même code de couleur que précédemment). Le point noir est la déviation standard moyenne calculée sur l'ensemble des valeurs de σ_μ des expériences présentées. Les barres d'erreur sont les intervalles de confiance à 95%.

Nous pouvons maintenant dresser une synthèse des paramètres d'ordre et déviation standard sur la moyenne obtenus grâce à l'ensemble des mesures précédentes :

	σ_{μ} (rad)	ρ
Culture $DO_{750} \approx 0.1 - 0.5$	0.68 ± 0.40	0.79 ± 0.21
Culture congelée	0.68 ± 0.28	0.79 ± 0.15
Culture $DO_{750} \approx 1 - 2$	0.95 ± 0.33	0.64 ± 0.20
Culture $DO_{750} \approx 1 - 6$	1.01 ± 0.29	0.60 ± 0.17

FIG. 3-24 Déviation standard sur la moyenne et paramètre d'ordre d'une population entraînée. Ces paramètres sont déterminés en faisant une statistique sur les phases d'oscillation des colonies (3 premières lignes), ou directement à partir de l'amplitude initial d'oscillation d'une population de cellules (dernière ligne). Ces valeurs sont les largeurs distribution au sein de populations fraîchement entraînée (lignes 1, 2-4), ou congelé après l'entraînement (ligne2).

3.3 Analyse de données

3.3.1 Analyse du signal de bioluminescence émis par un puits

Cette partie a pour objet de montrer les informations pertinentes que l'on peut obtenir à partir du suivi des oscillations circadiennes de bioluminescence d'une population de cyanobactéries. Dans un premier temps, nous allons montrer comment nous affranchir de la variation de l'intensité moyenne de bioluminescence due à la croissance cellulaire, avant de présenter une technique permettant de calculer la phase instantanée des oscillations en fonction du temps.

Suppression des discontinuités dues à l'ajout de milieu dans les puits

Nous avons vu que pour suivre la bioluminescence d'une population d'oscillateurs sur une longue durée, il était indispensable d'ajouter une fois par semaine du milieu dans les puits.

L'ajout de milieu s'accompagne (FIG. 3-25a) d'une augmentation rapide de l'intensité de bioluminescence émise. Cet accroissement brutal de l'intensité de bioluminescence émise provient de l'augmentation du gain du rapporteur de la luciférase. En effet, ce gain est relié à l'état métabolique des cellules. Un apport de nutriments accroît ce gain, et entraîne donc les discontinuités observées.

En général, nous ajoutons du milieu 1 fois par semaine ; ainsi, pour une expérience durant plus de 2 semaines, nous verrons plusieurs discontinuités apparaître sur les courbes de bioluminescence ; pour obtenir une courbe de bioluminescence continue, nous supprimons les sauts en commençant par le dernier, puis en remontant jusqu'au premier, grâce à la méthode explicitée ci-dessous.

Pour l'étude des oscillations de bioluminescence, il est nécessaire de supprimer ces discontinuités, afin de permettre une étude correcte des caractéristiques du signal oscillant $s(t)$. Supposons que l'ajout du milieu soit réalisé entre les dates successives t_{i_0} et t_{i_0+1} (FIG. 3-25b), les discontinuités sont dues à un accroissement du gain de la valeur $g_0(t_0)$ à la valeur $g_0(t_{i_0+1}) = k \cdot g_0(t_{i_0})$ avec $k > 1$. De ce fait, l'expression de la bioluminescence après l'ajout de milieu n'est plus

plus $I_{biol}(t) = \frac{N_E}{N_T} g_0(t) \cdot \langle y(t) \rangle \cdot \frac{S \cdot \tau}{2\sigma}$, mais devient :

$I_{biol}(t) = \frac{N_E}{N_T} \cdot k \cdot g_0(t) \cdot \langle y(t) \rangle \cdot \frac{S \cdot \tau}{2\sigma}$, pour $t > t_{i_0}$. Pour s'affranchir de la discontinuité, il s'agit

donc de diviser le signal de bioluminescence obtenu après ajout de milieu par k , avec

$$k = \frac{I_{biol}(t_{i_0+1})}{I_{biol}(t_{i_0})}.$$

Une fois les courbes affranchies des sauts d'intensité, nous pouvons alors déterminer la ligne de base ainsi que l'oscillation de bioluminescence.

La ligne de base

La ligne de base $\overline{I_{biol}(t)}$ est définie comme la moyenne temporelle de $I_{biol}(t)$. Pour la calculer, nous utilisons une routine disponible sous Origin6.1 qui permet de calculer la transformée de Fourier rapide (FFT : Fast Fourier Transform) du signal de bioluminescence expérimental, avec un degré de lissage que nous choisissons égal à 40 points, ce qui correspond à environ une période d'oscillation (FIG. 3-26). Ceci revient donc à utiliser un filtre passe-bas éliminant toutes les fréquences supérieures à $\omega_0/2\pi$. Rappelons que l'intensité de bioluminescence émise par un puit est, d'après 3.2.1 :

$$I_{biol}(t) = \frac{n_E}{n_T} g_0 \cdot \langle y(t) \rangle \cdot \frac{S \cdot \tau}{2\sigma_{550\text{ nm}}} (1 - e^{-2\alpha D}) \quad \{3.3.1\}$$

Avec $\langle y(t) \rangle = 1 + b\rho \cos(\omega_0 t + \mu)$.

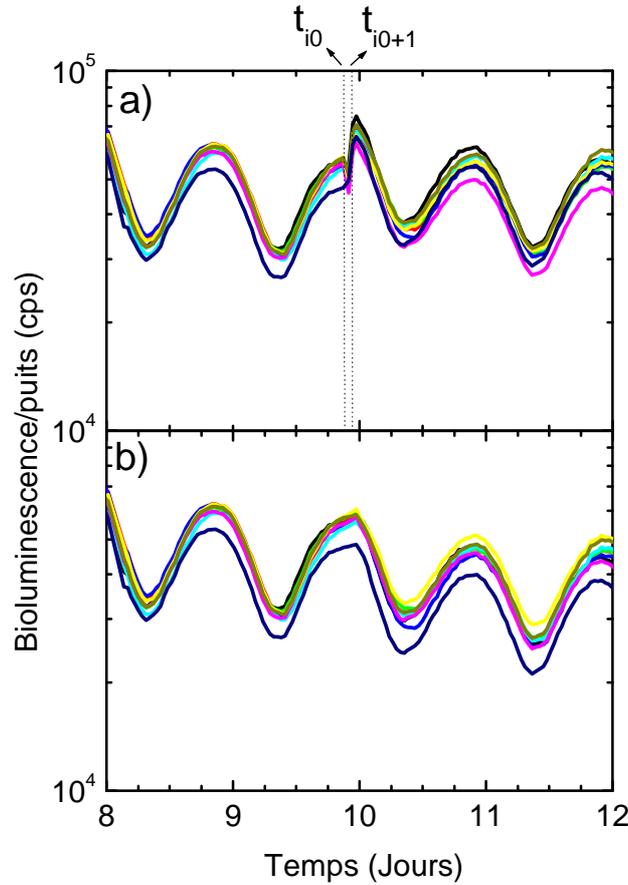


FIG. 3-25 Correction des discontinuités de l'oscillation de bioluminescence dues à l'ajout de milieu dans les puits. **a)** Oscillation de bioluminescence de puits individuels contenant une culture entraînée de densité optique initiale $DO_{750\text{ nm}} = 0.1$. Le milieu est ajouté dans les puits entre les dates t_{i_0} et t_{i_0+1} , environ 10 jours après le début de l'expérience. **b)** Oscillations de bioluminescence de ces mêmes puits (même code de couleurs), corrigées en multipliant $I_{biol}(t)$ par un facteur $k < 1$ juste après l'ajout, ce qui permet de s'affranchir de l'augmentation du gain g . Nous obtenons alors une courbe continue de bioluminescence.

Nous déduisons alors l'expression théorique de la ligne de base :

$$\overline{I_{biol}(t)} = \frac{n_E}{n_T} g_0 \cdot \frac{S \cdot \tau}{2\sigma_{550\text{ nm}}} (1 - e^{-2\alpha D}) \quad \{3.3.2\}$$

L'expression théorique de la ligne de base montre que l'intensité correspondante est proportionnelle au rapport du nombre d'émetteurs au nombre total de cellules dans un puits. Ainsi, même si des cellules n'émettent pas de bioluminescence, nous sommes en mesure de

détecter et de quantifier leur présence grâce à l'intensité relative des lignes de base. Considérons deux puits dont l'un contient uniquement N_E émetteurs, et l'autre contient un mélange cellules émettrices+cellules non émettrices (soient N_T cellules au total). Si les deux puits contiennent la même concentration totale de cellule, alors le rapport de leur ligne de base est : $\left[\overline{I_{biol}(t)} \right]_{E+NE} / \left[\overline{I_{biol}(t)} \right]_E = [N_E/N_T]_{E+NE}$ en supposant que les gains du rapporteur de la luciférase sont le même pour les 2 puits. Ainsi, pour un puits contenant initialement 10 fois plus de cellules non émettrices que de cellules lumineuses, nous voyons effectivement (FIG. 3-26) que la ligne de base est au départ 10 fois plus faible que celle d'un puits ne contenant que des cellules lumineuses.

Le signal oscillatoire

Après avoir remarqué que la ligne de base renseigne sur la quantité relative de cellules lumineuses par rapport au nombre de cellules total, voyons comment extraire la phase instantanée ainsi que l'amplitude, à partir de l'oscillation circadienne $s(t)$. Nous avons vu précédemment que l'intensité de bioluminescence émise par un puits décroissait progressivement dans le temps du fait d'une diminution du gain du rapporteur. Afin de nous affranchir de cette décroissance, nous définissons à partir du signal de bioluminescence $I_{biol}(t)$ émis par un puits, le signal oscillatoire :

$$s(t) = \frac{I_{biol}(t) - \overline{I_{biol}(t)}}{\overline{I_{biol}(t)}} \quad \{3.3.3\}$$

A partir de {3.3.2}, nous déduisons l'expression de $s(t)$:

$$s(t) = b \cdot \rho \cdot \cos(\omega_0 t + \mu) \quad \{3.3.4\}$$

Etude du signal oscillatoire : extraction de la phase et de l'amplitude

Pour un signal sinusoïdal tel que $s(t)$, nous obtenons cette phase grâce à un procédé mathématique nécessitant la génération du signal analytique complexe [70]:

$$z(t) = s(t) + is_H(t) = A(t)e^{i\phi(t)} \quad \{3.3.5\}$$

où $s_H(t)$ est la transformée de Hilbert (TH) de $s(t)$, définie comme suit :

$$s_H(t) = \frac{1}{\pi} P.V. \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{s(\tau)}{t - \tau} d\tau \quad \{3.3.6\}$$

$P.V.$ désignant la valeur principale de Cauchy. La phase instantanée $\phi(t)$ et l'amplitude $A(t)$ de $s(t)$ sont donc parfaitement définies grâce à {3.3.5}.

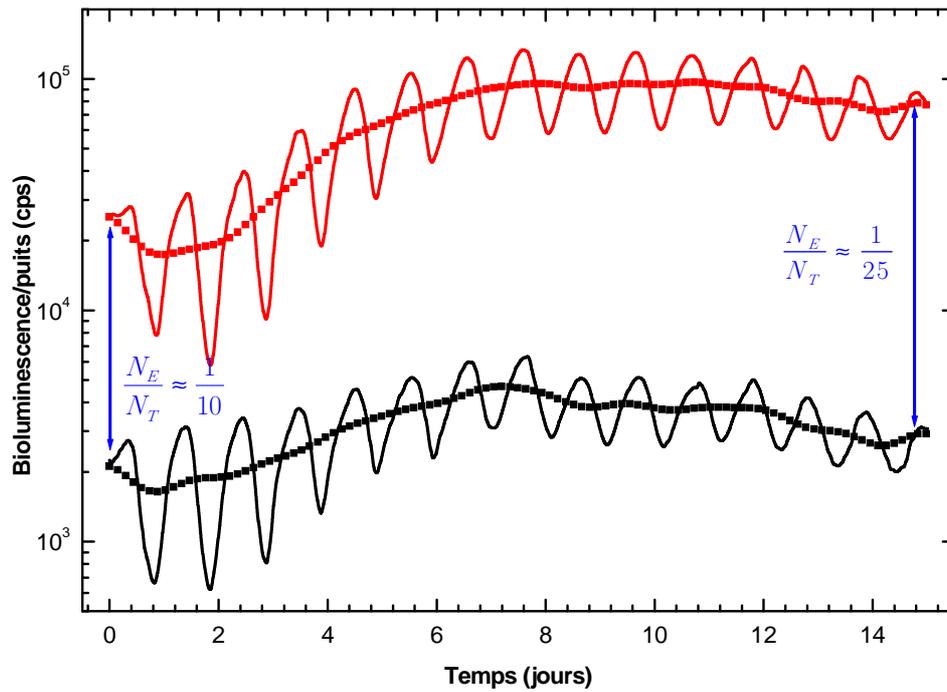


FIG. 3-26 Découplage de la ligne de base et de l'oscillation circadienne de bioluminescence. a) Oscillations de bioluminescence émises par un puits ne contenant que des émetteurs (ligne rouge), et un puits contenant un mélange de N_E cellules émettrices et non émettrices, à une concentration de 10% de cellules émettrices (ligne noire). Les puits contiennent initialement la même quantité totale N_T de cellules. L'intensité relative des lignes de base correspondant à ces oscillations (courbes en pointillés rouges et noires) montre que le rapport N_E/N_T dans le puits contenant les 2 types de cellules diminue entre le début et la fin de l'expérience : les cellules émettrices se divisent souvent moins vite que les cellules non luminescentes.

Pour bien comprendre la signification de cette transformée de Hilbert, on peut remarquer que $s_H(t)$ est défini comme le produit de convolution de $s(t)$ et $1/\pi t$. Au vu des propriétés du produit de convolution, la transformée de Fourier $S_H(\nu)$ de $s_H(t)$ est le produit des transformées de Fourier de $s(t)$ et $1/\pi t$. Rappelons que la transformée de Fourier (TF) de $1/\pi t$ est $\text{TF}(1/\pi t) = -i$, pour des fréquences $\nu > 0$. Ainsi, pour les fréquences $\nu > 0$, $S_H(\nu) = -iS(\nu)$ ($S(\nu)$ étant la transformée de Fourier de $s(t)$). Les transformées de Fourier de $s(t)$ et de sa TH ont donc la même amplitude, et sont déphasées de $-\pi/2$. Pour illustrer ceci, prenons le cas simple d'une oscillation harmonique $s(t) = A \cos \omega t$; cette oscillation est souvent représentée sous sa forme complexe $z(t) = A(\cos \omega t + i \sin \omega t)$. Ce qui signifie que la partie réelle est complétée par une partie imaginaire déphasée de $-\pi/2$, et on retrouve bien $z(t) = A e^{i\omega t}$. L'équation {3.3.5} est une extension du cas de l'oscillateur harmonique, à un signal $s(t)$ quelconque. Par conséquent, pour calculer la phase du signal défini par {3.3.4} il s'agit de calculer sa transformée de Hilbert, et de déterminer l'argument du complexe correspondant {3.3.5}.

Pour calculer la transformée de Hilbert du signal oscillant $s(t)$, nous procédons en plusieurs étapes :

- i) $S(\nu)$ est obtenu en calculant la FFT de $s(t)$ sous Origin6.0,
- ii) $S_H(\nu)$ est ensuite obtenu en multipliant les parties réelle $\text{Re}\{S(\nu)\}$ et imaginaire $\text{Im}\{S(\nu)\}$ de $S(\nu)$ par $-i$: $S_H(\nu) = \text{Im}\{S(\nu)\} - i\text{Re}\{S(\nu)\}$,
- iii) calcul de la FFT inverse de $S_H(\nu)$, qui donne $s_H(t)$.

Le calcul de la FFT nécessite d'avoir des séries temporelles contenant 2^N points. C'est pourquoi, avant tout calcul, nous étirons les séries de données, pour avoir un nombre de points égal à une puissance de 2. De plus, pour réduire les effets de bord du calcul de la FFT, nous éliminons après le calcul une quarantaine de points au début et à la fin du signal.

L'amplitude du signal $s(t)$ est alors égale à l'argument du complexe $z(t)$ (FIG. 3-27d) :

$$b\rho = \sqrt{[s(t)]^2 + [s_H(t)]^2} \quad \{3.3.7\}$$

Et la phase instantanée de $s(t)$ est alors égale à :

$$\omega_0 t + \mu = \begin{cases} \arctan\left(\frac{s_H(t)}{s(t)}\right) & , \text{ si } s(t) > 0 \\ \arctan\left(\frac{s_H(t)}{s(t)}\right) \pm \pi & , \text{ si } s(t) < 0 \end{cases} \quad \{3.3.8\}$$

La phase ainsi calculée prend des valeurs comprises entre $-\pi$ et π ; on parle pour cette raison de phase « enroulée » (FIG. 3-27e). Chaque discontinuité montre le début d'un nouveau cycle de phase ; cependant, l'évolution réelle de la phase est obtenue en supprimant toutes les discontinuités par un facteur 2π : on obtient ainsi la phase « déroulée » du signal expérimental $s(t)$ (FIG. 3-27f). Par définition ($\{2.1.4\}$), la pente de la phase déroulée donne la pulsation d'oscillation à chaque instant : $\omega_0(t) = \frac{d\varphi(t)}{dt}$. On constate que les courbes montrant la phase « déroulée » en fonction du temps pour un oscillateur libre sont quasi-linéaires car $\omega_0(t)$ varie légèrement avec le vieillissement de la population de cellules, et varie également d'une expérience à l'autre (FIG. 3-28a). Cependant, cette variation est en première approximation identique pour chacun des puits d'une microplaque, et nous pouvons nous en affranchir en étudiant les phases dans un repère tournant à la vitesse $\omega_0(t)$.

Examinons rapidement la variabilité de l'amplitude et de la pulsation d'oscillation, pour différentes expériences, réalisées sur des cultures de cyanobactéries entraînées, puis mises en plaque à une densité optique initiale $DO_{750\text{ nm}} = 0.1$. Pour chaque expérience, les cultures sont entraînées à des densités optiques. On voit (FIG. 3-28) qu'il y a des écarts entre les différentes amplitudes, et pulsations de chaque expérience. Les écarts sont plus importants pour $(b \cdot \rho)(t)$ que pour $\omega_0(t)$ (déviations standard/moyenne respectives égales au maximum à 20% et 5%).

Les écarts entre les densités optiques durant l'entraînement ne suffisent pas à expliquer les différences, puisque pour deux cultures de densités optiques proches au moment de l'entraînement, les évolutions de $(b\rho)(t)$ ne sont pas similaires. Dans l'interprétation ultérieure de nos expériences, il faudra donc tenir compte de cette variabilité d'une expérience à l'autre.

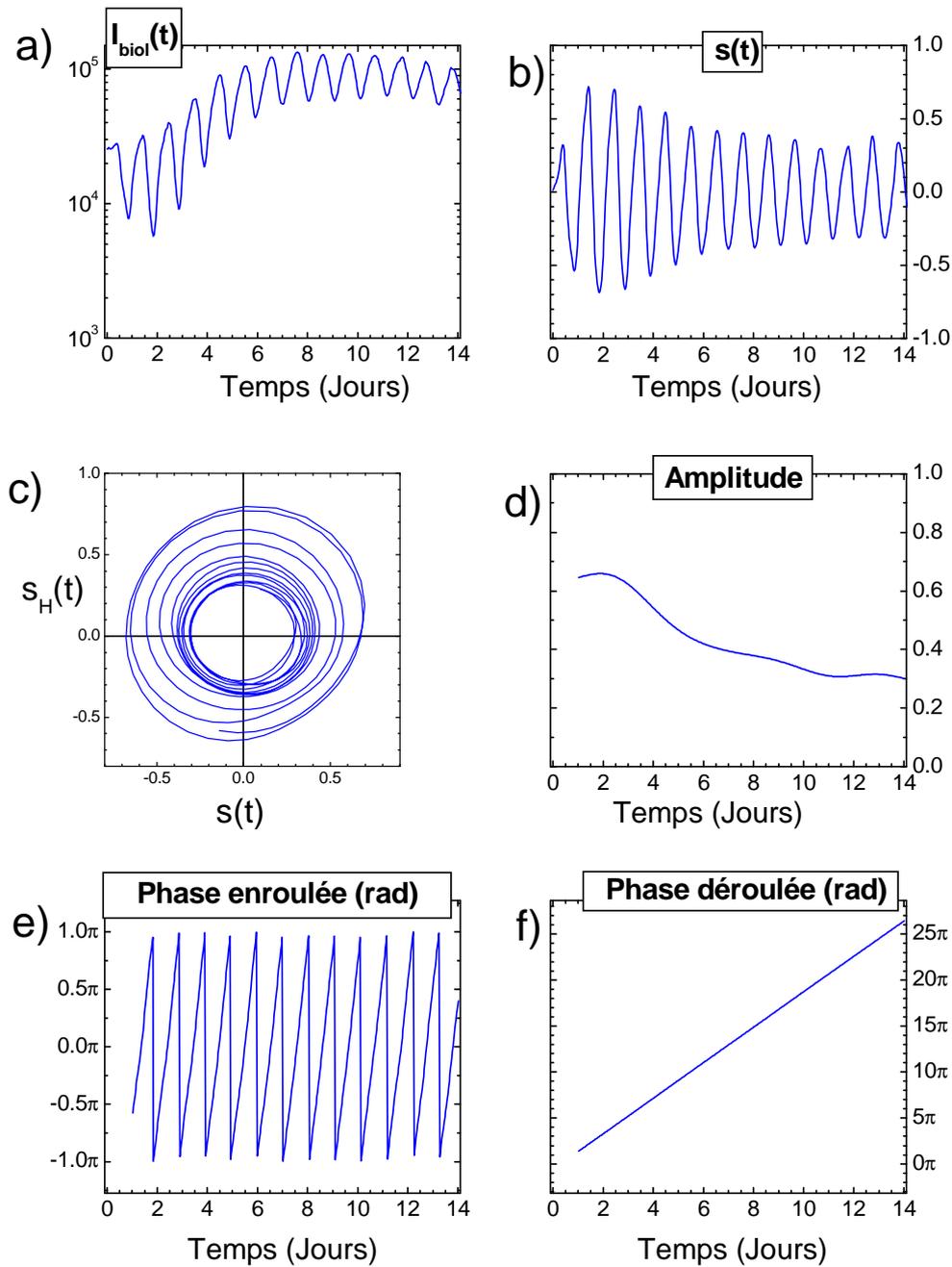


FIG. 3-27 Extraction de la phase et de l'amplitude du signal émis par un puits. **a)** Signal émis par un puits contenant une culture de cyanobactéries luminescentes de $DO_{750} = 0.1$ initialement. **b)** Signal oscillant $s(t) = b \cdot \rho \cdot \cos(\omega_0 t + \mu)$. **c)** Représentation dans un plan complexe de $s_H(t)$ (partie imaginaire) en fonction de $s(t)$ (partie réelle). **d)** La « phase enroulée » est l'argument du complexe $z(t) = s(t) + i s_H(t)$, et prend ses valeurs dans l'intervalle $[-\pi; \pi]$. **e)** Phase instantanée déroulée. La pente de cette courbe est égale à la pulsation $\omega_0(t)$, qui varie faiblement, puisque la courbe est quasi-linéaire.

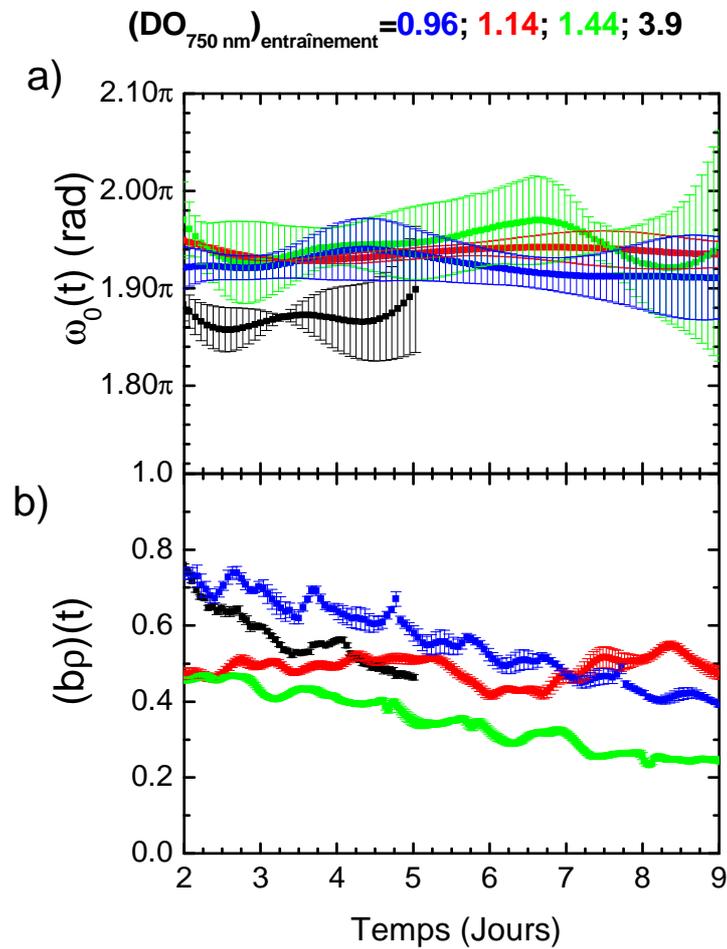


FIG. 3-28 Comparaison de plusieurs séries de mesures. Des cultures entraînées sont congelées, puis décongelées et mises 1-2 jours en lumière constante. Ce traitement est réalisé sur des cultures de AMC 462, pour 4 expériences différentes. La densité optique des cultures à la fin de l'entraînement est indiquée $(DO_{750\text{ nm}})_{\text{entraînement}}$ **a)** Pulsation, et **b)** Amplitude des oscillations de bioluminescence pour chaque série de mesures, chaque couleur se réfère à une expérience. Les barres d'erreur sont les erreurs standard sur la moyenne de la pulsation calculée sur l'ensemble des puits identiques d'une même expérience. (~ 30 puits/expérience)

Tri des données

Nous avons vu précédemment qu'il nous était possible de réaliser des mélanges de cellules différents sur une même plaque, et que pour chaque type de mélange, nous disposions initialement de 8 à 16 puits. Nous avons vu par ailleurs que nous pouvions être amenés à exclure, lors de notre analyse des courbes de bioluminescence, des puits marginaux (3.1.3).

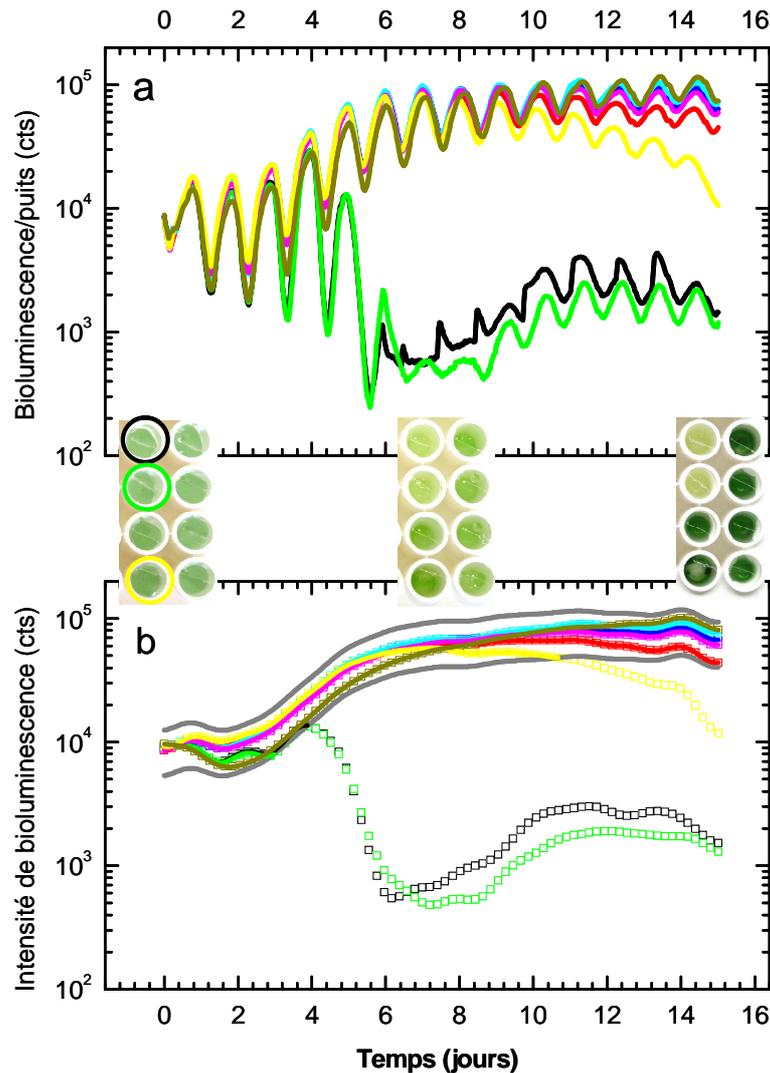


FIG. 3-29 Choix des puits pertinents pour l'analyse de l'oscillation circadienne. a) Bioluminescence de puits individuels d'une population entraînée. 8 puits sur la plaque contiennent initialement 250 microlitres de la même culture de cyanobactéries. Les 4 premiers jours, l'intensité de bioluminescence est parfaitement reproductible d'un puits à l'autre. Puis après quelques jours, des divergences apparaissent entre les puits. b) Ligne de base en fonction du temps des oscillations de bioluminescence a). Un puits de référence est choisi (ligne rose) ; autour duquel on établit un intervalle de confiance de 40 % (lignes grises). Les lignes de base (carrés) situées en dehors de cet intervalle sont exclues de l'analyse. Les photos représentent les puits à $t=0$; $t=8$, et $t=15$ jours. Les anneaux de couleur montrent les puits correspondant aux courbes de bioluminescence de même couleur.

Afin de discriminer les puits pertinents de ceux qui le sont moins, nous établissons un critère de sélection s'appuyant sur les lignes de base des courbes de bioluminescence. Nous choisissons un puits de référence et définissons un intervalle de confiance de plus ou moins 40% autour de la ligne de base de ce puits ; ne sont conservés pour l'analyse que les puits dont la ligne de base reste comprise dans cet intervalle. Le choix du puits de référence d'une condition donnée est dicté par l'allure générale de la ligne de base : la ligne de base la moins « perturbée » (par l'ajout de milieu par exemple) tiendra lieu de référence. Dès lors qu'une ligne de base est hors de l'intervalle de confiance, le puits est éliminé de l'analyse pour le reste de l'expérience. Le nombre de puits relatifs à une condition donnée diminue donc progressivement avec le temps (FIG. 3-29).

Remarquons que cette sélection de puits basée sur le comportement de l'intensité de la ligne de base revient à discriminer les puits suivant leur état métabolique et en aucun cas sur un critère lié à la phase de l'oscillation.

Récapitulatif

Résumons maintenant brièvement les différentes étapes d'analyse des courbes de bioluminescence émises par un puits :

- Calcul de la ligne de base des courbes « brutes », pour sélectionner les intervalles de temps sur lesquels les courbes seront étudiées ultérieurement.
- Correction des discontinuités des courbes de bioluminescence $I_{biol}(t)$ dues au rajout de milieu de culture dans les puits.
- Extraction de la ligne de base $\overline{I_{biol}(t)}$ et du signal oscillatoire $s(t) = b\rho \cos(\omega_0 t + \mu)$ de ces courbes corrigées.
- Le calcul de la FFT nécessite de travailler sur des séries temporelles ayant un nombre de point égale à 2^N , ($N \in \mathbb{N}$). Chaque série temporelle de mesures pour $s(t)$ est étirée pour atteindre une puissance de 2.
- Calcul de la transformée de Hilbert du signal oscillatoire : $s_H(t)$
- Extraction de la phase enroulée, égale à l'argument du complexe $z(t) = s(t) + is_H(t)$. Puis suppression des discontinuités pour déterminer la phase « déroulée ».

3.3.2 Analyse d'images

Il s'agit ici de comprendre comment exploiter les images de microscopie en contraste de phase et de bioluminescence afin d'extraire les oscillations de bioluminescence propres à chacune des cellules individuelles.

Les cellules sont identifiées manuellement une par une sur les images en contraste de phase, chronologiquement depuis l'image finale, jusqu'à la première image. Pour ce faire, nous utilisons un programme adapté sous le logiciel Matlab (Mathworks), qui permet de sélectionner

les pixels correspondant à une cellule choisie et d'extraire ainsi sa taille et sa position. Cette sélection de pixels consiste à créer un premier masque de forme choisie, proche de la forme originelle d'une cyanobactérie. Nous choisissons ensuite une cellule, puis ce masque est étiré et subit une rotation pour se superposer au mieux à la cellule (FIG. 3-30d). Les pixels de ce masque sont ensuite regroupés 3 par 3, ce qui permet d'identifier directement les pixels de l'image de bioluminescence coïncidant avec la zone délimitée par le masque, donc correspondant à la cellule étudiée (FIG. 3-30e). Les rayons cosmiques éventuellement détectés lors du processus d'acquisition peuvent être discriminés grâce à leur très forte intensité comparée à celle de la bioluminescence. Pour estimer le bruit de fond, nous choisissons une zone dépourvue de cellules, et réalisons pour chaque image prise, l'histogramme d'intensité de tous les pixels contenus dans cette région. La valeur b_k , du bruit de fond par pixel (ou « background »), est définie, pour chaque image, par le maximum de cet histogramme (FIG. 3-31).

Connaissant le nombre de coups reçus par un pixel i (N_{count_i}), ainsi que le nombre de groupes de 3×3 pixels contenus dans le masque décrivant la cellule étudiée ($N_{3 \times 3}$), nous pouvons définir la densité de bioluminescence par cellule par pixel : $d = \sum_{i=1}^{N_{3 \times 3}} N_{count_i} / N_{3 \times 3} - b_k$ [10], ce qui permet d'obtenir les oscillations de bioluminescence par cellule en fonction du temps.

Pour illustrer ceci, prenant l'exemple d'une expérience que nous avons présentée dans la partie 3.2.7.

Il s'agissait de déterminer la largeur de distribution de phases au sein d'une culture fraîchement entraînée. La FIG. 3-32 montre les images de microscopie en contraste de phase et de bioluminescence d'une colonie, obtenues après 2.5 jours d'expérience, ainsi que les oscillations des autres colonies sur lesquelles la statistique des phases est réalisée (9 colonies au total).

Pour chaque colonie, nous analysons les oscillations de bioluminescence de N_{cell} cellules individuelles. N_{cell} varie de 4 à 25 suivant la colonie considérée. En effet, une colonie poussant rapidement en multicouche permettra d'analyser un nombre plus petit de cellules, par rapport aux colonies ayant une croissance en 2 dimensions durant les 3-4 jours d'expériences. Pour cette expérience, 9 colonies ont pu être analysées.

Pour toutes les expériences de microscopies de bioluminescence, il faut donc tenir compte de la taille finie de l'échantillon (au niveau du nombre de cellules par colonie, et du nombre de colonie étudiées), afin d'exprimer précisément le incertitudes sur la phase moyenne et le paramètre d'ordre.

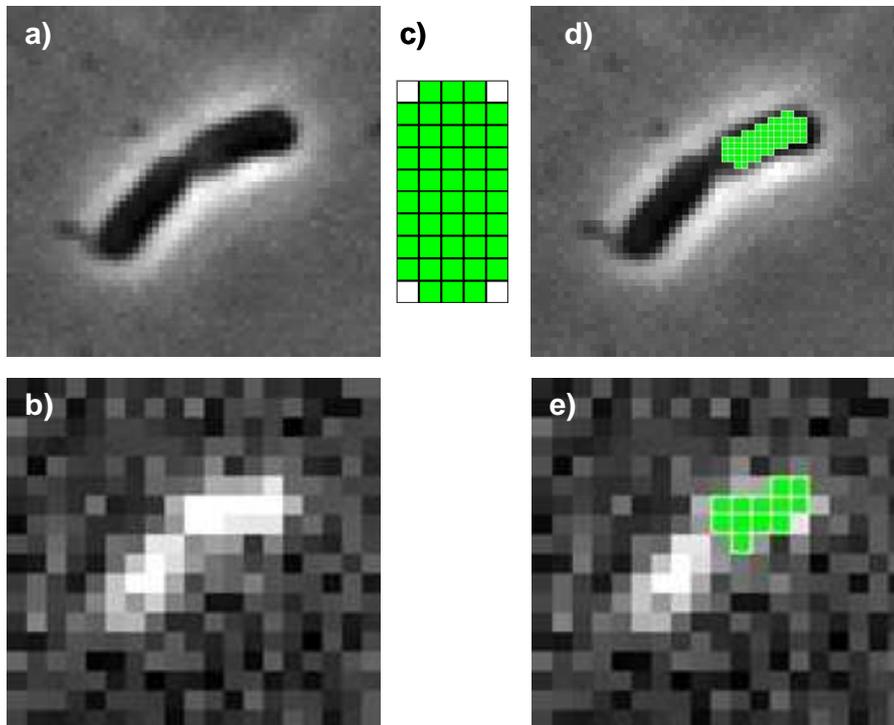


FIG. 3-30 Identification d'une cellule imagée en contraste de phase et de la bioluminescence correspondante.

a) Image en contraste de phase d'une cyanobactérie (57×54 pixels), et **b)** Image en bioluminescence correspondante (19×18 pixels). Les pixels sont regroupés 3 par 3, afin de minimiser le bruit de lecture de la caméra. **c)** Forme initiale du masque représentant la forme simplifiée d'une cyanobactérie. Ce masque est ensuite étiré et pivoté, afin d'être superposé à l'image en contraste de phase. **d)** Après regroupement des pixels 3 par 3, on peut repérer sur l'image en bioluminescence les pixels correspondant à la cellule étudiée, et donc connaître la quantité de photons détectés au niveau de ces pixels.

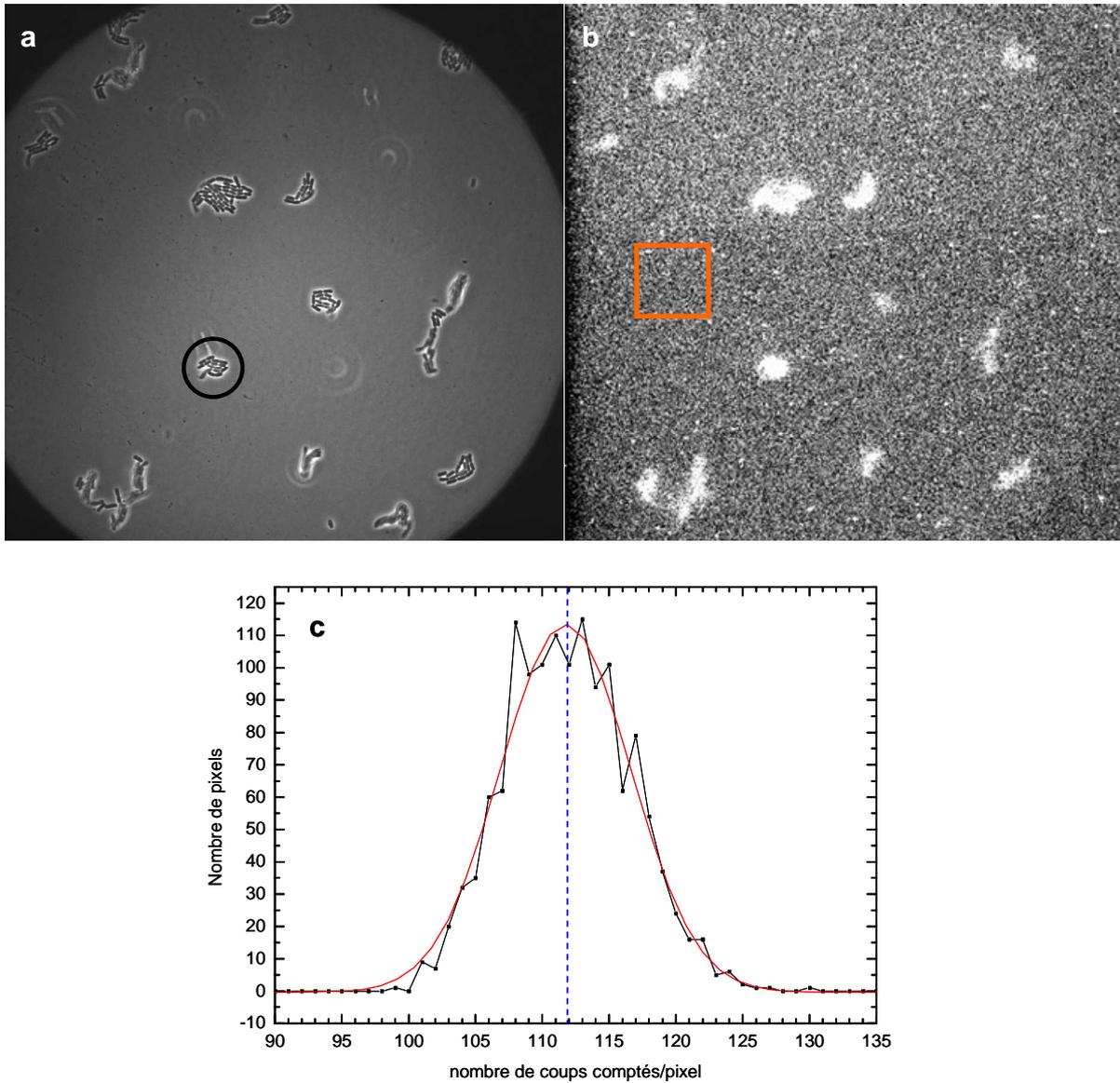


FIG. 3-31 Estimation du bruit de fond du comptage des photons. **a)** Image en contraste de phase d'un échantillon après 3 jours de croissance cellulaire, et **b)** image en bioluminescence correspondante. **c)** Histogramme d'intensité de la quantité de photons détectée dans une zone choisie dépourvue de cellules (rectangle orange). La valeur du bruit de fond est approchée par le maximum d'intensité de l'histogramme. Pour chaque image prise, nous réalisons l'histogramme d'intensité.

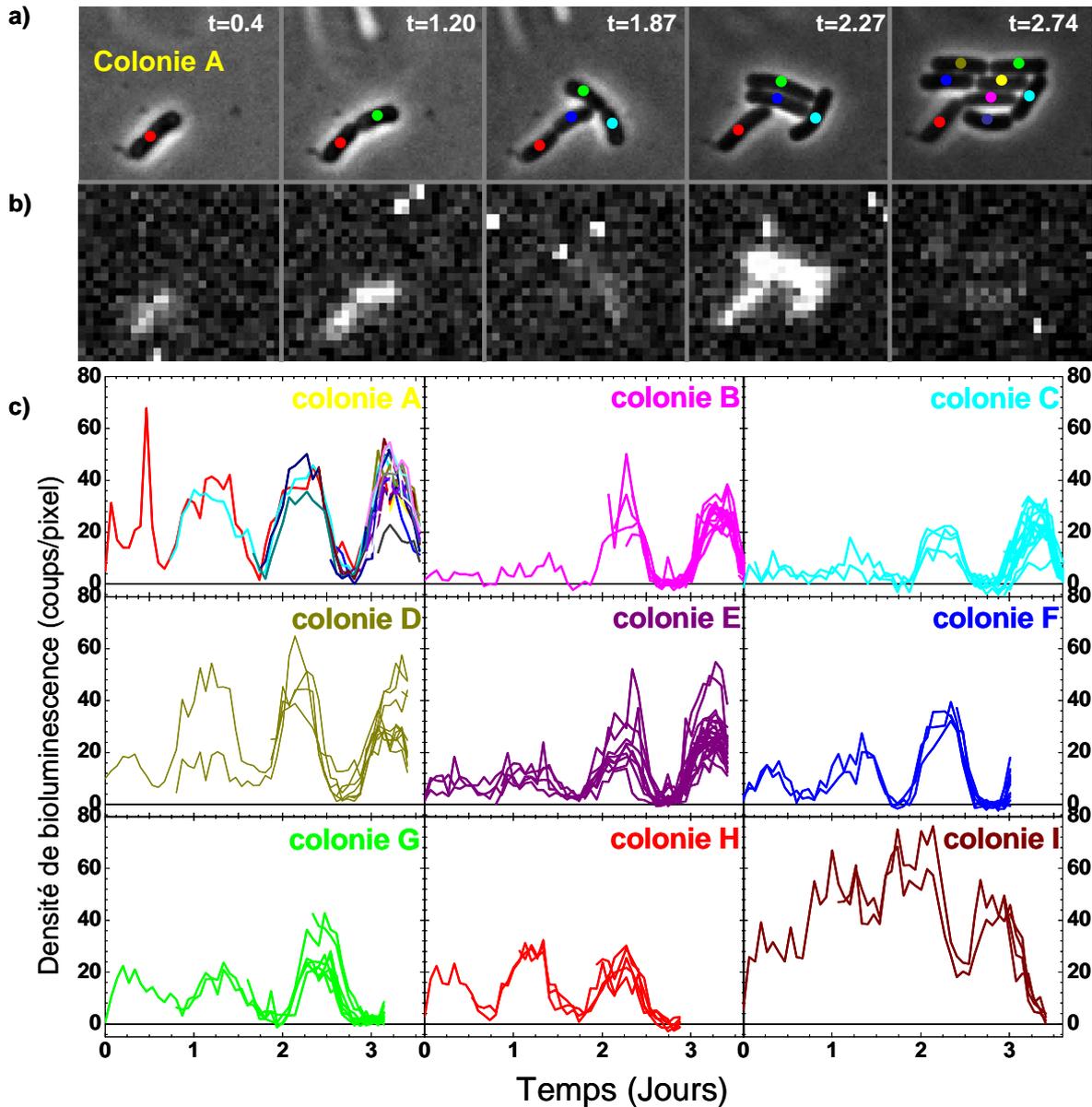


FIG. 3-32 Oscillations de bioluminescence de cellules individuelles. a) Images en contraste de phase, et (b) images en bioluminescence correspondantes, prises à différents instants t (temps indiqué en jours), à partir du début des mesures. Les points de couleur représentent les cellules. c) **Colonie A** : oscillations bioluminescence moyenne de la colonie encerclée de noir sur la FIG. 3-31. Une cellule mère et l'ensemble de sa descendance oscillent avec la même phase et le même période. Les couleurs des courbes correspondent aux cellules pointées sur la figure (a). **Colonies B à I.** Certaines colonies poussent en multicouche plus ou moins rapidement, c'est pourquoi le nombre de cellules analysées varie d'une colonie à l'autre.

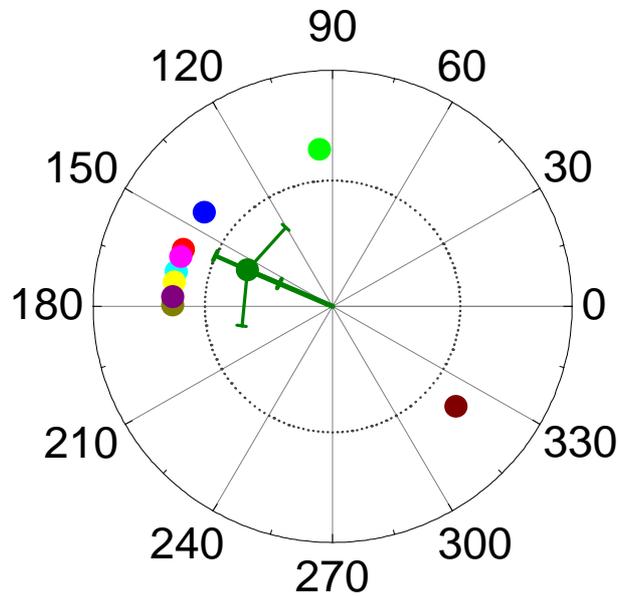


FIG. 3-33 Phase moyenne des colonies de la FIG. 3-21 (même code de couleur). Le vecteur central représente le champ moyen complexe. (cf. FIG. 3-22). La phase moyenne est égale à $\mu = 2.73 \pm 0.63$ rad , et la paramètre d'ordre vaut $\rho = 0.79 \pm 0.21$.

3.3.3 Incertitude sur la détermination de la phase moyenne et du paramètre d'ordre

Pour caractériser la distribution de phases au sein d'une assemblée de colonies, nous faisons appel aux éléments de statistique circulaire présenté §2.4. Expérimentalement, la phase moyenne μ et le paramètre d'ordre ρ de la distribution de phase sont donc définis par :

$$\tan \mu = \frac{\sum_{j=1}^{N_{Col}} \sin \varphi_j}{\sum_{j=1}^{N_{Col}} \cos \varphi_j} \quad \{3.3.9\}$$

$$\rho = \frac{1}{N_{Col}} \sqrt{\left(\sum_{j=1}^{N_{Col}} \cos \varphi_j \right)^2 + \left(\sum_{j=1}^{N_{Col}} \sin \varphi_j \right)^2}$$

Où φ_j est la phase moyenne d'oscillation d'une colonie de cellules.

De plus, nous supposons que les phases des colonies sont réparties suivant une distribution de Von Mises, dont la valeur moyenne et le paramètre d'ordre sont donnés par les expressions précédentes. Ce qui permet d'en déduire la déviation standard circulaire : $\sigma_\mu = \sqrt{-2 \ln \rho}$.

Il s'agit maintenant d'estimer les incertitudes sur la détermination de ces grandeurs.

Incertitude sur la détermination de μ

Soient $\Delta\mu$ et $\Delta\rho$ les incertitudes sur la détermination de la phase moyenne et du paramètre d'ordre. Les incertitudes sur μ et ρ ont deux origines principales :

- i. Le caractère fini de l'échantillon : expérimentalement, le nombre d'oscillateurs (colonies) étudiés est restreint.
- ii. Les incertitudes sur la détermination des phases moyennes φ_j de chaque colonie.

Rappelons en effet que pour obtenir ces phases, nous ajustons linéairement l'oscillation moyenne de chaque colonie par {3.2.11}.

On peut ainsi écrire que $\Delta\mu = \sqrt{[\Delta\mu]_1^2 + [\Delta\mu]_2^2}$; $[\Delta\mu]_1$ étant l'incertitude due au caractère fini de nos échantillons, et $[\Delta\mu]_2$ l'incertitude liée à l'incertitude sur la détermination des phases. De même, pour le paramètre d'ordre, on notera $\Delta\rho = \sqrt{[\Delta\rho]_1^2 + [\Delta\rho]_2^2}$.

Afin d'établir ces incertitudes, nous faisons un parallèle entre des variables linéaires réparties suivant une distribution gaussienne, et les phases étudiées réparties suivant une distribution de Von Mises.

Estimation de $[\Delta\mu]_1$

Considérons une variable aléatoire x gaussienne non circulaire de valeur moyenne μ_0 , et de variance σ_0^2 . Pour un échantillon de N mesures, la moyenne et la variance expérimentales ont respectivement pour expressions [84]:

$$\begin{aligned} \mu &= \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N x_j \\ \sigma^2 &= \frac{1}{N-1} \sum_{j=1}^N (x_j - \mu)^2 \end{aligned} \tag{3.3.10}$$

L'incertitude sur la détermination de la valeur moyenne dépend du nombre de mesures, mais également de l'intervalle de confiance avec laquelle nous désirons exprimer μ , elle s'écrit :

$$\Delta\mu = \frac{\sigma_\mu}{\sqrt{N}} t_{vP} \quad \{3.3.11\}$$

Où t_{vP} est le coefficient de Student pour un échantillon ayant $v = N - 1$ degrés de liberté, pour un intervalle de confiance P .

Revenons maintenant au cas des N_{Col} variables circulaires φ_j , réparties suivant la distribution de Von Mises, de valeur moyenne μ , et de « concentration » k . Le calcul de la variance expérimentale n'est pas aussi simple que pour des variables non cycliques. L'expression analogue à {3.3.11} pour des variables cycliques est :

$$[\Delta\mu]_1 \approx \arcsin(\sigma_\mu \cdot t_{vP}) \quad \{3.3.12\}$$

Où la variance expérimentale $\sigma_\mu^2 = \frac{1}{\sqrt{N_{Col} \cdot k \cdot A_1(k)}}$.

Pour établir cette expression, il faut dans un premier temps exprimer les densités de probabilités des grandeurs $C = \frac{1}{N_{Col}} \sum_{j=1}^{N_{Col}} \cos \varphi_j$ et $S = \frac{1}{N_{Col}} \sum_{j=1}^{N_{Col}} \sin \varphi_j$, et connaissant les relations reliant ces grandeurs à la phase moyenne expérimentale : $\tan \mu = \frac{S}{C}$, il est possible de calculer σ_μ [72, 85].

Estimation de $[\Delta\mu]_2$

Il s'agit maintenant d'estimer l'incertitude sur la phase moyenne provenant des incertitudes sur la détermination des phases individuelles θ_j des colonies : on parle de propagation d'erreurs.

Supposons qu'une variable aléatoire y soit liée à la variable x précédente : $y = y(x)$. On peut alors montrer [70], en faisant un développement de Taylor au voisinage de $x = \mu_x$ que la valeur moyenne de y peut être approximée par $\mu_y \approx y(\mu_x)$, et que sa variance est

$\sigma_y^2 = \left[\frac{dy}{dx} \Big|_{x=\mu_x} \cdot \sigma_x \right]^2$. La généralisation de ce résultat à une fonction de n variables x_i

indépendantes de valeur moyenne μ_i , $y = y(x_1, x_2, \dots, x_n) = y(\vec{x})$ donne pour la valeur moyenne de y :

$$\mu_y = y(\mu_1, \mu_2, \dots, \mu_n) = y(\vec{\mu}) \quad \{3.3.13\}$$

Et pour l'écart-type :

$$\sigma_y = \sqrt{\sum_{i=1}^n \left(\left. \frac{\partial y}{\partial X_i} \right|_{\vec{x}=\vec{\mu}} \right)^2} \sigma_i^2 \quad \{3.3.14\}$$

En ce qui concerne maintenant les phases des colonies, l'équation {3.3.9} donne la dépendance de la phase moyenne $\mu = \mu(\varphi_1, \dots, \varphi_{N_{Col}})$.

Les phases des colonies sont supposées indépendantes, nous pouvons donc estimer $[\Delta\mu]_2$ en appliquant {3.3.14} à l'expression précédente.

Soit φ_j la moyenne de θ_j ; et $\delta\varphi_j$ l'incertitude sur la détermination de la valeur de la phase.

D'après {3.3.14}, l'incertitude sur la détermination de la phase moyenne de l'ensemble des oscillateurs s'écrit :

$$[\Delta\mu]_2 = \sqrt{\sum_{j=1}^{N_{Col}} \left(\left. \frac{\partial \mu}{\partial \theta_j} \right|_{\vec{\theta}=\vec{\varphi}} \right)^2} \delta\varphi_j^2 \quad \{3.3.15\}$$

Pour expliciter cette incertitude, exprimons dans un premier temps μ en fonction de φ_j ; d'après {3.3.9} :

$$\left\{ \begin{array}{l} \mu = \arctan \left(\frac{\sum_{j=1}^{N_{Col}} \sin \varphi_j}{\sum_{j=1}^{N_{Col}} \cos \varphi_j} \right) \quad \text{si } \sum_{j=1}^{N_{Col}} \cos \varphi_j \geq 0 \\ \mu = \arctan \left(\frac{\sum_{j=1}^{N_{Col}} \sin \varphi_j}{\sum_{j=1}^{N_{Col}} \cos \varphi_j} \right) + \pi \quad \text{si } \sum_{j=1}^{N_{Col}} \cos \varphi_j \leq 0 \end{array} \right. \quad \{3.3.16\}$$

En supposant que $\delta\varphi_1 = \delta\varphi_2 = \dots = \delta\varphi_{N_{Col}} = \delta\varphi$, alors à partir de {3.3.15} et {3.3.16}, nous déduisons l'incertitude $[\Delta\mu]_2$:

$$[\Delta\mu]_2 = \frac{1}{N_{Col} \cdot \rho} \sqrt{\left\{ \cos^2 \mu \cdot \sum_{j=1}^{N_{Col}} \cos^2 \varphi_j + \sin^2 \mu \cdot \sum_{j=1}^{N_{Col}} \sin^2 \varphi_j + \frac{\sin 2\mu}{2} \cdot \sum_{j=1}^{N_{Col}} \sin 2\varphi_j \right\} \delta\varphi} \quad \{3.3.17\}$$

L'incertitude sur la phase moyenne μ de l'ensemble des colonies se déduit alors de {3.3.12} et {3.3.15} :

$$\Delta\mu = \sqrt{[\Delta\mu]_1^2 + [\Delta\mu]_2^2} \quad \{3.3.18\}$$

Incertitude sur la détermination de la déviation standard circulaire

Estimation de $[\Delta\rho]_1$

A présent, il faut estimer de manière analogue l'incertitude sur le paramètre d'ordre ρ : par analogie avec {3.3.11} l'incertitude purement statistique sur le paramètre d'ordre s'écrit : $[\Delta\rho]_1 = \frac{\sigma_\rho}{\sqrt{N_{Col}}} \cdot t_{vP}$, où σ_ρ^2 est la variance expérimentale de ρ . Par un raisonnement analogue au calcul de la variance de la phase moyenne, on peut calculer σ_ρ^2 , d'où l'on déduit l'incertitude purement statistique sur le paramètre d'ordre :

$$[\Delta\rho]_1 = \frac{1}{N_{Col}^{1/2}} \left[\left(1 - A_1^2(k) - \frac{A_1(k)}{k} \right) - \frac{1}{4N_{Col} \cdot k^2} \right]^{1/2} \cdot t_{vP} \quad \{3.3.19\}$$

Estimation de $[\Delta\rho]_2$

Enfin, pour exprimer l'incertitude sur ρ due aux incertitudes sur la détermination des phases des colonies, nous utilisons une expression similaire à {3.3.14} :

$$[\Delta\rho]_2 = \sqrt{\sum_{j=1}^{N_{Col}} \left(\left. \frac{\partial \rho}{\partial \theta_j} \right|_{\vec{\theta} = \vec{\varphi}} \right)^2} \delta\varphi_j^2. \text{ En remplaçant } \rho \text{ par son expression donnée par } \{3.3.9\}, \text{ nous}$$

pouvons expliciter l'expression précédente :

$$[\Delta\rho]_2 = \frac{1}{N_{osc}} \sqrt{\cos^2 \mu \cdot \sum_{j=1}^{N_{Col}} \sin^2 \varphi_j + \sin^2 \mu \cdot \sum_{j=1}^{N_{Col}} \sin^2 \varphi_j - \frac{\sin 2\mu}{2} \cdot \sum_{j=1}^{N_{Col}} \sin 2\varphi_j} \delta\varphi \quad \{3.3.20\}$$

De même que précédemment, l'incertitude sur ρ se déduit de {3.3.19} et {3.3.20} :

$$\Delta\rho = \sqrt{[\Delta\rho]_1^2 + [\Delta\rho]_2^2} \quad \{3.3.21\}$$

Le calcul de l'incertitude sur le paramètre d'ordre permet ensuite d'accéder à l'incertitude sur la détermination de la déviation standard circulaire. En effet, comme $\sigma = \sqrt{-2\ln\rho}$, alors l'incertitude sur σ s'écrit, en utilisant {3.3.14} :

$$\Delta\sigma = \left| \frac{d\rho}{d\sigma} \right| \Delta\rho = \frac{\Delta\rho}{\rho\sqrt{-2\ln\rho}} \quad \{3.3.22\}$$

Ces calculs d'incertitude sur la phase moyenne μ et la déviation standard circulaire σ permettent ainsi d'exprimer rigoureusement les caractéristiques de la distribution de phase d'un ensemble de colonies.

Chapitre 4

Évaluation du couplage

Nous allons présenter ici les différents protocoles expérimentaux que nous avons réalisés pour investiguer l'existence d'un couplage chez les cyanobactéries. Le fil directeur de ces expériences est de mettre en interaction deux ou plusieurs populations d'oscillateurs ayant initialement des phases d'oscillation différentes, et de voir si des modifications de phase s'opèrent au sein de ces populations.

Nous présenterons également un modèle théorique de couplage, en accord avec nos réalisations expérimentales. Puis, en s'appuyant sur des hypothèses vérifiées grâce à des simulations numériques, nous déterminerons la dépendance temporelle de la phase et du paramètre d'ordre, en fonction de la constante de couplage \mathcal{E} .

Enfin, nous confronterons nos observations expérimentales de la phase et de l'amplitude d'oscillation avec le modèle théorique, afin de déterminer une borne supérieure du couplage entre oscillateurs cyanobactériens.

4.1 Principes des expériences

L'investigation expérimentale du couplage consiste à mélanger deux populations de cyanobactéries en des proportions différentes : les mélanges sont constitués d'une population présente en minorité, et d'une population prépondérante. Nous désignerons par la suite comme « les minoritaires », la population contenant le moins de cellules, et par « les majoritaires », la population prépondérante en nombre d'oscillateurs.

Les mélanges d'oscillateurs seront constitués d'une population de cyanobactéries minoritaires dotées du rapporteur de la luciférase (souche AMC 462, ou AMC 412), et d'une souche majoritaire « sauvage », et donc non lumineuse (*Synechococcus elongatus* PCC 7942). Il faut bien noter ici que même si les cyanobactéries de la population majoritaire n'émettent pas

de bioluminescence, elles ont des horloges strictement identiques à celles de la population luminescente.

Nous aurions pu penser à utiliser pour chaque population un rapporteur de la luciférase de couleur différente, comme cela a déjà été fait [86], avec des luciférases provenant de deux espèces de vers luisants: une des deux protéines provient du ver *Phrixothrix vivianii* (FIG. 4-1a), et catalyse l'émission de bioluminescence verte, et l'autre est extraite du ver *P. hirtus* et catalyse l'émission de bioluminescence rouge. Les spectres d'émission de ces deux luciférases sont représentés FIG. 4-1b, et sont centrés respectivement sur les longueurs d'onde $\lambda = 549$ nm et $\lambda = 622$ nm. L'utilisation simultanée de ces rapporteurs a permis de suivre l'activité de deux promoteurs au sein d'une même cyanobactérie.

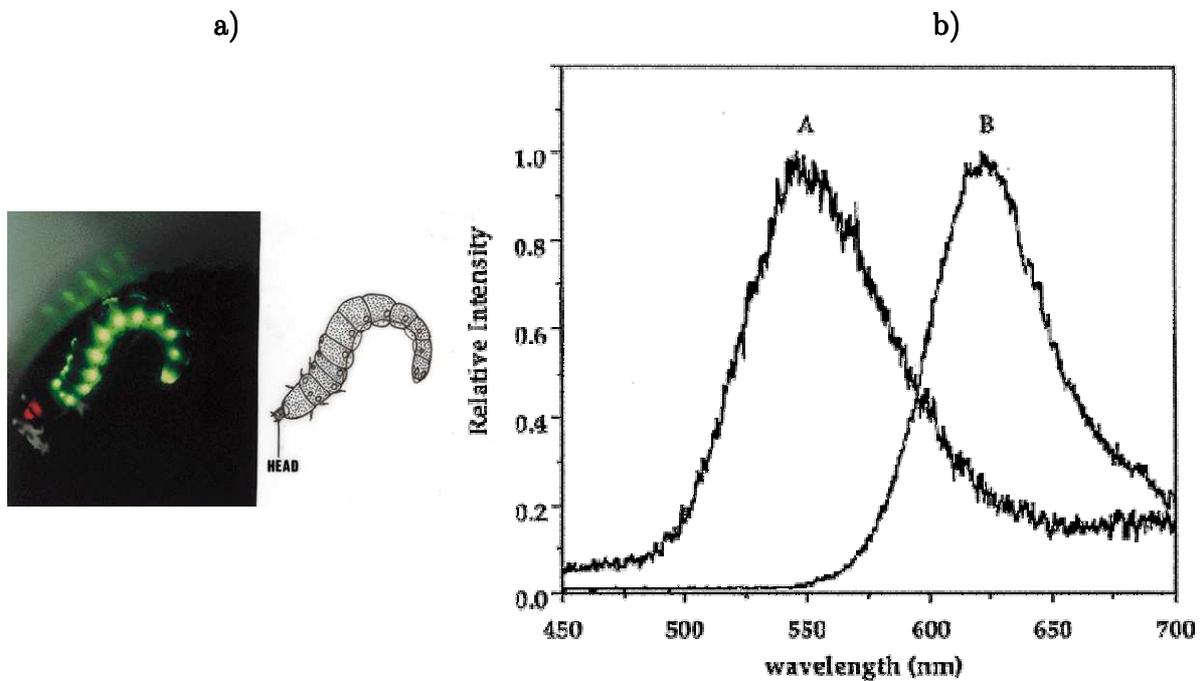


FIG. 4-1 Spectre d'émission a) Femelle du ver luisant *Phrixothrix hirtus* (gauche) émettant sa propre bioluminescence et (droite) représentation schématique montrant la tête et les antennes. C'est de la tête du ver luisant qu'est extraite la luciférase rouge. **b)** Spectres de bioluminescence *in vitro* des deux protéines de la luciférase provenant du ver *Phrixothrix*.

(D'après Viviani, V., et al., « *Cloning, Sequence Analysis, and Expression of Active Phrixothrix Railroad-Worms Luciferase: Relationship between Bioluminescence Spectra and Primary Structures* », *Biochemistry* 1999 38: p. 8271-8279).

Toutefois, en ce qui concerne nos expériences, du fait de la forte proportion d'une population par rapport à l'autre, l'émission de la population majoritaire aurait recouvert largement l'émission de la population minoritaire, d'autant que les spectres d'émission de bioluminescence sont larges [87]. Dès lors, afin d'éviter tout risque de masquer le signal émis par les minoritaires, la meilleure alternative consiste à utiliser pour la population majoritaire des cyanobactéries non luminescentes.

Enfin, nous avons vu (3.2.4) que la quantité de photons émise par les bactéries est négligeable devant la quantité de photons reçue de la part de l'éclairage externe ; ceci permet donc d'exclure toute influence éventuelle de la lumière provenant de la bioluminescence sur l'horloge circadienne des cyanobactéries.

4.1.1 Distribution uniforme de phases

Considérons deux oscillateurs couplés de phases initiales φ_i^0 et φ_j^0 . Selon la nature du couplage, la vitesse à laquelle les oscillateurs synchronisent leur phase dépend de la différence de phase initiale $\varphi_i^0 - \varphi_j^0$. C'est pourquoi, afin de maximiser la possibilité de détecter un couplage entre oscillateurs circadiens, nous avons cherché à faire interagir des oscillateurs dont les différences de phases initiales $\varphi_i^0 - \varphi_j^0$ recouvrent toutes les valeurs possibles (modulo 2π).

Pour ce faire, nous mettons en interaction une population minoritaire de cyanobactéries ayant une distribution de phases « quasi uniforme » avec une population d'oscillateurs entraînés majoritaires. Nous nous attendons donc à ce que, du fait d'un couplage, les oscillateurs de la population minoritaire synchronisent leur phase avec celle de la population majoritaire. La distribution de phases au sein de la population minoritaire ne serait donc plus uniforme, mais une phase moyenne convergeant vers celle des majoritaires devrait émerger.

Dans un premier temps, nous entraînons (par décongélations) 8 populations de cyanobactéries identiques, à des phases différentes espacées successivement de $\pi/4$. Par la suite, nous noterons ces 8 phases A, B, \dots, H (FIG. 4-2). Nous réalisons ensuite un mélange de ces 8 populations, en des proportions identiques, afin de générer la population ayant une distribution de phase « quasi uniforme » (FIG. 4-2bc). Puis cette population est mélangée à une population d'oscillateurs entraînée à la phase A . Nous effectuons dans les microplaques différents mélanges de populations d'oscillateurs, tous ayant une $DO_{750\text{nm}} = 0.025$:

- Afin de contrôler les phases des 8 populations entraînées, nous suivons les oscillations de bioluminescence de chacune de ces populations.
- Nous étudions aussi le mélange des 8 populations de phases différentes, afin de vérifier si l'oscillation de bioluminescence est annihilée, preuve que la distribution est bien uniforme.
- Enfin, l'étude du couplage est réalisée en mélangeant la population entraînée (constituée de N_M oscillateurs), avec la population ayant théoriquement une distribution uniforme

(constituée de N_m oscillateurs), avec un N_m/N_M égal à $1/10$. La population majoritaire utilisée est soit celle de phase A , soit celle de phase B .

La FIG. 4-2a montre les oscillations de bioluminescence de chacune de ces 8 populations. Afin de faire une estimation du déphasage entre celles-ci, nous repérons le second maximum de bioluminescence des oscillations moyennes des populations A à H . Puis, nous déterminons la période, commune à toutes les oscillations (ici, $T = 24.1 \pm 1.1$ h). Le déphasage par rapport à l'oscillation de la population A est alors donné par $\Delta\varphi = \frac{t_{Max} - t_{Max}^A}{T} \times \pi$, où t_{Max}^A

est l'instant auquel le maximum de l'oscillation de A est atteint, et t_{Max} est l'instant auquel les populations B à H atteignent le maximum de l'oscillation de bioluminescence. Nous vérifions ainsi (FIG. 4-2) que les déphasages observés sont ceux après les décongelations.

En ce qui concerne le mélange contenant les 8 phases, après les 4 premiers jours d'expérience, le régime de détection surfacique est atteint, et on constate effectivement que le signal de bioluminescence n'oscille pas (FIG. 4-2d).

Cette expérience permet simplement de conclure que le couplage entre oscillateurs – s'il existe - doit être faible et ce, quelque soit l'écart entre les phases des minoritaires et des majoritaires. Après une dizaine de jours d'interaction, aucune oscillation n'apparaît sur les signaux de bioluminescence émis par ces mélanges. Toutefois, l'absence d'oscillation ne permet pas d'aller au-delà de cette conclusion qualitative et en particulier, elle ne permet pas de déterminer une borne supérieure de la constante de couplage. C'est pourquoi nous avons élaboré un autre protocole expérimental, explicité ci-après.

Le principe de l'expérience que nous allons présenter ci-dessous est similaire au précédent : nous mélangeons une population de cyanobactéries minoritaires (luminescentes) avec une population de cyanobactéries majoritaires (non luminescentes). Cependant cette fois, les deux populations sont préparées de sorte qu'elles présentent des distributions de phases similaires mais de valeurs moyennes différentes. L'intérêt de ce protocole est que l'on a des oscillations de la population minoritaire dès le début de l'expérience ; il sera donc possible de déterminer la phase moyenne, et de détecter une éventuelle modification de phase due au couplage avec les majoritaires.

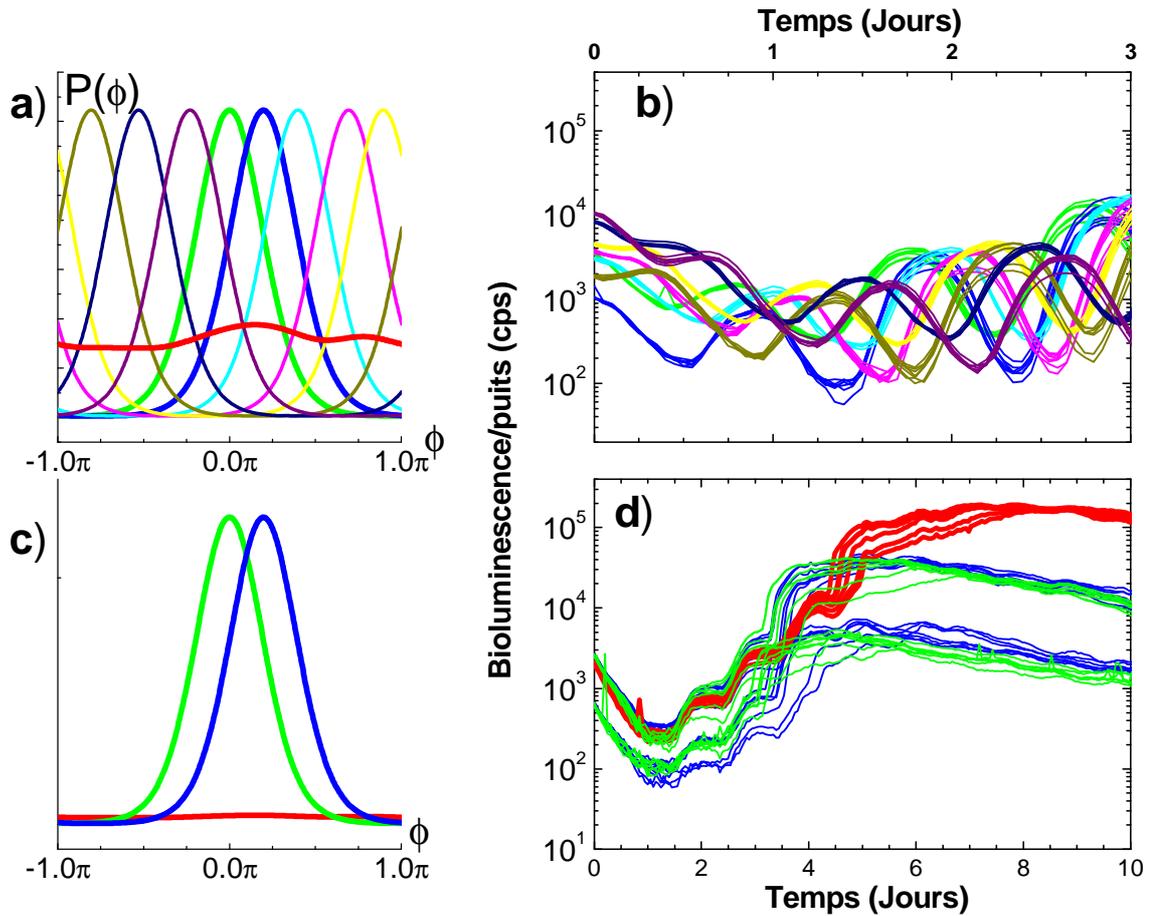


FIG. 4-2 Etude du couplage grâce à une population d'oscillateurs de phases distribuées quasi-uniformément. Une population de cyanobactéries est entraînée à 8 phases différentes, espacées successivement de $\pi/4$. **a)** Distribution de phases théoriques initiales des 8 populations (même code de couleurs), supposées être des distributions de Von Mises, de déviation standard $\sigma = 0.68$ rad, conformément à ce que nous avons estimé en 3.2.7. Nous estimons la valeur moyenne à partir de la position du 1^{er} maximum d'intensité des oscillations de bioluminescence de (b). La courbe rouge montre la distribution de phases résultant de la somme arithmétique de ces distributions, qui est donc théoriquement la distribution de phase au sein du mélange des 8 phases. **b)** Oscillations de bioluminescence des populations A, B, \dots, H . Chaque couleur fait référence à une phase d'oscillation. Pour chaque phase, on dispose de 8 puits. **c)** Distributions théoriques relatives des phases du mélange minoritaires+majoritaires. La population minoritaire (en rouge), est mélangée à une population majoritaire de phase A (en vert), ou B (en bleu). **d)** Bioluminescence de puits individuels contenant une proportion égale de chaque phase A à H (courbe rouge). Nous étudions aussi le signal qu'émet cette population, quand elle est mélangée à une population majoritaire de phase A, ou de phase B, à un rapport $N_m/N_M = 1/10$ (respectivement courbes vertes et bleues). Le mélange minoritaire+majoritaire ne présente pas d'oscillations significatives.

4.1.2 Interaction entre 2 populations entraînées de phases initiales différentes

Même pour un couplage faible, on peut penser que les effets seront d'autant plus visibles que les oscillateurs seront en interaction sur un intervalle de temps long.

L'obstacle majeur limitant la durée de nos expériences est l'assèchement des puits. La présence des fentes sur le film les recouvrant entraîne l'évaporation du milieu dans les puits, ce qui conduit à l'assèchement au bout d'environ 1-2 semaines d'expérience. Afin de contourner ce problème, nous avons dans un premier temps pensé à réaliser dans des fioles les mêmes mélanges de cellules que ceux mis en plaques pour le suivi temporel de la bioluminescence.

Ces fioles sont ensuite conservées dans un incubateur programmé pour avoir strictement les mêmes conditions de lumière et de température que la chambre contenant les microplaques. Le but étant, au bout d'une semaine d'expérience, de réaliser une nouvelle microplaque contenant les cultures conservées dans l'incubateur. Les cellules ont *a priori* évolué dans des environnements identiques dans l'incubateur et dans la chambre contenant les microplaques. L'objectif est de remplacer au bout d'une semaine, les plaques suivies en bioluminescence, par des plaques réalisées avec les cultures « fraîches » conservées dans l'incubateur.

Il faut noter cependant qu'en général, les cultures conservées dans l'incubateur ont un taux de division plus grand que celui des cultures identiques en microplaques. En effet, même si les conditions de température, lumière et CO_2 sont sensiblement les mêmes dans l'incubateur et dans la chambre de croissance des microplaques, en réalité, les cellules perçoivent un environnement qui diffère selon qu'elles sont conservées en plaques ou en fiole. Une fiole constitue en effet un environnement plus aéré que les puits d'une microplaque, de sorte que dans l'incubateur des cellules reçoivent en moyenne une quantité de CO_2 , et de O_2 plus importante que dans les plaques. De plus, dans les fioles, les cultures sont agitées en permanence, ce qui favorise la croissance cellulaire. Par conséquent, avant de réaliser des plaques avec les échantillons « frais » de l'incubateur, il est nécessaire de diluer les cultures contenues dans les fioles entre 1 à 5 fois, pour atteindre une densité optique similaire à celles des cultures contenues dans les puits de la première plaque.

Nous avons donc réalisé une expérience suivant ce protocole : nous avons entraîné 4 populations de cyanobactéries initialement identiques à 4 phases différentes, notées A , B , C , D , telles que A et C d'une part, et B et D d'autre part, sont en opposition de phase. Une fraction de ces cultures est ensuite mise en plaque (à une $DO_{750\text{ nm}} = 0.1$), et l'autre fraction réservée dans des fioles destinées à l'incubateur. La FIG. 4-3ab montre les oscillations de bioluminescence obtenues pour ces 4 conditions expérimentales : les premiers jours d'expérience, les oppositions de phases sont bien respectées, entre les populations A et C , et entre B et D .

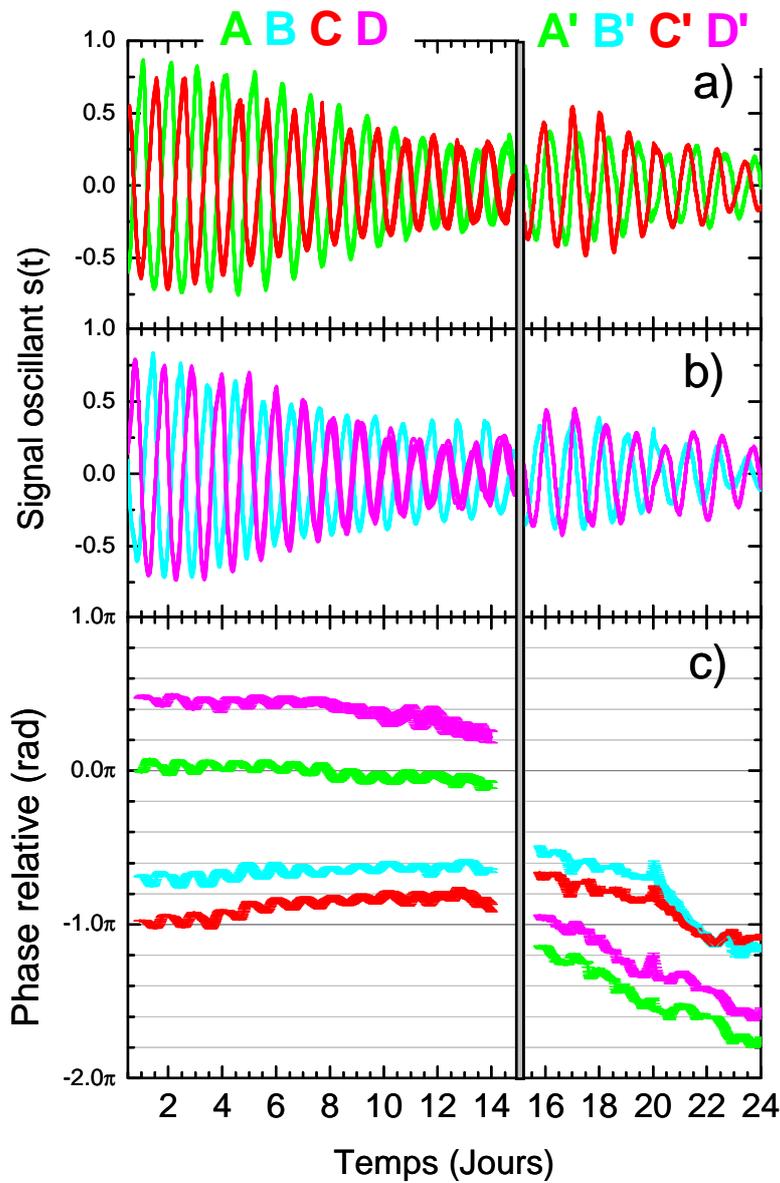


FIG. 4-3 Comparaison entre des oscillateurs mis en plaque et des oscillateurs ayant séjourné plusieurs jours dans l'incubateur. Deux couples de populations d'oscillateurs sont entraînés à des phases différentes, A, B, C, et D, telles que : A et C d'une part, et B et D d'autre part sont en opposition de phase. Une partie des cultures est mise en plaque pour un suivi immédiat de la bioluminescence. La densité optique initiale des cultures mises en plaque est $DO_{750\text{ nm}} = 0.1$. L'autre partie est conservée dans l'incubateur avant d'être mise en plaque 15 jours après. **a)**, **b)** Oscillations de bioluminescence de puits individuels (~ 8 à 12 puits par conditions expérimentales). La double barre grisée indique le changement d'échantillon. **c)** Phases des puits individuels dans un repère tournant à la vitesse $\omega_0 = 6.03$ rad/jour. En l'espace de 15 jours, l'écart de phase entre les populations se réduit de ~ 1 rad, et cet écart est encore plus petit pour les populations ayant séjourné dans l'incubateur. Les pentes des phases des populations A' à D' sont négatives : la pulsation est inférieure à $\omega_0 = 6.03$ rad.

A l'issue de ces 15 jours, de nouvelles microplaques sont réalisées, contenant les échantillons dilués provenant de l'incubateur. Soient A', B', C', et D' les phases des échantillons correspondant respectivement aux anciens échantillons de phase A, B, C, et D. On remarque (FIG. 4-3ab) que l'opposition de phase n'est plus respectée pour les couples (A',C'), et (B',D').

Afin de quantifier ces changements, nous calculons la phase déroulée $\varphi_{DER}(t)$ de ces oscillations. Rappelons que la pente de $\varphi_{DER}(t)$ est égale à la pulsation des oscillations : $\frac{d\varphi_{DER}(t)}{dt} = \omega_0(t)$. Puis nous calculons la phase relative en soustrayant à toutes ces phases déroulées une même phase de référence $\varphi_{REF}(t) = \omega_{REF} \cdot t$, où $\omega_{REF} = 6.03$ rad/jour.

La FIG. 4-3c montre que durant les 15 premiers jours, les phases relatives des populations A à D ont des pentes un peu différentes de zéro, ce qui montre que $\omega_0(t)$ diffère légèrement de ω_{REF} . On constate de plus que les écarts de phases se réduisent entre les 4 populations. En effet, initialement, les phases sont réparties sur un intervalle de largeur ~ 4.6 rad. Puis au terme des 15 jours, l'écart maximal observé entre les phases est égal à ~ 3.5 rad (FIG. 4-3c).

Nous constatons donc que les phases de ces populations dérivent vers une valeur commune, ce qui laisse supposer l'existence d'un entraînement externe indésirable. L'écart des phases est encore plus réduit pour les populations issues de l'incubateur : dès leur sortie de l'incubateur, les populations ont des phases d'oscillations réparties sur un intervalle de largeur ~ 2.0 rad. De ce fait, les écarts de phases ne sont pas ceux que l'on attendait entre les populations A' à D'. Par ailleurs, les phases initiales de ces populations diffèrent des phases finales des populations A à D correspondantes. Cet écart diffère selon le couple de phases considéré : pour les couples (B, B'), et (C, C'), l'écart est nettement moins grand que pour les couples (A, A'), et (D, D') ; pour ces derniers, les populations A et A' d'une part, et D et D' d'autre part, sont en quasi opposition de phase. Par ailleurs, les phases relatives des populations A' à D' ont des pentes négatives, ce qui montre que pour ces populations, la pulsation d'oscillation est inférieure à ω_{REF} . On peut d'ailleurs l'estimer en faisant un ajustement linéaire des phases déroulées : $\omega_0 = 5.8$ rad/jour.

Nous voyons donc que les populations ayant séjourné dans l'incubateur ont eu une évolution de leur horloge circadienne différente de celles mises en plaque immédiatement.

Ainsi, malgré un environnement sensiblement identique dans les microplaques et dans les fioles, une perturbation extérieure a altéré fortement l'évolution des phases des populations conservées dans l'incubateur. Pour connaître la nature de cette perturbation nous avons examiné point par point les étapes qui différencient les cellules mises en plaques directement, de celles séjournant pendant quelques jours dans l'incubateur.

Nous avons déjà évoqué dans la partie 3.2.6 les effets d'une dilution importante sur la phase de l'oscillation circadienne chez la cyanobactérie. Rappelons en effet que la dilution a un effet non négligeable sur la phase des oscillations, et que l'intensité de la perturbation engendrée

par la dilution est liée à l'heure circadienne à laquelle la dilution est effectuée. Cependant, nous avons vu qu'il était possible de s'affranchir de ces effets pour des facteurs de dilution de l'ordre de 5-6, ce qui est le cas pour l'expérience présentée ci-dessus. La dilution ne permet donc pas d'expliquer les déphasages observés entre les cultures ayant séjourné dans l'incubateur, et celles mises en plaques.

Nous avons aussi mentionné précédemment les conditions de croissance des cellules dans l'incubateur : elles ont des sources d'énergie plus abondantes que celles des microplaques ; cependant, ceci ne fournit pas une explication suffisante pour les décalages de phases observés, puisque nous avons montré (3.2.3) qu'une modification de l'intensité lumineuse reçue par les cyanobactéries n'influe essentiellement que sur l'intensité de bioluminescence émise. Il y a certes aussi des effets sur la phase d'oscillation, mais insuffisants pour expliquer l'importante modification de phase observée.

Nous pensons que le déphasage observé peut provenir du rythme des dilutions. En effet, pour limiter l'impact de la dilution, nous diluons fréquemment (environ une fois tous les 1-2 jours), afin que le facteur de dilution reste inférieur à 5. Ainsi, les fioles sont souvent sorties de l'incubateur, diluées sous la hotte (qui n'est pas régulée en température, et CO₂), avant d'être remises dans l'incubateur. Il se peut donc que le changement environnemental à une fréquence proche de celle des oscillateurs, même s'il est de courte durée, perturbe l'horloge circadienne des cellules.

Enfin, il peut aussi s'agir de la stabilité de l'incubateur : il n'est pas impossible qu'à long terme (c'est-à-dire sur une durée d'une quinzaine de jours) les conditions de lumière, température, et CO₂ ne soient pas strictement constantes, d'où la dérive de phase observée. Néanmoins, en ce qui concerne toutes les autres expériences présentées par la suite, ce problème de stabilité ne se pose pas, puisque les cultures séjournent au maximum 2 jours dans l'incubateur avant d'être mises en plaques

En conclusion, ce procédé expérimental de croissance en fioles et en plaques en parallèle doit être exclu, en raison des dérives incontrôlables des phases d'oscillations liées à des environnements différents.

4.1.3 Principe de suivi à long terme

Nous avons établi un procédé expérimental permettant de résoudre convenablement cette question de l'assèchement des puits. Quand le milieu cellulaire est en grande partie évaporé dans les puits, nous sortons les plaques de leur chambre de croissance, et après avoir ôté le film plastique les recouvrant, nous complétons les puits à 250 µl avec du milieu de culture à 30°C. La fin de la préparation est identique à celle expliquée en 3.1.3 : les plaques sont scellées, puis le film transparent perforé avant de remettre ces plaques dans leur chambre de croissance. L'ajout du milieu est un procédé qui nécessite une minutie particulière afin de ne pas perturber le dépôt des cellules formé dans le fond du puits, et éviter ainsi toute perturbation éventuelle de

rythme circadien des cellules. Cette méthode s'avère efficace et perturbe dans une moindre mesure l'oscillation de bioluminescence mesurée, comme le montre la FIG. 4-4a : deux populations oscillant initialement en opposition de phase restent déphasées de 180° après l'ajout du milieu dans les puits. La FIG. 4-4b montre la phase instantanée moyenne pour ces 2 populations d'oscillateurs, tracée dans un repère tournant à la vitesse $\omega_0 = 6.03$ rad/jour. L'ajout de milieu perturbe très peu la phase d'oscillation.

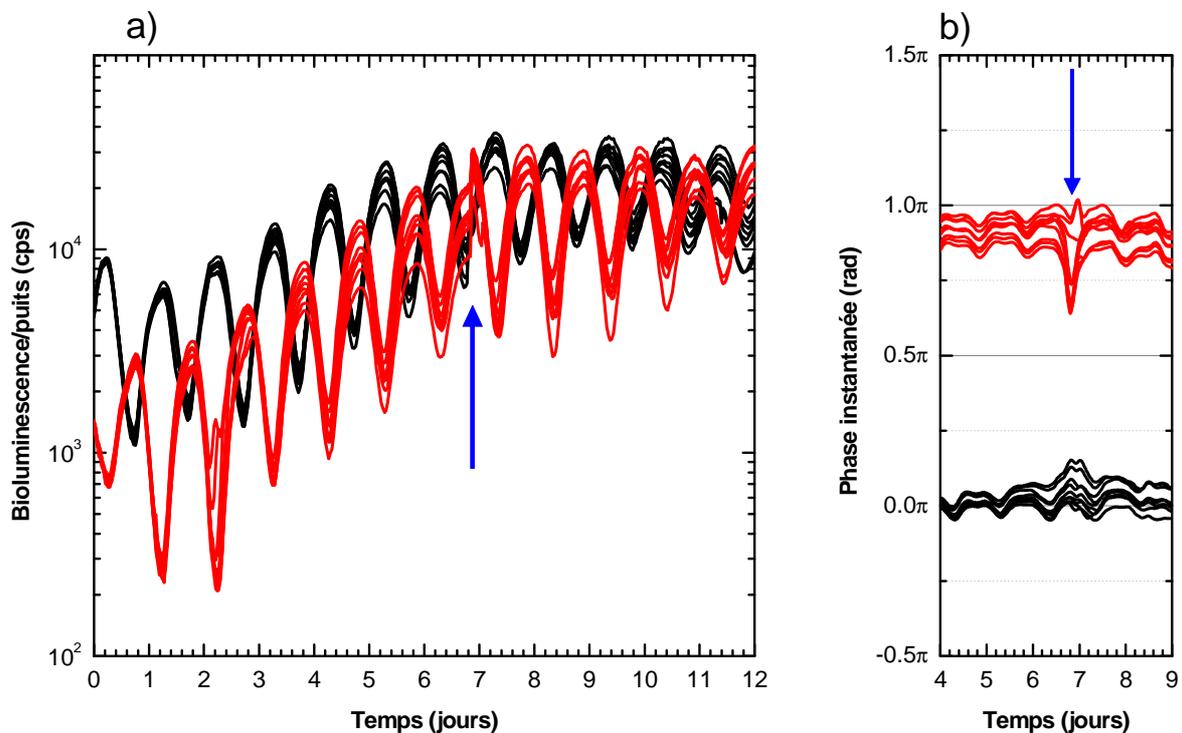


FIG. 4-4 Effet d'un ajout de milieu de culture dans les microplaques. a) Bioluminescence de puits individuels de populations A (ligne noire) et B (ligne rouge) entraînées à des phases opposées. Les flèches indiquent l'instant où le milieu est ajouté au puits. L'opposition de phase est conservée même après l'ajout de milieu. **b)** Phases instantanées de ces oscillations (même code de couleurs) dans un repère tournant à la vitesse $\omega_0 = 6.2$ rad/jour. Malgré les corrections des discontinuités sur les courbes de bioluminescence, il reste parfois des petites imperfections, d'où les perturbations locales apparaissant sur les courbes rouges à la date de l'ajout du milieu.

Le rajout du milieu de culture s'accompagne cependant d'une discontinuité dans la courbe de bioluminescence. Nous avons vu auparavant (3.3.1) que cet accroissement brutal de l'intensité de bioluminescence émise provient de l'augmentation du gain du rapporteur de la luciférase. En effet ce gain est relié à l'état métabolique des cellules. Un apport de nutriments accroît ce gain, et entraîne donc les discontinuités observées. Cependant, la grandeur pertinente est la phase d'oscillation, qui reste stable malgré notre intervention extérieure. Nous avons donc ici un moyen efficace et peu perturbateur d'éviter le dessèchement des puits.

4.2 Recherche expérimentale d'un couplage

Conformément au protocole explicité au début de la partie précédente, nous réalisons des mélanges de deux populations de cyanobactéries entraînées identiquement à des phases différentes. Le rapport entre les deux populations est égal à 1/20.

Nous verrons dans la partie traitant du modèle de couplage, que théoriquement, sous l'effet du couplage, la phase moyenne de la population minoritaire, tend vers la phase moyenne de la population majoritaire, qui reste constante. C'est donc ce que nous voulons détecter expérimentalement. Nous montrerons aussi que la précision de l'estimation de la valeur de la constante de couplage augmente avec la durée de l'expérience. C'est aussi pourquoi nous cherchons à suivre l'évolution temporelle de la bioluminescence de la population minoritaire sur une durée la plus grande possible.

Les deux populations – minoritaire et majoritaire - utilisées pour nos expériences ont théoriquement des paramètres d'ordre initiaux égaux : $\rho_M^0 = \rho_m^0 = \rho_0$, (les indices minuscules et majuscules se réfèrent respectivement aux populations minoritaires et majoritaires) puisqu'elles sont entraînées dans les mêmes conditions. Nous choisissons de travailler avec 4 phases initiales, notées A, B, C, D, séparées successivement d'environ $\pi/2$ rad, comme représenté dans l'insert de la FIG. 4-5. Nous réalisons ainsi dans des microplaques différentes combinaisons de phases initiales (μ_m^0, μ_M^0) : depuis (a,A), (a,B),...jusqu'à (d,C), (d,D) ; les lettres minuscules et majuscules faisant référence respectivement à la phase moyenne de la population minoritaire et de la population majoritaire.

La FIG. 4-5a présente la bioluminescence de puits individuels, contenant des mélanges de la même population minoritaire, en interaction avec 4 populations majoritaires différentes : (a,A), (a,B), (a,C), (a,D), suivie sur une durée d'environ 40 jours. En parallèle, nous suivons également la bioluminescence de puits ne contenant que des souches luminescentes, entraînées aux phases A, B, C, et D, afin de nous assurer que les déphasages observés expérimentalement correspondent bien aux entraînements réalisés.

Par ailleurs, la comparaison de l'intensité de bioluminescence émise par des puits ne contenant que des souches luminescentes, avec celle émise par des puits contenant des mélanges

de souches, renseigne sur le rapport de concentration absolue entre populations minoritaires et majoritaires (cf. 3.3.1). D'après la FIG. 4-5a, initialement, $N_m/N_M \cong 1/20$, et au terme de l'expérience la souche sauvage a crû plus vite que la souche munie du rapporteur de la luciférase, puisque le rapport devient : $N_m/N_M \cong 1/30$. Ce qui amplifie d'autant plus l'action de la population majoritaire sur les minoritaires.

Les FIG. 4-5b-c représentent les oscillations circadiennes $s(t)$ obtenues après avoir extrait les lignes de base des oscillations de bioluminescence de la FIG. 4-5a. Les puits contenant uniquement les souches luminescentes A et C conservent leur opposition de phase durant toute la durée de l'expérience ; par ailleurs, ces graphes montrent la grande reproductibilité des oscillations d'un puits à l'autre pour une même condition expérimentale.

Dans les puits contenant les mélanges des 2 populations, la population minoritaire semble ne pas être perturbée par la présence d'une population majoritaire oscillant avec une phase différente : en effet, quel que soit le couple de phase considéré, il n'apparaît pas de différence notable entre un mélange de populations de mêmes phases initiales et un mélange de populations de phases initiales différentes. Ceci confirme que le couplage entre oscillateurs circadiens, s'il existe, est faible.

Nous avons par la suite choisi de nous appuyer sur un modèle théorique, afin d'explorer la possibilité d'estimer une borne supérieure de cette constante de couplage.

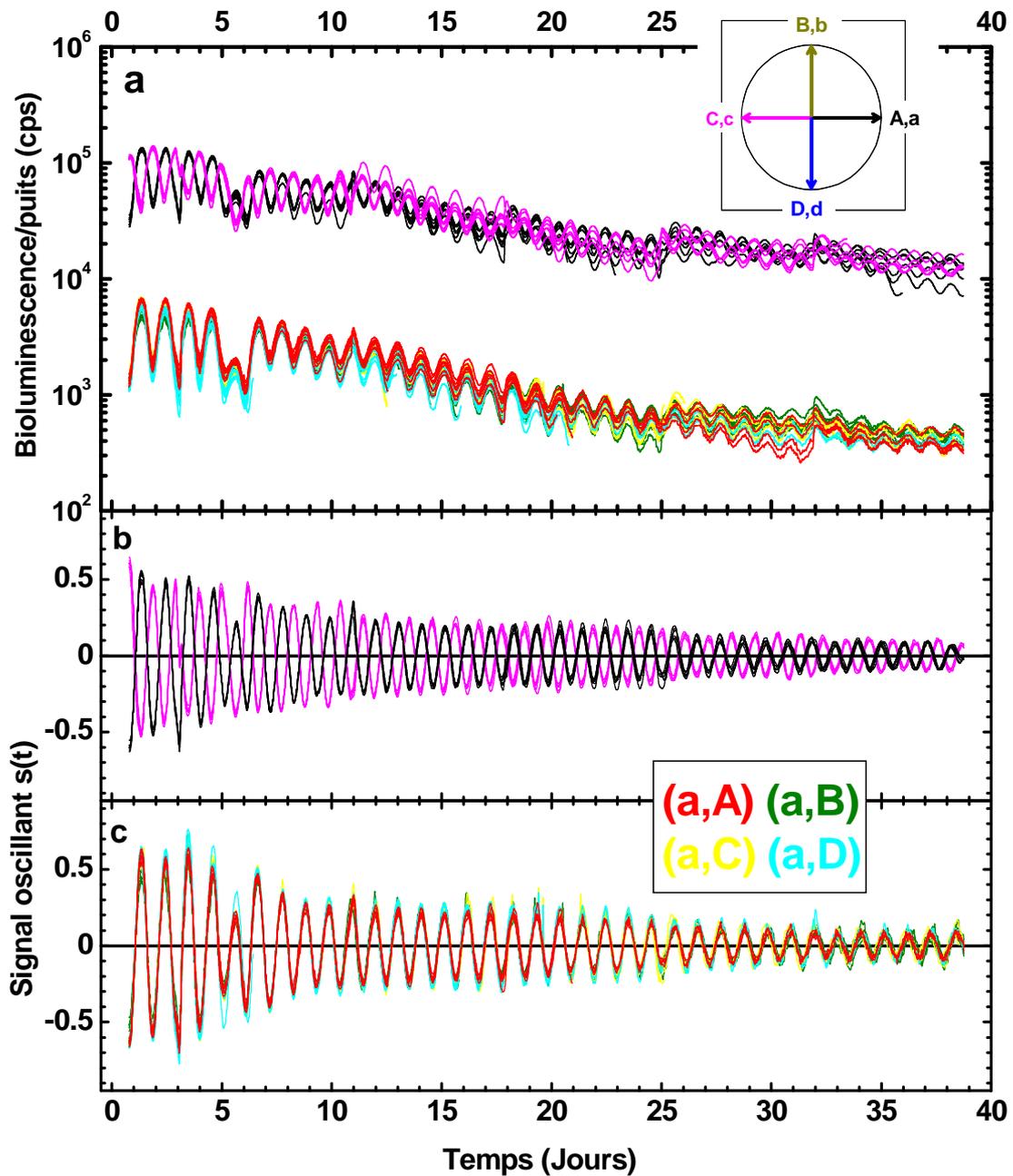


FIG. 4-5 Etude de l'interaction de 2 populations d'oscillateurs de phase d'oscillation initiale différentes. **Insert** Les 4 phases d'entraînement A, B, C, D sont séparées d'environ $\pi/2$. **a)** Suivi de la bioluminescence de puits individuels. Les courbes de plus fortes intensités de bioluminescence sont celles des puits ne contenant que des souches luminescentes, entraînées en opposition de phase. Les courbes de moins fortes intensités correspondent aux puits contenant un mélange composé d'une population luminescente minoritaire et d'une population non luminescente contenant 20 fois plus de cellules, avec 4 couples de phase différents. **b)** Oscillation circadienne pour les souches luminescentes seules, et **c)** pour les mélanges.

4.3 Description théorique de l'interaction entre oscillateurs

4.3.1 Modèle théorique

Nous allons présenter dans cette partie un modèle de couplage s'appuyant sur le modèle de Kuramoto évoqué dans la partie 2.6.2.

Dans un premier temps, nous rappelons les éléments essentiels de ce modèle, dans le cas où l'on considère l'interaction au sein d'une population d'oscillateurs entraînés. Nous décrirons notamment grâce à ce modèle l'interaction entre 2 populations d'oscillateurs entraînés. Enfin, afin de permettre la résolution analytique des équations de Fokker-Planck, nous faisons des hypothèses concernant la forme de la distribution de phase, que nous vérifierons grâce à des simulations numériques.

Nous allons étudier ici l'interaction au sein d'un ensemble d'oscillateurs ayant une distribution de phase initiale fortement déséquilibrée : une forte proportion des phases est distribuée autour d'une phase moyenne μ_M^0 , et une minorité autour d'une phase moyenne μ_m^0 . Le nombre d'oscillateurs de la population majoritaire N_M est environ 20 fois plus important que celui de la population minoritaire : $N_M/N_m = 20$. Par ailleurs, hormis la différence de phase moyenne, les distributions initiales des phases des 2 populations sont identiques, *i.e.* elles ont des formes et des largeurs similaires.

Comme les oscillateurs cyanobactériens peuvent être considérés comme des oscillateurs de phase, alors nous nous appuyons sur les équations de Kuramoto décrivant la dynamique des phases φ_k de N oscillateurs couplés :

$$\frac{d\varphi_k}{dt} = \frac{\varepsilon}{N} \sum_{j=1}^N \sin(\varphi_j - \varphi_k) + \xi_k(t) \quad \{4.3.1\}$$

Avec ici $N = N_M + N_m$.

L'équation de Fokker-Planck décrivant la dynamique de la distribution de phases au sein d'une population d'oscillateurs en interaction s'écrit :

$$\frac{\partial P(\varphi, t)}{\partial t} = \varepsilon \frac{\partial}{\partial \varphi} [(X \sin \varphi - Y \cos \varphi) P(\varphi, t)] + \frac{D}{2} \frac{\partial^2 P(\varphi, t)}{\partial \varphi^2} \quad \{4.3.2\}$$

Où X et Y sont les parties réelle et imaginaire du champ moyen complexe des phases.

Nous exprimons dans un premier temps ce champ moyen en discriminant la contribution des 2 populations d'oscillateurs. Soient $Z_M = \frac{1}{N_M} \sum_{j=1}^{N_M} e^{i\varphi_j} = \rho_M e^{i\mu_M}$ et

$Z_m = \frac{1}{N_m} \sum_{j=1}^{N_m} e^{i\varphi_j} = \rho_m e^{i\mu_m}$ les champs moyen complexes respectifs des populations majoritaires et minoritaires isolées. Alors le champ moyen généré par l'ensemble des 2 populations en interaction est donné par :

$$Z = \frac{1}{N_M + N_m} \left(\sum_{j=1}^{N_M} e^{i\varphi_j} + \sum_{j=1}^{N_m} e^{i\varphi_j} \right) \quad \{4.3.3\}$$

Ce qui donne alors :

$$Z = \frac{1}{N_M + N_m} (N_M \cdot Z_M + N_m \cdot Z_m) = \frac{20}{21} Z_M + \frac{1}{21} Z_m \quad \{4.3.4\}$$

Comme les populations minoritaires et majoritaires sont entraînées dans des conditions similaires, nous supposons que l'amplitude du champ moyen de chacune de ces populations est initialement la même : $\rho_M^0 = \rho_m^0 = \rho_0$. En outre, nous supposons que les largeurs des distributions de ces deux populations ont sensiblement la même évolution temporelle, c'est-à-dire que les paramètres d'ordre $\rho_M(t)$ et $\rho_m(t)$ conservent le même ordre de grandeur au cours de l'interaction. En effet, puisque nous sommes en présence d'un couplage faible, nous pouvons supposer que les effets de l'interaction ne changent pas fondamentalement le processus de diffusion au sein de chacune des populations. Sous cette condition, la contribution de la population minoritaire au champ moyen total peut être négligée : Z est essentiellement déterminée par les phases des oscillateurs de la population prépondérante : $Z \cong Z_M = X_M + iY_M$, avec X_M et Y_M les parties réelles et imaginaires du champ moyen des majoritaires. Dès lors, dans l'équation de Fokker-Planck {4.3.2}, le terme déterministe a pour expression :

$$X \sin \varphi - Y \cos \varphi \cong X_M \sin \varphi - Y_M \cos \varphi \cong \rho_M \cos \varphi \quad \{4.3.5\}$$

La force attractive s'exerçant sur l'ensemble des oscillateurs est donc essentiellement celle engendrée par les oscillateurs de la population majoritaire. De ce fait, la dynamique des distributions de phase pour les populations majoritaires et minoritaires est régie par les équations respectives :

$$\begin{aligned} \frac{\partial P_M(\varphi, t)}{\partial t} &= \varepsilon \frac{\partial}{\partial \varphi} [\rho_M \sin(\varphi - \mu_M) P_M(\varphi, t)] + \frac{D}{2} \frac{\partial^2 P_M(\varphi, t)}{\partial \varphi^2} \\ \frac{\partial P_m(\varphi, t)}{\partial t} &= \varepsilon \frac{\partial}{\partial \varphi} [\rho_m \sin(\varphi - \mu_m) P_m(\varphi, t)] + \frac{D}{2} \frac{\partial^2 P_m(\varphi, t)}{\partial \varphi^2} \end{aligned} \quad \{4.3.6\}$$

Nous avons montré que pour une population ayant initialement une distribution de phases gaussienne repliée, on peut approximer la distribution de phases par une distribution de Von Mises tout au long de l'évolution (2.6.2).

Nous allons faire la même hypothèse pour les deux populations en interaction, et approximer à chaque instant les distributions $P_M(\varphi, t)$ et $P_m(\varphi, t)$, par des distributions de Von Mises, caractérisées par leur « concentration » $k_M(t)$ et $k_m(t)$, et leur phase moyenne $\mu_M(t)$ et $\mu_m(t)$. Nous pouvons alors calculer l'évolution temporelle des phases et des concentrations des deux distributions, en multipliant chaque équation du système {4.3.6} par $e^{i\varphi}$, et en intégrant par rapport à φ entre $-\pi$ et π :

$$\begin{aligned} \frac{\partial \rho_M}{\partial(\varepsilon t)} &= \frac{\rho_M}{2} \cdot \left(\frac{2\rho_M}{k_M} - \frac{D}{\varepsilon} \right) \\ \frac{\partial \rho_m}{\partial(\varepsilon t)} &= \frac{\rho_m}{2} \cdot \left(\frac{2\rho_M}{k_m} \cdot \cos(\mu_M - \mu_m) - \frac{D}{\varepsilon} \right) \\ \frac{\partial \mu_m}{\partial(\varepsilon t)} &= \frac{\rho_M}{\rho_m} \cdot \left(1 - \frac{\rho_m}{k_m} \right) \cdot \sin(\mu_M - \mu_m) \end{aligned} \quad \{4.3.7\}$$

La phase moyenne de la population prépondérante reste constante au cours du temps : $\mu_M(t) = \mu_M(t=0) = \mu_M^0$.

Similairement à ce qui a été observé pour le cas d'une population d'oscillateurs en interaction, εt apparaît spontanément comme le temps réduit. De ce fait, hormis les conditions initiales, le rapport D/ε est le seul paramètre influençant l'évolution de la phase moyenne de la population minoritaire $\mu_m(\varepsilon t)$, ainsi que celle des paramètres d'ordre $\rho_M(\varepsilon t)$ et $\rho_m(\varepsilon t)$.

Ces équations sont résolues numériquement, et afin de vérifier la validité des approximations faites précédemment, nous comparons les paramètres obtenus via cette résolution avec ceux obtenus en simulant numériquement l'équation {4.3.1}.

4.3.2 Résolution analytique du système

Examinons brièvement les solutions que donne le système simplifié {4.3.7}. Nous décrivons ici l'importance de D/ε dans l'évolution temporelle des paramètres d'ordre et des phases moyennes des 2 populations en interaction.

Rappelons que les paramètres d'ordre initiaux sont égaux pour les deux populations en interaction : $\rho_M^0 = \rho_m^0 = \rho_0$. Nous avons vu 3.2.7 que la largeur de distribution initiale de phases après entraînement, et congélation-décongélation est $\sigma_0 = 1.01 \pm 0.29$ rad. Conformément à cette valeur, nous déterminons que le paramètre d'ordre initial vaut $\rho_0 = 0.67$. La FIG. 4-6 montre l'évolution des phases moyennes et des paramètres d'ordre pour des populations initialement déphasées de $\pi/2$, avec $\mu_M^0 = \pi/2$ rad, et $\mu_m^0 = 0$ rad, pour différentes valeurs de D/ε .

Pour les valeurs de $D/\varepsilon \geq 1$, les paramètres d'ordre convergent vers 0 : pour des temps infiniment longs, les phases des oscillateurs au sein de chaque population se désynchronisent. La diffusion de phase l'emporte sur le couplage, et on aboutit à des distributions uniformes pour les minoritaires, et les majoritaires.

Pour les valeurs de $D/\varepsilon < 1$, le couplage est suffisant pour empêcher la désynchronisation complète des oscillateurs dans les populations. Les paramètres d'ordre tendent vers des valeurs non nulles aux temps longs.

Enfin, on voit sur la FIG. 4-6c que le rapport D/ε a une influence minime sur l'évolution de la phase moyenne des minoritaires $\mu_m(\varepsilon t)$: on voit en effet que pour un rapport D/ε variant sur une gamme de 0.01 à 10, $\mu_m(\varepsilon t)$ n'est que faiblement affectée. Tandis que les paramètres d'ordre des deux populations sont fortement dépendants de la constante de diffusion, même pour des valeurs de εt proches de l'origine. La phase moyenne des minoritaires tend vers la phase des majoritaires, et ce quelle que soit la valeur du rapport D/ε . Nous allons à présent montrer quelques résultats obtenus en simulant les équations différentielles {4.3.1} de couplage, sans faire d'autres approximations que celles concernant la forme du couplage.

4.3.3 Simulation numérique

Nous générons dans un premier temps la distribution de phases des oscillateurs en interaction : une large majorité $N_M = 10000$ de phases indépendantes distribuées suivant une gaussienne de valeur moyenne $\mu_M^0 = \pi/2$, ou $\mu_M^0 = \pi$, et une minorité $N_m = 500$ distribuées suivant une gaussienne centrée sur 0. Puisque les deux populations sont entraînées dans les mêmes conditions alors les deux groupes de phases ont des déviations standard égales : $\sigma_m^0 = \sigma_M^0 = \sigma_0 = 0.9$ rad.

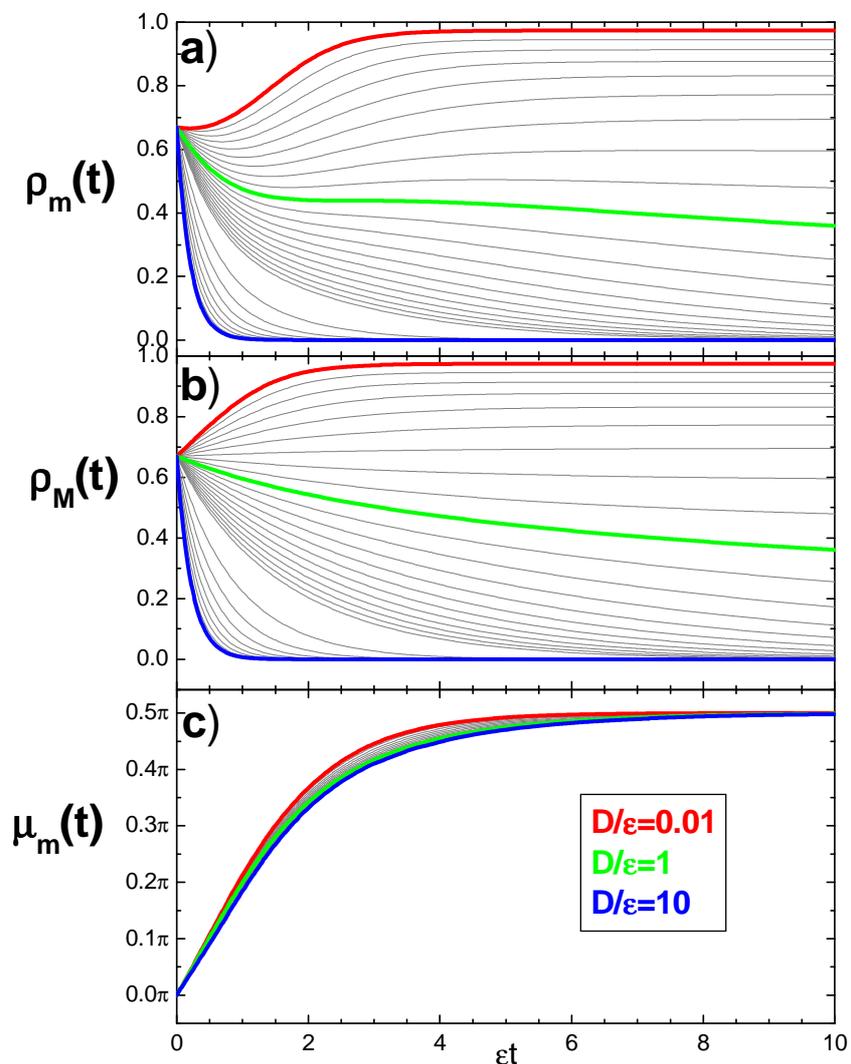


FIG. 4-6 Résolution analytique du système {4.3.7}, avec des paramètres d'ordre égaux pour les deux populations en interaction : $\rho_0 = 0.67$, et un déphasage initial $\mu_M^0 - \mu_m^0 = \pi/2$ rad. Le système est résolu pour des valeurs de D/ϵ variant de 0.01 à 10. **a)** Paramètre d'ordre des minoritaires et **b)** paramètre d'ordre des majoritaires pour chaque valeur de D/ϵ . Pour toutes les valeurs $D/\epsilon \geq 1$, les paramètres d'ordre tendent vers 0 : la diffusion de phase l'emporte sur le couplage et les distributions de phase deviennent uniformes. À l'inverse, pour $D/\epsilon < 1$, les paramètres d'ordre stationnaires sont non nuls. Les oscillateurs sont d'autant plus synchronisés que D/ϵ est petit. **c)** Phase moyenne des minoritaires. La phase ne dépend que faiblement du rapport D/ϵ .

Forme des distributions de phases

Afin d'obtenir les formes des distributions de phases, nous réalisons les histogrammes des phases des oscillateurs individuels à différents instants, sur un intervalle de largeur 2π pour les minoritaires, et les majoritaires. La FIG. 4-7 montre, pour $\varepsilon = 2.10^{-3}$ rad/h les distributions à différents instants. Il faut noter que nos simulations sont réalisées avec un nombre restreint d'oscillateurs, par conséquent, les histogrammes obtenus correspondent à un nombre de classes égal à 13 pour les minoritaires, et 32 pour les majoritaires. On voit FIG. 4-7 que la distribution des majoritaires varie peu, comparée à celle des minoritaires. Mais, dans chaque cas, les distributions de phases au sein des minoritaires et des majoritaires peuvent effectivement être approchées par des distributions de Von Mises dont la valeur moyenne et le paramètre d'ordre sont calculés à partir des phases individuelles obtenues via les simulations numériques.

Paramètre d'ordre et phase moyenne

La FIG. 4-8 montre, pour différentes valeurs de ε et D/ε , l'évolution des paramètres d'ordre et des phases moyennes des 2 distributions en fonction du temps réduit εt . Il apparaît que les simulations numériques donnent des évolutions des paramètres similaires à celles obtenues grâce au modèle de couplage approché {4.3.7}, ce résultat étant valable pour des distributions initiales de phases compatibles avec nos conditions expérimentales. Nous constatons que les simulations numériques du modèle sans hypothèse confirment bien l'approximation de l'invariance de la phase moyenne de la distribution de phase des majoritaires.

De plus, pour $\varepsilon t \ll 1$, la résolution analytique du système {4.3.7} permet d'exprimer $\mu_m(\varepsilon t)$ indépendamment de la constante de diffusion D ; tandis que les paramètres d'ordre des deux populations $\rho_M(\varepsilon t)$ et $\rho_m(\varepsilon t)$ dépendent fortement de D :

$$\begin{aligned} \mu_m(t) - \mu_m^0 &= (1 - \rho_0/k_0) \cdot \sin(\mu_M^0 - \mu_m^0) \cdot \varepsilon t \\ \rho_M(t) &= \rho_0 \left[1 + (\varepsilon \rho_0/k_0 - D/2) \cdot t \right] \\ \rho_m(t) &= \rho_0 \left[1 + (\varepsilon \rho_0/k_0 \cdot \cos(\mu_M^0 - \mu_m^0) - D/2) \cdot t \right] \end{aligned} \quad \{4.3.8\}$$

La grandeur physique la plus pertinente pour déterminer la constante de couplage s'avère être la phase moyenne des minoritaires, car elle permet d'estimer ε indépendamment de la constante de diffusion D . La précision sur la détermination de ε est directement liée à l'incertitude sur la dérivée $\frac{d\mu_m}{dt}$, et est d'autant plus grande que la durée totale du signal de bioluminescence est élevée.

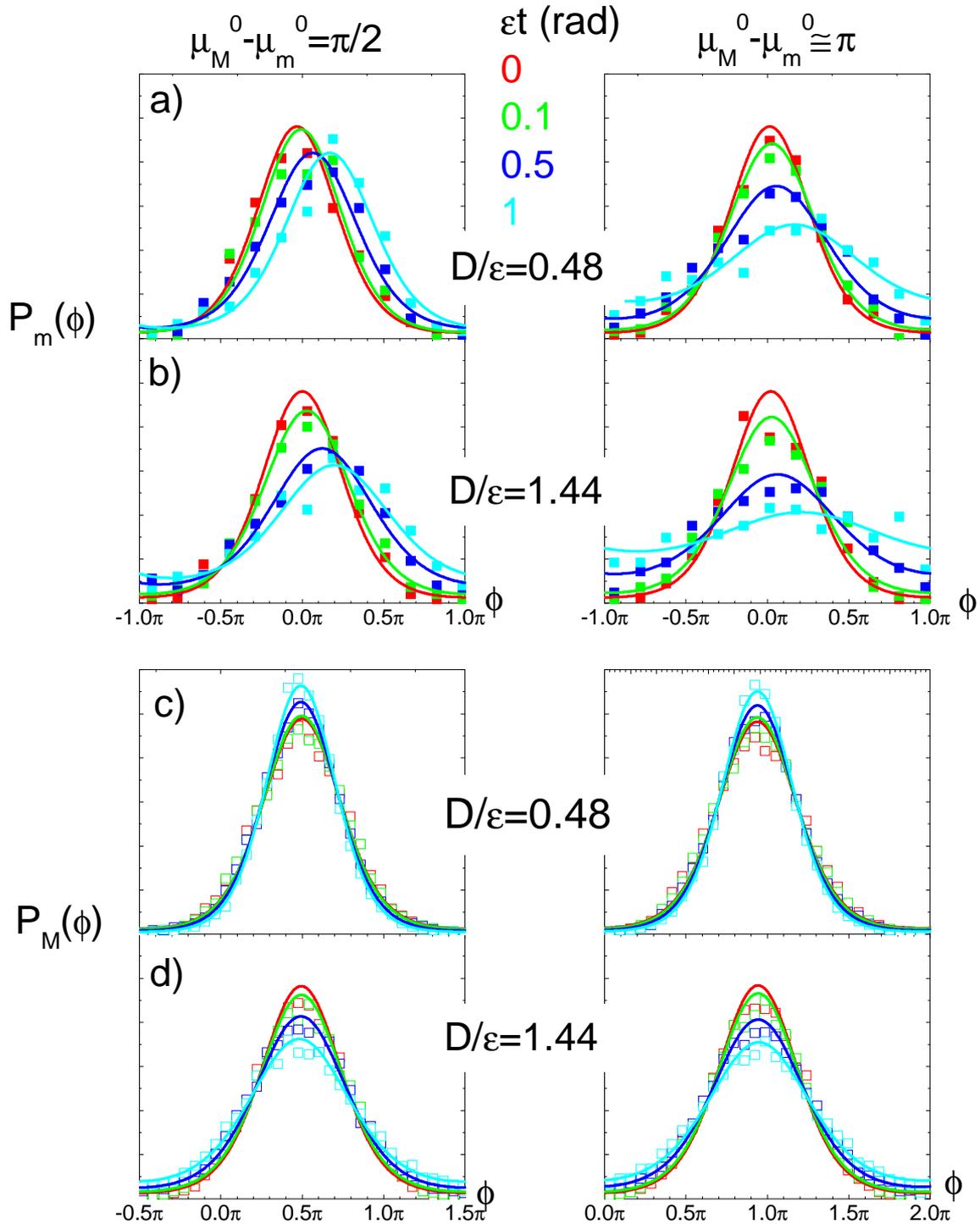


FIG. 4-7 Distribution de phases des minoritaires et des majoritaires en interaction, avec $\varepsilon = 2.10^{-3}$ rad/h. La colonne de droite représente des résultats pour deux populations initialement en quadrature de phase, et celle de gauche le cas de deux populations quasiment en opposition de phase initialement ($\mu_M^0 - \mu_m^0 = 2.96$ rad). Les carrés sont les distributions de phases obtenues à partir des simulations numériques des équations {4.3.1}. Les lignes continues sont les distributions de Von Mises dont les paramètres d'ordre et les phases moyennes sont calculés à partir des phases individuelles obtenues via les simulations numériques. **a), c)** Distribution de phase des minoritaires et des majoritaires pour $D/\varepsilon = 0.48$, et **b), d)** pour $D/\varepsilon = 1.44$.

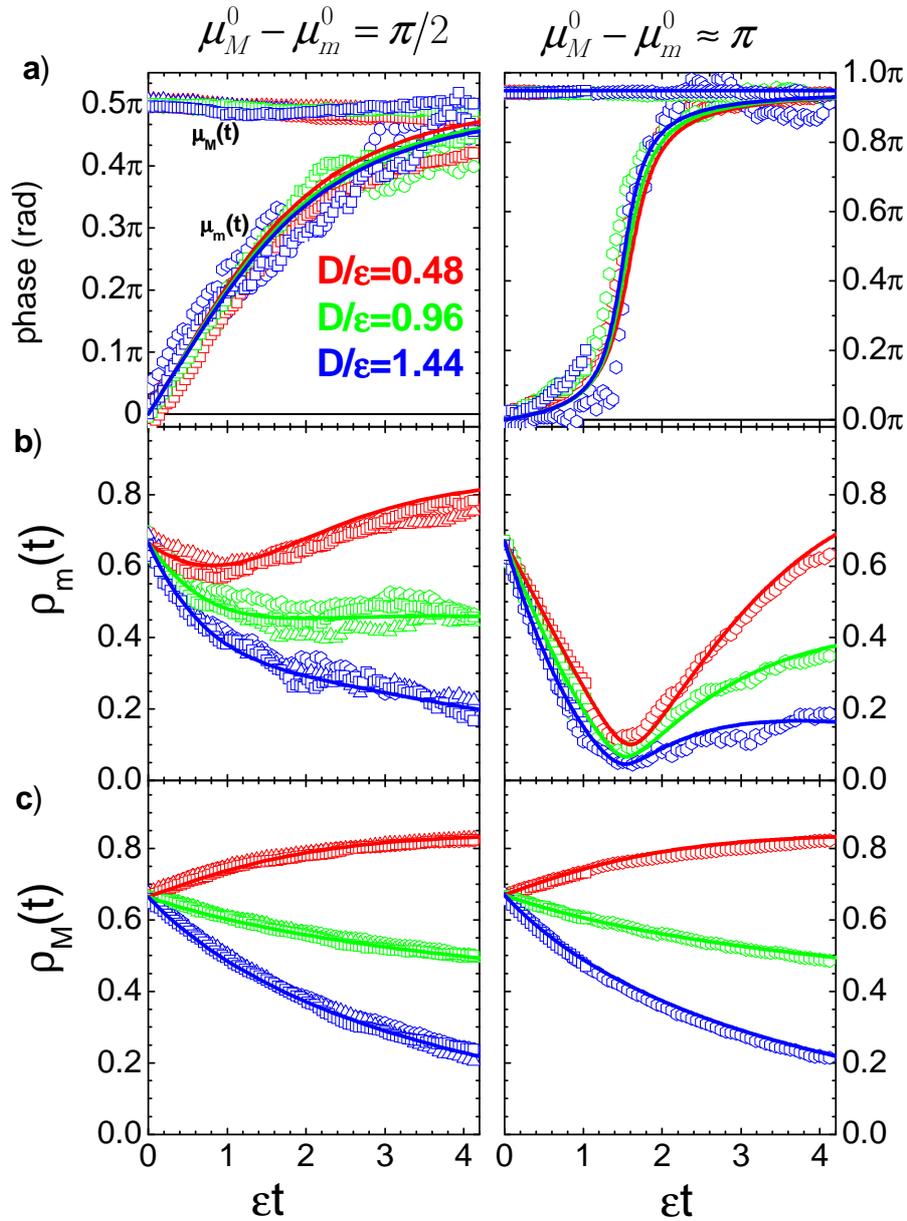


FIG. 4-8 Comparaison de la solution de {4.3.7} (ligne continue) et des simulations numériques de 10500 oscillateurs en interaction. La colonne de droite représente des résultats pour deux populations initialement en quadrature de phase, et celle de gauche le cas de deux populations quasiment en opposition de phase initialement. **a)** Evolution des phases moyennes $\mu_M(\epsilon t)$, $\mu_m(\epsilon t)$, des populations majoritaires et minoritaires **b)** du paramètre d'ordre des minoritaires $\rho_m(\epsilon t)$, **c)** et du paramètre d'ordre des majoritaires $\rho_M(\epsilon t)$. Toutes les grandeurs sont tracées pour 3 valeurs du rapport D/ϵ : 0.48, 0.96 et 1.48; et pour 3 intensités de couplage : $\epsilon = 2.1 \cdot 10^{-3}$ rad/h (carrés); $\epsilon = 4.2 \cdot 10^{-3}$ rad/h (triangles); $\epsilon = 8.3 \cdot 10^{-3}$ rad/h (hexagones). Les courbes obtenues par simulations numériques, et celles obtenues par la résolution des équations du modèle simplifié sont similaires : nos approximations sont donc justifiées.

Nous décrivons ci-dessous (4.4.3) des résultats expérimentaux confirmant que les données relatives à l'amplitude d'oscillation ne peuvent permettre une estimation fiable du couplage entre oscillateurs. C'est donc l'étude de la phase moyenne qui va nous permettre d'estimer la constante de couplage.

4.4 Détermination d'une borne supérieure du couplage

Pour estimer le couplage intercellulaire, nous avons effectué un ajustement linéaire de l'évolution temporelle de la phase moyenne des minoritaires. Cependant, la détermination de l'incertitude sur cette mesure nécessite une analyse statistique de l'origine des fluctuations observées. En particulier, si l'échelle de temps caractéristique de ces fluctuations est plus grande que l'intervalle entre les points de mesure, le signal est « sur-échantillonné » ; et l'estimation de la borne supérieure de couplage peut être biaisée par cette redondance de mesures.

4.4.1 Coefficient d'autocorrélation

Le suivi temporel de la bioluminescence est réalisé en prenant des mesures espacées de 30 minutes. Nous disposons donc d'une quarantaine de points par période d'oscillation, ce qui à l'intérêt de rendre précis le calcul de la transformée de Hilbert de l'oscillation de bioluminescence, mais peut être à l'origine d'un sur-échantillonnage. Pour déterminer si tel est bien le cas, il est nécessaire d'examiner la fonction d'autocorrélation du signal, ce qui permet de déduire l'échelle de temps caractéristique des fluctuations.

Nous avons vu auparavant qu'une culture cellulaire dans un puits est soumise à deux types de fluctuations : un bruit d'origine interne - généré par les oscillateurs individuels -, et un bruit externe - généré par les fluctuations globales de l'environnement -. Afin de caractériser brièvement ce bruit, nous estimons dans cette partie la fonction d'autocorrélation de la phase moyenne $\mu_{m,j}(t)$ d'un puits j . Pour ce faire, nous calculons le coefficient d'autocorrélation pour différents intervalles de temps. Considérons un signal x dont on fait, à intervalle de temps régulier Δt , N observations, notées (x_1, x_2, \dots, x_N) ; le coefficient d'autocorrélation de deux mesures séparées par un intervalle de temps $k\Delta t$ est défini par [88] :

$$r_k = \frac{\sum_{t=1}^{N-k} (x_t - \bar{x})(x_{t+k} - \bar{x})}{\sum_{t=1}^N (x_t - \bar{x})^2} \quad \{4.4.1\}$$

Où \bar{x} est la moyenne calculée sur l'ensemble des mesures.

Dans le cas où le signal x est stationnaire, on considère que deux mesures sont décorréélées pour $|r_k| < 2/\sqrt{N}$ (et ce pour $N \gg 1$).

Le processus de diffusion de phase n'est pas stationnaire, c'est pourquoi, nous n'effectuons pas les calculs d'autocorrélation sur la phase, mais sur le signal défini par $x_{t,j} = \mu_{t+1,j} - \mu_{t,j}$, où $\mu_{t,j}$ est la phase instantanée à la date t de l'oscillation de bioluminescence provenant du puits j . Et dans ce cas, les $x_{t,j}$ sont des variables stationnaires, puisque $\mu_{t+1,j} - \mu_{t,j} \sim \xi_j(t)$, et que le bruit est stationnaire.

Nous calculons ainsi pour chacun des puits j contenant les mélanges de phases les coefficients de corrélation $r_{k,j}$. En rassemblant toutes les expériences d'investigation de couplage, nous faisons ensuite les moyennes sur l'ensemble des puits (soit environ 80 puits/condition), pour chacune des 4 conditions initiales $\mu_M^0 - \mu_m^0 : -\pi/2; 0; \pi/2; \pi$. Les coefficients d'autocorrélation (FIG. 4-9) décroissent rapidement vers 0 mais montrent une corrélation à court terme pour $k < 8$ points. Par conséquent, lors des ajustements linéaires des phases moyennes $\mu_m(t)$, pour s'affranchir de la redondance des points de mesures, nous ne prenons en considération qu'un point sur huit.

4.4.2 Estimation du couplage intercellulaire

A partir des expériences de couplage que nous avons présentées en 4.2, nous pouvons calculer les phases instantanées des minoritaires correspondant à chacun des mélanges (a,A), (a,B), (a,C), et (a,D).

On ne peut pas exclure a priori que l'évolution de la phase d'une population soit influencée par des modifications du métabolisme cellulaire au cours du temps. Toutefois, comme dans chacun des mélanges, la population minoritaire provient d'une même culture, on peut supposer que ces effets liés au métabolisme sont identiques pour la phase des minoritaires. C'est pourquoi, nous choisissons de soustraire à toutes les phases des mélanges la phase moyenne contenant un mélange de phases initiales identiques, ce qui permet de s'affranchir des éventuels changements de la phase des minoritaires qui ne seraient pas dus au couplage.

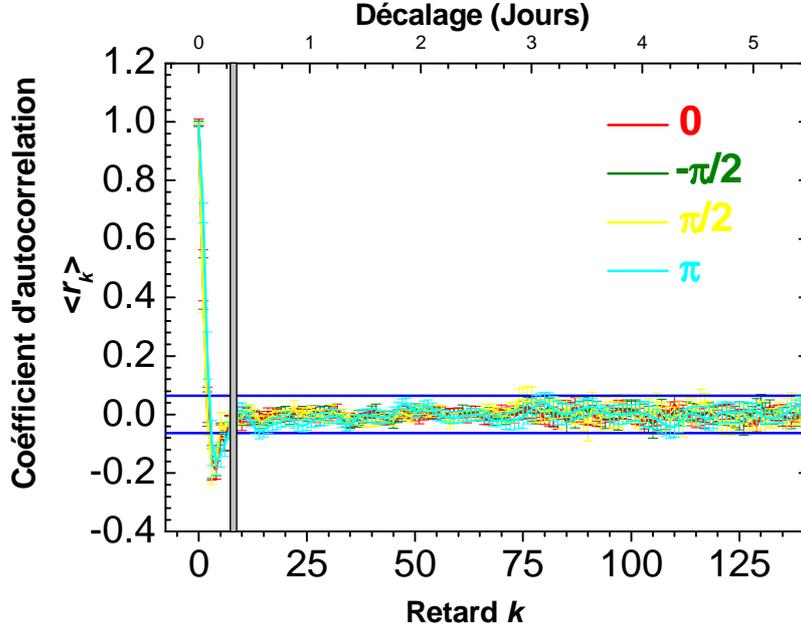


FIG. 4-9 Coefficient d'autocorrélation moyen pour chacun des mélanges de phases $\mu_M^0 - \mu_m^0$: $-\pi/2$; 0 ; $\pi/2$; π . La moyenne des coefficients d'autocorrélation est réalisée sur l'ensemble des puits d'une même condition initiale. Les barres d'erreur font référence à l'erreur standard sur la moyenne. Les barres horizontales bleues délimitent l'intervalle de confiance à 95% d'une corrélation nulle. La barre verticale grise montre une corrélation à court terme pour $k < 8$ points.

Nous avons vu que notre technique d'extraction de la phase, nous donnait accès à la phase « déroulée », $\varphi_m(t) = \mu_m(t) + \int \omega_0(t') dt'$. Nous savons que pour un mélange de populations de mêmes phases initiales, théoriquement, $\mu_m(t) = \mu_m^0$. Le mélange que nous choisissons a donc théoriquement une phase « déroulée » égale à $\varphi^{ref}(t) = \mu_m^0 + \int \omega_0(t') dt'$. Ainsi, la phase relative calculée en soustrayant la phase de référence de la phase du mélange étudiée est : $\varphi_m(t) - \varphi^{ref}(t) = \mu_m(t) - \mu_m^0$. Nous retrouvons bien la différence de phase apparaissant dans la première équation du système {4.3.8}. Nous serons donc en mesure de comparer les résultats donnés par ce modèle, avec nos résultats expérimentaux.

Ainsi, pour toutes les combinaisons de phases du type (y,Z) (c'est-à-dire population majoritaire de phase initiale Z, en interaction avec une population minoritaire de phase initiale y), la référence choisie est la phase moyenne de la population minoritaire dans le mélange de

populations (y,Y) , calculée en faisant une statistique sur l'ensemble des puits contenant le mélange (y,Y) . Par la suite, nous noterons $\langle \mu_{(y,Y)}(t) \rangle$ cette phase moyenne.

La FIG. 4-10 montre l'évolution des phases relatives des oscillations de bioluminescence de la FIG. 4-5c. L'évolution des phases des mélanges pour lesquels $\mu_m^0 \neq \mu_M^0$ ne diffèrent pas vraiment de l'évolution du mélange de populations de mêmes phases initiales : $\mu_m^0 = \mu_M^0$. Les phases des puits fluctuent autour de 0, sans qu'aucune déviation systématique de la phase des minoritaires n'émerge. Ceci laisse supposer que soit le couplage entre oscillateurs circadiens est inexistant, soit que le bruit expérimental à l'origine des fluctuations de phases observées masque les effets d'un couplage très faible.

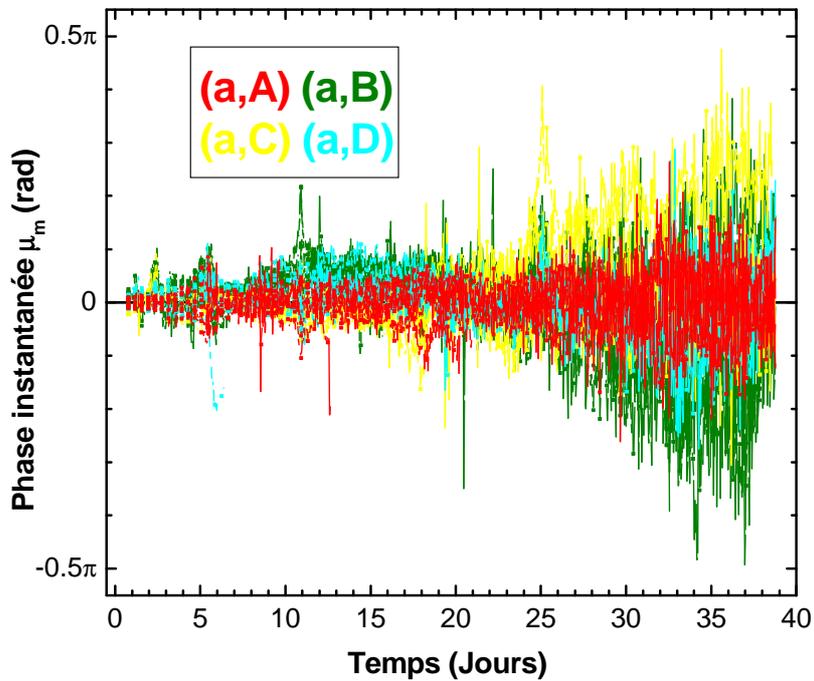


FIG. 4-10 Phase instantanée des oscillations pour chacun des mélanges de phases présentés FIG. 4-5. La phase de référence est $\langle \mu_{(a,A)}(t) \rangle$, moyenne calculée sur l'ensemble des puits contenant le mélange de cellules (a,A) , de mêmes phases initiales : $\mu_M^0 = \mu_m^0 = A$.

Nous avons par la suite réalisé des expériences similaires, en conservant les mêmes conditions initiales de mélanges de phases ($\mu_M^0 - \mu_m^0 : -\pi/2; 0; \pi/2; \pi$). Puis, nous avons fait une statistique des phases d'oscillation de tous les puits contenant les mêmes mélanges de phases initiaux $\mu_M^0 - \mu_m^0$. De même que précédemment, ce sont les phases relatives de chacun des puits que nous moyennons ; la référence étant la phase moyenne des minoritaires des puits

contenant un mélange de mêmes phases initiales : $\mu_M^0 = \mu_m^0$. La FIG. 4-11 compare les variations des phases moyennes relatives $\langle \mu_m(t) - \mu_m^0 \rangle$ pour les 4 mélanges de phases initiaux : $\mu_M^0 - \mu_m^0 : -\pi/2; 0; \pi/2; \pi$. Les variations des phases des minoritaires sont là encore noyées dans le bruit expérimental, et présentent des variations similaires quel que soit le mélange de phases considéré. Au vu de ces résultats, nous pouvons estimer une limite supérieure à cette constante de couplage \mathcal{E} . Pour ce faire, nous nous référons à l'équation {4.3.8}, car la condition de couplage faible $\mathcal{E}t \ll 1$ est certainement vérifiée.

Rappelons que cette équation relie la variation de la phase relative des minoritaires à la constante de couplage par la relation linéaire en temps : $\mu_m(t) - \mu_m^0 = (1 - \rho_0/k_0) \cdot \sin(\mu_M^0 - \mu_m^0) \cdot \mathcal{E}t$. Initialement, le paramètre d'ordre est : $\rho_0 = 0.67$, soit une « concentration » initiale $k_0 = 1.8$. Théoriquement, ce sont pour les différences de phases initiales $\mu_m(t) - \mu_m^0 = \pm\pi/2$ que la variation de phase des minoritaires est la plus importante. Nous choisissons donc d'ajuster linéairement les phases moyennes expérimentales correspondant à ces conditions initiales par l'équation précédente. La FIG. 4-11 montre les ajustements linéaires simultanés des courbes correspondant à $\mu_m(t) - \mu_m^0 = \pm\pi/2$; l'intervalle de confiance étant égal à 95%.

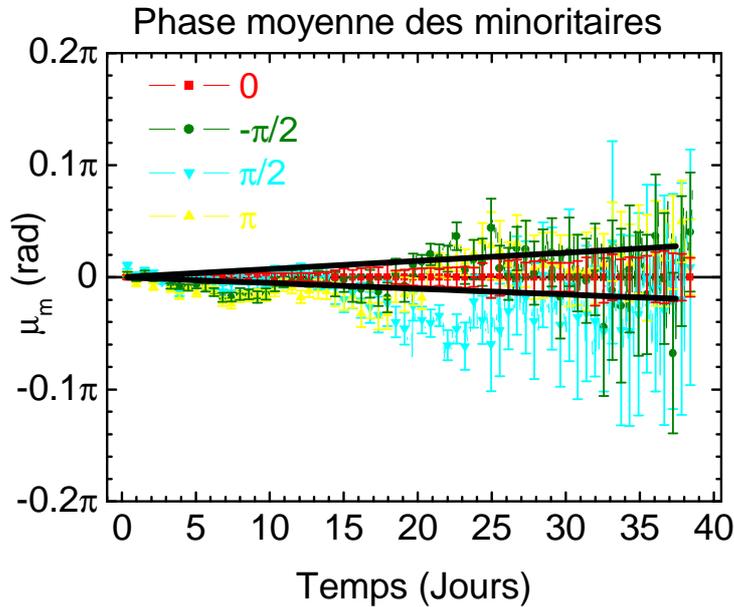


FIG. 4-11 Phase moyenne des minoritaires $\langle \mu_m(t) \rangle$ pour 3 mélanges de phases initiaux : $\mu_M^0 - \mu_m^0 : -\pi/2; 0; \pi/2$. Pour chaque phase, la moyenne est réalisée sur environ 80 puits. Les courbes noires montrent les ajustements linéaires conjoints des phases des minoritaires dans les mélanges $\mu_M^0 - \mu_m^0 = \pm\pi/2$, avec un intervalle de confiance de 95%.

La constante de couplage correspondante se trouve alors confinée dans un intervalle $|\varepsilon| \leq 1.5 \cdot 10^{-3}$ rad/jour.

4.4.3 Etude de l'amplitude des oscillations

Nous rassemblons ici les amplitudes des oscillations pour les mélanges de phases des différentes expériences d'investigation du couplage présenté précédemment. Les amplitudes d'oscillations des minoritaires sont calculées comme explicité en 3.3.1.

Nous comparons pour chaque expérience, l'évolution des amplitudes quelle que soit la différence de phase initiale entre minoritaires et majoritaires. La FIG. 4-12 montre que les variations sont sensiblement les mêmes, pour tous les mélanges de phases $\mu_M^0 - \mu_m^0$. De plus, pour un même déphasage initial, nous obtenons des évolutions de l'amplitude qui diffèrent d'une expérience à l'autre. C'est le métabolisme cellulaire qui change d'une expérience à l'autre. Et c'est surtout la variation de b d'une expérience à l'autre qui est responsable des importantes variations de l'amplitude des oscillations.

Rappelons l'équation régissant la dynamique du paramètre d'ordre des minoritaires :

$$\frac{\partial \rho_m}{\partial t} = \frac{\rho_m}{2} \cdot \left(\frac{2\rho_M \cdot \varepsilon}{k_m} \cdot \cos(\mu_M - \mu_m) - D \right) \quad \{4.4.2\}$$

C'est dans le cas extrême où la constante de couplage est nulle que la décroissance du paramètre d'ordre est la plus rapide. Et dans ce cas, l'amplitude des oscillations diminue exponentiellement : $(b\rho)(t) \sim e^{-\frac{Dt}{2}}$. Un ajustement numérique des amplitudes présentées FIG. 4-12 conduit à une valeur moyenne du temps de corrélation ($\tau = 2/D$) inférieure à celle estimée dans d'autres travaux [10]. Il semble que les évolutions temporelles des amplitudes traduisent essentiellement les variations du métabolisme cellulaire.

Nous en concluons que *a priori*, l'amplitude des oscillations ne peut pas nous permettre d'accéder à des informations fiables sur l'évolution temporelle du paramètre d'ordre des populations d'oscillateurs cyanobactériens. Par conséquent, nous pensons donc que l'amplitude du signal oscillant ne permet pas de faire une estimation de la constante de couplage ε .

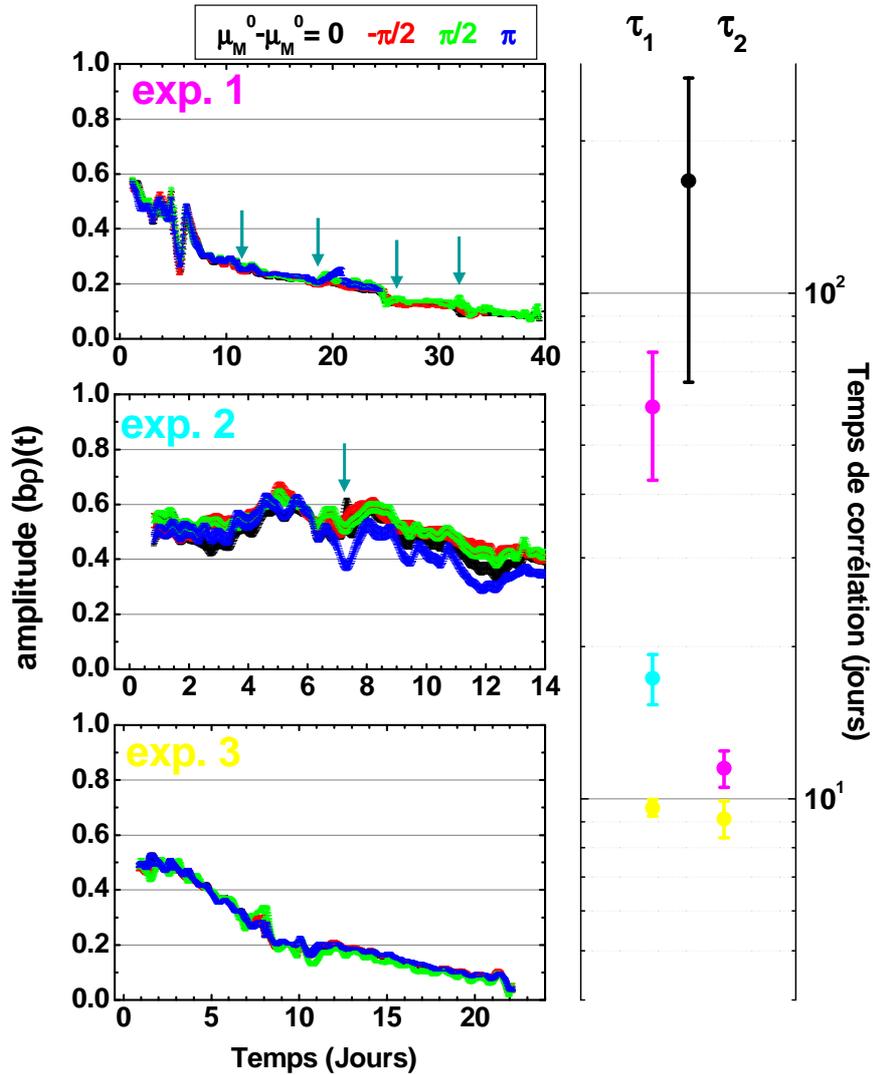


FIG. 4-12 Etude de l'amplitude des oscillations de bioluminescence. **A droite** : Chaque graphique se réfère à une expérience, et représente l'amplitude moyenne des oscillations des mélanges de phases pour chacun des déphasages initiaux $\mu_M^0 - \mu_m^0$. Pour chaque amplitude, la moyenne est calculée sur 20 à 30 puits ; les barres d'erreur sont les erreurs standard sur la moyenne. Les flèches indiquent les dates auxquelles le milieu est ajouté aux puits. On voit que la pente est plus forte pendant les premiers jours, puis diminue au cours du temps. Nous ajustons numériquement par une décroissance exponentielle les deux « régimes » de décroissance de chaque courbe. **A gauche** : Temps de corrélation moyens pour chaque expérience, obtenus en moyennant sur les 4 mélanges de phases initiaux $\mu_M^0 - \mu_m^0 = 0; -\pi/2; \pi/2$ et π . τ_1 et τ_2 font référence respectivement aux temps de corrélation correspondant à la décroissance lente et plus rapide de l'amplitude. Pour comparaison, sur ce graphique, figure aussi (en noir) la constante de diffusion estimée grâce à des expériences récentes sur cellules individuelles [10]. Les barres d'erreur sont les intervalles de confiance à 95%. Les valeurs calculées sont systématiquement supérieures à la valeur estimée antérieurement.

Chapitre 5

Conclusions

5.1 Rôle du couplage intercellulaire pour la stabilité du cycle circadien des cyanobactéries

Cette thèse s'inscrit dans la recherche des moyens de gestion du bruit stochastique par les bactéries. Ce travail s'intéresse en particulier à la stabilité des oscillations circadiennes chez des bactéries dont le temps de division cellulaire est inférieur à la durée d'un cycle.

Des études montrent que dans le cas de l'oscillateur circadien chez des organismes pluricellulaires [62, 63], ou d'oscillateurs synthétiques implémentés dans des bactéries [58], la dynamique est sensible aux fluctuations stochastiques. En revanche, l'oscillateur circadien à l'échelle des cellules individuelles se montre résistant au bruit. Une étude prouve en effet la synchronisation des oscillations de cellules issues d'une même colonie [10]. Ce qui nous a amené à constater l'étonnante robustesse aux fluctuations stochastiques de l'oscillateur chez la cyanobactérie (chapitre 1).

Notre étude s'est alors penchée sur l'hypothèse d'un couplage, comme explication possible à la stabilité observée. Nous avons introduit d'abord des notions concernant la dynamique des oscillateurs en général (chapitre 2). Puis nous nous sommes intéressés au cas particulier des oscillateurs de phase. En particulier, nous avons décrit théoriquement les effets du bruit stochastique sur la phase d'oscillation, et en s'appuyant sur le modèle de Kuramoto, nous avons montré que le couplage – avec d'autres oscillateurs, ou avec une force extérieure – a des effets s'opposant à la diffusion de phase engendrée par le bruit.

Nous avons détaillé ensuite nos méthodes expérimentales d'acquisition de la bioluminescence : nous avons utilisé essentiellement des souches munies du rapporteur de la luciférase *PkaiBC::luxAB* (chapitre 3). Ceci a permis de suivre les oscillations de bioluminescence d'une population d'oscillateurs à long terme (suivi supérieur à 15 jours). Nous avons caractérisé dans un premier temps la bioluminescence émise par ces populations, en développant quelques facteurs influençant l'amplitude et la phase des oscillations. Puis, grâce

aux expériences sur cellules individuelles, nous avons quantifié la largeur de distributions de phase au sein de population de cellules entraînées.

Afin de quantifier l'éventuel couplage existant entre les oscillateurs cyanobactériens, nous avons réalisé des expériences consistant à mettre en interaction deux populations entraînées similairement à des phases différentes, l'une des deux populations étant introduite majoritairement par rapport à l'autre (chapitre 4). Le modèle théorique que nous avons utilisé montre qu'en cas de couplage, la phase de la population minoritaire tend à long terme vers la phase de la population majoritaire, qui elle, ne varie pas théoriquement. Nous nous sommes appuyés ensuite sur le modèle de couplage de Kuramoto, décrivant l'interaction entre des oscillateurs mutuellement couplés. En effet, l'hypothèse d'un couplage fort étant exclue, la dynamique des oscillateurs a pu être décrite par l'évolution de leur phases, comme cela a déjà été fait dans des expériences récentes d'entraînement des cyanobactéries par des variations lumineuses. Les équations décrivant la dynamique ont été simulées numériquement, et les résultats sont comparés à ceux donnés par la résolution analytique du système simplifié. L'accord entre l'approche simplifiée et le modèle originel nous a permis d'en déduire l'évolution théorique de la phase moyenne et du paramètre d'ordre des minoritaires, en fonction de la constante de couplage ϵ . Une étude supplémentaire a montré que l'amplitude des oscillations ne permet pas de faire une estimation fiable du paramètre d'ordre, et que c'est la phase qui est le paramètre le plus pertinent permettant de faire une estimation de ϵ . En réalisant une statistique sur l'ensemble de nos expériences, nous avons estimé que la constante de couplage se trouve dans un intervalle $|\epsilon| \leq 1.5 \cdot 10^{-3}$ rad/jour.

5.2 Signification de la limite supérieure de la constante de couplage

Le modèle théorique sur lequel nous nous appuyons montre qu'au sein d'une population d'oscillateurs mutuellement couplés, l'état stationnaire stable de la distribution de phase dépend de l'importance relative du couplage et de la diffusion de phase. Si $\epsilon > D$, le couplage contrebalance l'effet dispersif de la diffusion de phase, et l'état stationnaire stable correspond à une distribution de phase de largeur finie, d'autant plus petite que le couplage est grand devant D . En revanche, si $\epsilon \leq D$, la diffusion de phase l'emporte, et à terme, les phases se trouvent distribuées uniformément sur l'intervalle $[-\pi; \pi]$.

En ce qui concerne les oscillateurs cyanobactériens, des travaux réalisés en 2004 ont estimé la constante de diffusion à $D = 1.2 \cdot 10^{-2} \pm 7 \cdot 10^{-3}$ rad/jour [10]. Grâce à des expériences sur cellules individuelles, cette même étude a cherché l'existence d'un couplage entre oscillateurs cyanobactériens. Les résultats observés n'ont pas permis de conclure à l'existence d'une interaction, mais ont permis de confiner l'hypothétique constante de couplage dans un intervalle

tel que $|\varepsilon| \leq 5 \cdot 10^{-2}$ rad/jour. Au vu de cette valeur de la borne supérieure de ε , il n'était pas possible de connaître l'importance relative de la diffusion de phase et du couplage éventuel entre oscillateurs.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse n'ont également pas pu mettre en évidence les preuves de l'existence d'une communication intercellulaire, mais ont permis de faire une estimation plus précise de la borne supérieure de ε . Ce gain de précision nous a permis de conclure que dans un intervalle de confiance de 95%, $\varepsilon < D$. Par conséquent, pour les cyanobactéries, on se trouve dans le cas d'un oscillateur dominé par la diffusion de phase : le couplage n'est pas responsable de la stabilité observée.

Il apparaît donc que la stabilité de l'oscillateur circadien chez la cyanobactérie est une propriété intrinsèque du réseau génétique orchestrant l'horloge. D'où peut bien provenir une telle robustesse ? Il est possible que l'oscillateur central basé sur l'interaction cyclique des 3 protéines KaiA, KaiB et KaiC génère moins de fluctuations qu'un mécanisme de transcription/traduction [57]. Il se peut également que les boucles de rétroaction de transcription/traduction soient des éléments indispensables garantissant cette robustesse.

5.3 Perspectives

Nous venons de montrer que la stabilité de l'oscillateur aux fluctuations stochastiques est une propriété intrinsèque aux mécanismes générant le cycle circadien chez la cyanobactérie.

On pourrait maintenant envisager de mettre cette robustesse à l'épreuve, en développant une étude comportant 3 aspects principaux :

- L'analyse de la stabilité de l'oscillateur circadien pour des cellules individuelles, soumises à différentes fluctuations. Il s'agit d'imposer à la cellule différents niveaux de bruits internes - en augmentant par exemple le taux de division cellulaire -, afin d'établir une relation entre la stabilité de l'oscillateur et le bruit stochastique interne.
- Il sera, de même, possible de soumettre la cyanobactérie à différents niveaux de bruits externes, en utilisant la lumière comme source de fluctuations externes. En faisant varier l'amplitude des fluctuations tout en gardant un taux d'éclairage moyen constant, on pourrait établir une relation entre la stabilité de l'oscillateur et le bruit externe.
- Finalement, afin de découvrir précisément les origines internes de cette stabilité, on pourrait envisager de réaliser ces mêmes études de stabilité sur des cellules issues de souches mutantes, dépourvues de certains éléments bien déterminés du réseau génétique. En testant la robustesse de ces mutants, il sera possible de pointer les gènes responsables de la stabilité de l'oscillateur circadien.

Concernant les expériences visant à établir une relation entre le bruit interne et la stabilité, le suivi des fluctuations engendrées par la stochasticité intracellulaire nécessite de

travailler en conditions externes rigoureusement identiques d'une cellule à l'autre. Nous avons vu auparavant que les techniques de microscopie utilisées jusqu'à maintenant pour suivre la bioluminescence de cellules individuelles présentent l'inconvénient d'être restrictive temporellement. En effet, au-delà de 5 générations, la croissance des bactéries se fait souvent en multicouches, ce qui interdit toute analyse par microscopie de bioluminescence.

Une alternative à ce problème est la technologie micro-fluidique. Des travaux ont en effet montré que ce dispositif peut être utilisé pour le suivi *in vivo* de bactéries sur plusieurs générations [89]. Le principe est de faire croître de manière orientée les bactéries dans des canaux micrométriques. Cette technique pourrait ainsi permettre de suivre une seule cellule en éliminant les cellules filles au fur et à mesure des divisions. La conception et l'adaptation de ces microcanaux à la microscopie de bioluminescence pourraient ainsi permettre de travailler à plus long terme que ce qui s'est fait jusqu'alors en microscopie. De plus, grâce à cette technique, il sera possible d'avoir des conditions externes strictement identiques pour chaque cellule étudiée.

En complément de cette étude de la stabilité *in vivo*, nous pourrions également envisager de tester la robustesse de l'oscillateur KaiABC *in vitro*. Ainsi, en suivant les oscillations circadiennes de la quantité de KaiC phosphorylée, nous pourrions par exemple estimer le temps de corrélation des oscillations.

L'oscillateur circadien des cyanobactéries semble être un modèle de stabilité et de résistance aux fluctuations stochastiques, ce qui peut *a priori* paraître surprenant pour un organisme aussi simple. Ces bactéries permettent d'aborder l'étude du cycle circadien grâce à deux approches complémentaires : l'oscillateur *in vitro*, autonome et découplé de tout processus de transcription/traduction, et l'oscillateur *in vivo*, susceptible d'être stabilisé par des boucles de rétroaction. En quantifiant la résistance aux bruits externes et internes d'amplitudes différentes, nous pourrions éventuellement avoir une indication du coût et de l'intérêt évolutif d'un oscillateur aussi stable.

Bibliographie

- [1] Elowitz, M. B., Levine, A. J., Siggia, E. D. and Swain, P. S. Stochastic gene expression in a single cell. *Science* 2002; **297**:1183-1186.
- [2] Kish, L. End of Moore's law: thermal (noise) death of integration in micro and nanoelectronics. *Phys. Lett. A* 2002; **305**:144-149.
- [3] Rao, C. V., Wolf, D. M. and Arkin, A. P. Control, exploitation and tolerance of intracellular noise. *Nature* 2002; **420**:231-237.
- [4] Goldbeter, A. Biochemical oscillations and cellular rhythms. The molecular basis of periodic and chaotic behaviour. *Cambridge University Press* 1996.
- [5] Foster, G. and Kreitzman, L. Rhythms of life. *Profile, London* 2004.
- [6] Segel, I. H. Enzyme kinetics. behaviour and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. *Wiley Classic Library Edition* 1993; 931-934.
- [7] Bell-pederson, D., Cassone, V. M., Earnest, D. J., Golden, S. S., Hardin, P. E., Thomas, T. L. and Zoran, M. J. Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nature reviews Genetics* 2005; **6**:544-556.
- [8] Broda, H., Brugge, D., Keiichi, H. and Hastings, J. W. Circadian communication between unicells? Effects on period by cell-conditioning of medium. *Cell Bioph.* 1985; **8**:47-63.
- [9] Brunner, M. and Schafmeier, T. Transcriptional and post-transcriptional regulation of the circadian clock of cyanobacteria and *Neurospora*. *Genes and Development* 2006; **20**:1061-1074.
- [10] Mihalcescu, I., Hsing, W. and Leibler, S. Resilient circadian oscillator revealed in individual cyanobacteria. *Nature* 2004; **430**:81-85.
- [11] Mutsuda, M., Michel, K. P., Zhang, X., Montgomery, B. L. and Golden, S. S. Biochemical properties of CikA, an unusual phytochrome-like histidine protein kinase that resets the circadian clock in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *J. Biol. Chem.* 2003; **278**:19102-19110.
- [12] Welsh, D. K., Logithetis, D. E., Meister, M. and Reppert, S. M. Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 1995; **14**:697-706.

- [13] Klein, D. C., Moore, R. Y. and Reppert, S. M. Suprachiasmatic nucleus: the mind's clock. *Oxford University Press, New York* 1991.
- [14] Konopka, R. J. and Benzer, S. Clock Mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1971; **68**:2112-2116.
- [15] Cambras, T., Vilaplana, J., Campuzano, A., Canal-Corretger, M. M., Carulla, M. and Diez-Noguera, A. Entrainment of the rat motor activity rhythm under *T* cycles shorter than 24 h. *Physiol. Behav.* 2000; **70**:227-232.
- [16] Turek, F. W. Circadian Rhythms in mammals. *Annu. Rev. Physiol.* 1985; **47**:49-64.
- [17] Ralph, M. R., Foster, R. G., Davis, F. C. and Maenaker, M. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 1990; **247**:975-978.
- [18] Johnson, R. F., Moore, R. Y. and Morin, L. P. Loss of entrainment and anatomical plasticity after lesions of the hamster retinohypothalamic tract. *Brain Res.* 1988; **460**:297-313.
- [19] Hastings, M. H. and Herzog, E. D. Clock genes, oscillators, and cellular networks in the suprachiasmatic nuclei. *J. Biol. Rhythms* 2004; **19**:400-413.
- [20] Shestakov, S. V. and Khyen, N. T. Evidence for genetic transformation in blue-green alga *Anacystis nidulans* R2. *Molec. Gen. Genet.* 1970; **107**:372-375.
- [21] Kondo, T., Strayer, C. A., Kulkarni, R. D., Taylor, W., Ishiura, M., Golden, S. S. and Johnson, C. H. Circadian rhythms in prokaryotes: luciferase as a reporter of circadian gene expression in cyanobacteria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1993; **90**:5672-5676.
- [22] Iwasaki, H. and Kondo, T. Circadian timing mechanism in the prokaryot clock system of cyanobacteria. *J. Biol. Rhythms* 2004; **19**:436-444.
- [23] Johnson, C. H., Golden, S. S., Ishiura, M. and Kondo, T. Circadian clocks in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* 1996; **21**:5-11.
- [24] Golden, S. S., Ishiura, M., Johnson, C. H. and Kondo, T. Cyanobacterial circadian rhythms. *Annu. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol.* 1997; **48**:327-354.
- [25] Johnson, C. H. and Golden, S. S. Circadian programs in cyanobacteria: adaptativeness and mechanism. *Annu. Rev. Microbiol.* 1999; **53**:389-409.
- [26] Liu, Y., Golden, S. S., Ishiura, M. and Johnson, C. H. Bacterial luciferase as a reporter of circadian gene expression in cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 1995; **177**:2080-2086.
- [27] Liu, Y., Tsinoremas, N. F., Johnson, C. H., Lebeveda, N. V., Golden, S. S., Ishiura, M. and Kondo, T. Circadian orchestration of gene expression in cyanobacteria. *Genes Dev.* 1995; **9**:1469-1478.
- [28] Johnson, C. H. Global orchestration of gene expression by the biological clock of cyanobacteria. *Genome Biol.* 2004; **5**.
- [29] Mori, T., Binder, B. and Johnson, C. H. Circadian gating of cell division in cyanobacteria growing with average doubling times of less than 24 hours. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1996; **93**:10183-10188.
- [30] Kondo, T., Mori, T., Lebeveda, N. V., Aoki, S., Ishiura, M. and Golden, S. S. Circadian rhythms in rapidly dividing cyanobacteria. *Science* 1997; **275**:224-227.

- [31] Mori, T. and Johnson, C. H. Independence of circadian timing from cell division in cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 2001; **183**:2439–2444.
- [32] Mori, T. and Johnson, C. H. Circadian programming in cyanobacteria. *Cell & Dev. Biol.* 2001; **12**:271-278.
- [33] Ouyang, Y., Andersson, C. R., Kondo, T., Golden, S. S. and Johnson, C. H. Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1998; **95**:8660-8664.
- [34] Gonze, D., Roussel, M. R. and Goldbeter, A. A model for the enhancement of fitness in cyanobacteria based on resonance of a circadian oscillator with the external light dark cycle. *J. Theor. Biol.* 2002; **214**:577-597.
- [35] Ishiura, M., Kutsuna, S., Aoki, S., Iwasaki, H., Andersson, C. R., Tanabe, A., Golden, S. S., Johnson, C. H. and Kondo, T. Expression of a gene cluster KaiABC, as a circadian feedback process in cyanobacteria. *Science* 1998; **281**:1519-1523.
- [36] Taniguchi, Y., Yamaguchi, A., Hijikata, A., Iwasaki, H., Kamagata, K., Ishiura, M., Go, M. and Kondo, T. Two kaiA-binding domains of cyanobacterial circadian clock protein KaiC. *FEBS Letters* 2001; **496**:86-90.
- [37] Iwasaki, H., Taniguchi, Y., Ishiura, M. and Kondo, T. Physical interactions among circadian clock proteins KaiA, KaiB and kaiC in cyanobacteria. *EMBO J.* 1999; **18**:1137-1145.
- [38] Iwasaki, H., Nishiwaki, T., Kitayama, Y., Nakajima, M. and Kondo, T. KaiA-stimulated KaiC phosphorylation in circadian timing loops in cyanobacteria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2002; **99**:15788-15793.
- [39] Wang, J. Recent cyanobacterial Kai protein structures suggest a rotary clock. *Structure* 2005; **13**:735-741.
- [40] Kageyama, H., Kondo, T. and Iwasaki, H. Circadian formation of clock protein complexes by KaiA, KaiB, KaiC, and SasA in cyanobacteria. *Biol. Chem.* 2003; **278**:2388-2395.
- [41] Xu, Y., Piston, D. and Johnson, C. H. A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system application to interacting circadian clock protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1999; **96**:151-156.
- [42] Kondo, T., Tsinoremas, N. F., Golden, S. S., Johnson, C. H., Kutsuna, S. and Ishiura, M. Circadian clock mutants of cyanobacteria. *Science* 1994; **266**:1233-1236.
- [43] Nishimura, H., Nakahira, Y., Imai, K., Tsuruhara, A., Kondo, H., Hayashi, H., Hirai, M., Saito, H. and Kondo, T. Mutations in KaiA, a clock protein, extend the period of circadian rhythm in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Microbiol.* 2002; **148**:2903-2909.
- [44] Nakahira, Y., Katayama, M., Miyashita, H., Kutsuna, S., Iwasaki, H., Oyama, T. and Kondo, T. Global gene repression by KaiC as a master process of prokaryotic circadian system. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2004; **101**:881-885.
- [45] Kiyohara, Y. B., Katayama, M. and Kondo, T. A novel mutation in *KaiC* affects resetting of the cyanobacterial circadian clock. *J. Bacteriol.* 2005; **187**:2559-2564.

- [46] Iwasaki, H., Williams, S. B., Kitayama, Y., Ischiura, M., Golden, S. S. and Kondo, T. A KaiC-interacting Sensory Histidine Kinase, SasA, necessary to sustain robust circadian oscillation in cyanobacteria. *Cell* 2000; **101**:223-233.
- [47] Takai, N., Nakajima, M., Oyama, T., Kito, R., Sugita, C., Sugita, M., Kondo, T. and Iwasaki, H. A KaiC-associating SasA-RpaA two-component regulatory system as a major circadian timing mediator in cyanobacteria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2006; **103**:12109-11211.
- [48] Smith, R. M. and Williams, S. B. Circadian rhythms in gene transcription imparted by chromosome compaction in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2006; **103**:8564-8569.
- [49] Mori, T., Saveliev, S. V., Xu, Y., Stafford, W. F., Cox, M. M., Inman, R. B. and Johnson, C. H. Circadian clock protein KaiC forms ATP-dependant hexameric rings and binds DNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2002; **99**:17203-17208.
- [50] Nishiwaki, T., Satomi, Y., Nakajima, M., Lee, C., Kiyohara, R., Kageyama, H., Kitayama, Y., Temamoto, M., Yamaguchi, A., Hijikata, A., Go, M., Iwasaki, H., Takao, T. and Kondo, T. Role of KaiC phosphorylation in the circadian clock system of *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2004; **101**:13927-13932.
- [51] Nishiwaki, T., Iwasaki, H., Ishiura, M. and Kondo, T. Nucleotide binding and autophosphorylation of the clock protein KaiC as a circadian timing process of cyanobacteria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2000.
- [52] Tomita, J., Nakajima, M., Kondo, T. and Iwasaki, H. No transcription-translation feedback in circadian rhythm of KaiC phosphorylation. *Science* 2004.
- [53] Nakajima, M., Imai, K., Ito, H., Nishiwaki, T., Murayama, Y., Iwasaki, H., Oyama, T. and Kondo, T. Reconstitution of circadian oscillation of cyanobacterial KaiC phosphorylation in vitro. *Science* 2005; **308**:414-415.
- [54] Mori, T., Williams, D. R., Byrne, M. O., Qin, X., Egli, M., Mchaouarb, H. S., Stewart, P. L. and Johnson, C. H. Elucidating the ticking of an in vitro circadian clockwork. *Plos biology* 2007; **5**.
- [55] Emberly, E. and Wingreen, N. S. Hourglass model for a protein based circadian oscillator. *Phys. Rev. Lett* 2006; **96**:038303-038301.
- [56] Clodong, S., Kronk, L., Wilde, A., Axmann, I., Herzel, H. and Kollman, M. Functioning and robustness of a bacterial circadian clock. *EMBO J.* 2007; **3**:1-9.
- [57] Raser, J. M. and O'Shea, E. K. Noise in gene expression: origins, consequences, and control. *Science* 2005; **309**:2010-2013.
- [58] Elowitz, M. B. and Leibler, S. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature* 2000; **403**:335-338.
- [59] Gonze, D., Halloy, J. and Goldbeter, A. Robustness of circadian rhythms with respect to molecular noise. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2002; **99**:673-678.
- [60] Vilar, J. M. G., Kueh, H. Y., Barkai, N. and Leibler, S. Mechanisms of noise-resistance in genetic oscillators. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2002; **99**:5988-5992.

- [61] Springer, M. and Paulsson, J. Harmonies from noise. *Nature* 2006; **439**:27-28.
- [62] Nagoshi, E., Saini, C., Bauer, C., Laroche, T., Naef, F. and Schibler, U. Circadian gene expression in individual fibroblasts: cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells. *Cell* 2004; **119**:693-705.
- [63] Carr, A. J. and Whitmore, D. Imaging of single light-responsive clock cells reveals fluctuating free-running periods. *Nat. Cell. Biol.* 2005; **7**:319-321.
- [64] Kiss, I. Z., Zhai, Y. and Hudson, J. L. Emerging coherence in a population of chemical oscillator. *Science* 2002; **296**:1676-1678.
- [65] Herzog, E. D., Aton, S. J., Numano, R., Sakaki, Y. and Tei, H. Temporal precision in the mammalian circadian system: a reliable clock from less reliable neurons. *J. Biol. Rhythms* 2004; **19**:35-46.
- [66] Bier, M., Bakker, M. and Westerhoff, H. V. How yeast cells synchronize their glycolytic oscillations: a perturbation analytic treatment. *Biophys. J.* 2000; **78**:1087-1093.
- [67] Kitayama, Y., Iwasaki, H., Nishiwaki, T. and Kondo, T. KaiB functions as an attenuator of KaiC phosphorylation in the cyanobacterial circadian clock system. *EMBO. J.* 2003; **22**:2127-2134.
- [68] Atkinson, M. R., Savageau, M. A., Myers, J. T. and Ninfa, A. J. Development of genetic circuitry exhibiting toggle switch or oscillatory behaviour in *Escherichia coli*. *Cell* 2003; **113**:597-607.
- [69] Strogatz, S. H. Nonlinear dynamics and chaos. 1994.
- [70] Pikovsky, A., Rosenblum, M. and Kurths, J. Synchronization: A universal concept in nonlinear sciences. (*Cambridge University Press, Cambridge*) 2001.
- [71] Mandel, L. and Wolf, E. Optical coherence and quantum optics. (*Cambridge University Press*) 1995.
- [72] Mardia, K. V. and Jupp, P. E. Directional Statistics. (*Wiley series in probability and statistics*) 1999.
- [73] Mises, v. Über die "Ganzzahligkeit" der Atomgewichte und verwandte Fragen. *Phys. Z.* 1918; **19**:490-500.
- [74] Ermentrout, G. B. and Rinzel, J. Beyond a pacemaker's entrainment limit: phase walk-through. *Am. J. Physiol* 1984; **246**.
- [75] Amdaoud, M., Vallade, M., Weiss-Schaber, C. and Mihalcescu, I. Cyanobacterial clock, a stable phase oscillator with negligible intercellular coupling. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2007; **à paraître**.
- [76] Strogatz, S. H. From Kuramoto to Crawford: exploring the onset of synchronization in populations of coupled oscillators. *Physica D* 143 2000; 1-20.
- [77] Katayama, M., Tsinoremas, N. F., Kondo, T. and Golden, S. S. *cpmA*, a Gene Involved in an Output Pathway of the Cyanobacterial Circadian System. *J. Bacteriol.* 1999; **181**:3516-3524.

- [78] Tsinoremas, N. F., Schaefer, M. R. and Golden, S. S. Blue and red light reversibly control psbA expression in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J. Biol. Chem.* 1994; **269**:16143–16147.
- [79] Okurama, N., Masamoto, K. and Wada, H. The gshb gene in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942 encodes a functional glutathione synthetase. *Microbiology* 1997; **143**:2883-2890.
- [80] Schmitz, O., Katayama, M., Williams, S. B., Kondo, T. and Golden, S. S. CikA, a bacteriophytochrome that resets the cyanobacterial circadian clock. *Science* 2000; **289**:765-768.
- [81] Katayama, M., Kondo, T., Xiong, J. and Golden, S. S. lpdA encodes an iron-sulfur protein involved in light-dependant modulation of the circadian period in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *J. Bacteriol.* 2003; **185**:1415-1422.
- [82] Kutsuna, S., Kondo, T., Aoki, S. and Ishiura, M. A period-extender gene, pex, that extends the period of the circadian clock in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J. Bacteriol.* 1998; **180**:2167-2174.
- [83] Xu, Y., Mori, T., Johnson, C.H. Circadian clock-protein expression in cyanobacteria: rhythms and phase setting. *EMBO J.* 2000; **19**:3349-3357.
- [84] Protassov, K. Probabilités et incertitudes dans l'analyse des données expérimentales. (*Presses universitaires de Grenoble*) 1999.
- [85] Rao Jammalamadaka, S. and SenGupta, A. Topics in Circular Statistics. *Series on multivariate analysis* 2001; **5**.
- [86] Kitayama, Y., Kondo, T., Nakahira, Y., Nishimura, H., Ohmiya, Y. and Oyama, T. An In vivo Dual-Reporter System of Cyanobacteria Using Two Rail-Worm Luciferases with Different Color Emissions. *Plant Cell Physiol.* 2004; **45**:109-113.
- [87] Viviani, V. R., Bechara, E. J. H. and Ohmiya, Y. Cloning, Sequence Analysis, and Expression of Active Phrixothrix Railroad-Worms Luciferase: Relationship between Bioluminescence Spectra and Primary Structures. *Biochemistry* 1999; **38**:8271-8279.
- [88] Chatfield, C. The analysis of time series: An introduction. *Chapman & Hall/CRC* 2003.
- [89] Balaban, N. Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L. and Leibler, S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* 2004; **305**:1622-1625.