

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ECOLE DOCTORALE

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

POLE : PHARMACOLOGIE ET TOXICOLOGIE

Laboratoire : 'Rythmes Biologiques et cancers'

DISCIPLINE : TOXICOLOGIE

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 10/01/2014

par

Ali MTEYREK

Rôle de l'horloge circadienne dans la cancérisation
hépatique expérimentale et sa prévention

Directeur de thèse : Francis LEVI

Composition du jury :

Président du jury : Mr. **Jean-François DORE** **Directeur de recherche émérite** (Université Lyon 1, France)

Rapporteur: Mr. **Franck DELAUNAY** **Professeur** (Université de Nice Sophia Antipolis, France)

Rapporteur: Mr. **Urs ALBRECHT** **Professeur** (Université de Fribourg, Suisse)

Examineur: Mr **Bruno CLEMENT** **Directeur de recherche** (Université de Rennes 1, France)

Directeur de thèse : Mr. **Francis LEVI** **Directeur de recherche** (Université Paris Sud, France)

« Le temps met tout en lumière. »
Thalès

Résumé de la thèse

L'agence internationale de recherche sur le cancer (IARC) a indiqué que le travail posté qui provoquait une disruption circadienne était probablement cancérigène chez l'Homme. Ainsi, une perturbation expérimentale sévère du système circadien accélère-t elle la progression tumorale et pourrait favoriser la cancérogénèse. Durant ma thèse, j'ai démontré que la disruption circadienne résultant d'une mutation ou d'une mise au silence des gènes de l'horloge *Per* ou *Cry* accélérât la cancérogénèse hépatique induite par la diéthylnitrosamine, en favorisant l'instabilité génomique, la prolifération cellulaire, et l'inflammation. J'ai montré que l'alimentation programmée ou la dexaméthasone modifiaient la régulation circadienne de ces trois caractéristiques du cancer, suggérant ainsi qu'une intervention thérapeutique ciblant le système circadien pourrait prévenir la cancérogénèse. J'ai ainsi mis en évidence le contrôle circadien de trois mécanismes moléculaires de la cancérogénèse précoce et proposé deux interventions ciblant l'horloge circadienne dans un but de prévention de la cancérogénèse.

Mots clés

Rythme circadien ; Cancérogénèse ; Foie ; Mutations géniques ; Horloge circadienne moléculaire ; Cycle cellulaire ; Chronothérapie ; Souris

Laboratoire de rattachement:

INSERM UMR S776 "Rythmes Biologiques et Cancers"

CAMPUS CNRS

7 rue Guy Môquet, Bât. A, 3ème étage

94801 Villejuif

<https://rbc.vjf.inserm.fr/>

Directeur : Francis Lévi

PÔLE : PHARMACOLOGIE ET TOXICOLOGIE

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »

5, rue Jean Baptiste Clément

92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex

*à mon amour FATIMA,
à mes Parents et à mes Frères*

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je veux remercier et dédier cette thèse à ma fiancée **Fatima** (my everything), pour son amour, sa patience, sa compréhension, son soutien, son encouragement, et son sacrifice. Merci pour son support tout particulièrement pendant ces quelques derniers mois qui n'ont pas été simples. Je T'aime.

Je remercie également ma mère **Fatima**, mon père **Khodor**, et mes frères (**Mohamad**, **Youssef**, **Issa**, **Moussa**, et **Hussein**), sans qui je n'aurais pu réaliser ce travail de thèse et je leur dédie ce travail. Merci pour leur sacrifice, leur soutien, leur compréhension, leur encouragement, et leur support. Je vous aime.

Je tiens à remercier chaleureusement les rapporteurs et les examinateurs qui me font l'honneur de juger mon travail :

- Monsieur le Professeur **Franck Delaunay**, de l'université de Nice-Sophia Antipolis. Merci d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être rapporteur.
- Monsieur le Professeur **Urs Albrecht**, de l'Université de Fribourg. Merci d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse et d'en être rapporteur.
- Monsieur le Docteur **Bruno Clement**, de l'Université Rennes 1. Merci d'avoir accepté de juger de l'intérêt de ce travail.
- Monsieur le Docteur **Jean-François Doré**, de l'université Lyon 1. Merci d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Soyez assurés de ma profonde gratitude et reconnaissance.

Je remercie très sincèrement mon directeur de thèse, le Dr. **Francis Lévi** pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant de diriger ce travail doctoral. Je voudrais lui exprimer ma profonde reconnaissance pour ses précieux conseils, ses capacités de motivation, son soutien humain indéfectible et sa compréhension personnelle. J'ai été extrêmement sensible à ses qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail doctoral. Merci aussi de m'avoir permis de participer à différents

congrès internationaux qui ont apporté de nombreuses discussions nécessaires à la maturation de ce travail.

Je tiens à remercier très chaleureusement Mme **Elisabeth Filipski** qui a co-encadré cette thèse. Je la remercie tout particulièrement pour son aide précieuse, sa gentillesse et ses conseils avisés.

Je souhaiterais également remercier tous les membres de l'Unité INSERM UMR5776 « Rythmes Biologiques et Cancers », pour leur accueil, leur gentillesse, leurs conseils, leur collaboration et encouragement constantes et pour les bons moments partagés. Un grand merci à **Monique Lévi** pour son aide, sa gentillesse, et bien sur sa patience. Merci à **Xiao Mei Li** et à **Sandrine Dulong** pour leurs disponibilités, leurs conseils, et leurs aides précieuses. Merci aux actuels doctorants avec lesquels j'ai partagé ces années : **Véronique Roche**, **Elisabeth Ortiz-Tudela**, **Narin Ozturk**, et **Mircea Dumitru**. Je tiens à remercier mes collègues de laboratoire : **Alexandre Arbaud** et **Virginie Hossard**.

Je remercie infiniment **Abdoulaye Karaboué** pour son aide précieuse, **Pasquale Innominato** pour les discussions toujours intéressantes et constructives et pour son travail « nocturne » de bibliographie, et **Jacques Beau** pour ses conseils avisés dans l'analyse et le traitement des données.

Je remercie aussi **Mazen Haydar** et **Mahmoud Saleh** pour leurs conseils et leurs aides.

Je remercie vivement le Professeur **Catherine Guettier**, chef du service d'Anatomie Pathologique de l'hôpital Paul Brousse, pour son aide indispensable dans les études histopathologiques, le Docteur **Gijsbertus T.J. van der Horst** de l'université d'Erasmus à Rotterdam, pour la collaboration qui s'est mise en place dans ce cadre de projet C5sys, et m'a permis de réaliser les études avec les souris Cry double mutants.

Un grand merci à mes chers amis : **Raed Mortada** pour le réconfort moral pendant les périodes difficiles, et **Youssef Sojod** pour son aide précieux lors de la rédaction de ma thèse. Je souhaite également remercier tous mes amis, en particulier **Mohamad Mteyrek**, **Kassem Roumani**, **Bilal Ali Ahmad**, et **Mohamad Najem**.

MERCI ENCORE A TOUS...

INDEX

LISTE DES ABREVIATIONS	10
I. RESUME..	12
II. INTRODUCTION	15
II.1. Les rythmes biologiques	16
II.1.1. Définition et Caractérisation.....	16
II.1.2. Contexte historique	18
II.2. Le système circadien et ses altérations	20
II.2.1. Organisation et synchronisation du système circadien.....	20
II.2.2. Les noyaux suprachiasmatiques, pacemaker central	21
II.2.3. L'horloge circadienne moléculaire	22
II.2.3.1. Découverte des gènes de l'horloge.....	22
II.2.3.2. Mécanismes moléculaires de l'horloge génétique	24
II.2.4. Les horloges circadiennes périphériques	25
II.2.5. Coordination du système circadien	27
II.2.6. Principaux bio-marqueurs circadiens physiologiques	29
II.2.6.1. Rythme de La température corporelle.....	29
II.2.6.2. Rythme d'activité-repos	30
II.2.6.3. Rythme de la mélatonine	31
II.2.6.4. Rythme des glucocorticoïdes circulants	33
II.2.7. Altérations du système circadien	35
II.2.7.1. Aspects cliniques	35
II.2.7.1.1. Altérations d'origine externe	35
II.2.7.1.2. Altérations d'origine interne	40
II.2.7.2. Aspects expérimentaux	40
II.2.7.2.1. Destruction stéréotaxique des noyaux suprachiasmatiques ..	40
II.2.7.2.2. Décalage horaire chronique expérimental	42
II.2.7.2.3. Mutations ou mise au silence des gènes de l'horloge circadienne	44

II.3. Foie et Cancérisation hépatique	47
II.3.1. Histologie et fonctions hépatiques et biliaires	47
II.3.2. Organisation circadienne du foie	51
II.3.3. Pathologies hépatiques et biliaires	52
II.3.4. Le carcinome hépatocellulaire	54
II.3.4.1. Mécanismes moléculaires de l'hépatocarcérogénèse	55
II.3.4.2. Modèles animaux de carcinome hépatocellulaire	58
II.3.5. Le cholangiocarcinome	61
II.3.5.1. Mécanismes moléculaires du Cholangiocarcérogénèse	62
II.3.5.2. Modèles animaux de cholangiocarcinome	63
II.4. Système circadien et cancers	64
II.4.1. Aspects cliniques et épidémiologiques.....	64
II.4.1.1. Disruption circadienne d'origine environnementale et cancer	64
II.4.1.2. Valeur pronostique du système circadien	64
II.4.1.3. Disruption de l'horloge moléculaire et cancer.....	65
II.4.2. Aspect expérimentaux	67
II.4.2.1. Destruction des NSC et croissance tumorale	67
II.4.2.2. Modifications de l'environnement photopériodique et cancer	68
II.4.2.2.1 Décalage horaire chronique	68
II.4.2.2.2 Exposition nocturne ou continue à la lumière	69
II.4.2.3. Gènes circadiens et cancer	70
 III. PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS.....	74
 III.1. Problématique générale	74
III.2. Problématique spécifique et objectifs	75
 IV. CONDUITE ET METHODOLOGIE GENERALE DU PROJET....	78
 IV.1. Conduite générale du projet.....	78
IV.1.1. Rôle du gène <i>Per2</i> dans la cancérogénèse hépatique.....	78
IV.1.2. Rôle des gènes <i>Cry1</i> et <i>Cry2</i> dans la cancérogénèse hépatique	79

IV.1.3. Prévention de la cancérogénèse hépatique par alimentation programmée ou chronocorticothérapie.....	79
IV.1.4. Rôle de la mutation constitutionnelle du gène <i>Per2</i> dans la chronotoxicité de la diéthylnitrosamine.....	80
IV.1.5. Rôle de la mutation constitutionnelle du gène <i>Per2</i> dans la chronotoxicité de l'irinotecan	80
IV.2. Souris et synchronisation	83
IV.3. Bio-marqueurs circadiens.....	83
IV.4. Protocoles d'administration de diéthylnitrosamine	83
IV.5. Interventions à visée préventive	83
IV.6. Histopathologie	84
IV.7. Prélèvements sanguins et tissulaires	84
IV.8. Dosage des enzymes hépatiques circulantes.....	85
IV.9. Mesure des concentrations sériques de corticostérone par ELISA	85
IV.10. Mesure des concentrations hépatiques de cytokines par ELISA.....	85
IV.11. Extraction et mesure d'expression des ARNm par RT-PCR.....	85
IV.12. Analyses statistiques.....	86
V. RESULTATS	88
V.1. Aspects généraux de la chronothérapeutique du cancer	89
V.1.1. Résumé	89
V.1.2. Article publié: Cancer Chronotherapeutics: Experimental, Theoretical, and Clinical Aspects	90
V.2. Rôle du gène <i>Per2</i> dans la cancérogénèse hépatique	118
V.2.1. Résumé	118
V.2.2. Article soumis: Clock gene <i>Per2</i> as a controller of liver carcinogenesis pathways	119
V.3. Rôle des gènes <i>Cry1</i> et <i>Cry2</i> dans la cancérogénèse hépatique.....	149
V.3.1. Résumé	149
V.3.2. Article soumis: Critical cholangiocarcinogenesis control by cryptochrome clock genes	150

V.4. Interventions à visée de prévention de la cancérogénèse hépatique : alimentation programmée et chronocorticothérapie	170
V.4.1. Résumé	170
V.4.2. Résultats	171
V.4.3. Discussion et Conclusions.....	187
V.5. Rôle de la mutation du gène <i>Per2</i> dans la chronotoxicité de la Diéthylnitrosamine	189
V.5.1. Résumé	189
V.5.2. Résultats	190
V.5.3. Discussion et Conclusions.....	192
V.6. Personnalisation de la chronothérapie du cancer	194
V.6.1. Résumé	194
V.6.2. Article publié: A circadian clock transcription model for the personalization of cancer chronotherapy.....	195
 VI. DISCUSSION GENERALE.....	219
 VII. PERSPECTIVES.....	231
 VIII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	233
 IX. LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX.....	261

LISTE DES ABREVIATIONS

γ GT : γ Glutamyl transferase
5'NT : 5' nucléotidase
ACTH : adrénocorticotrophine
AFP : alphafoetoprotéine
ALAT : alanine amino transferase
ANOVA : analyse de variance
ASAT : aspartate amino transferase
ASPS : Advanced Sleep Phase Syndrom (Syndrome d'avance de phase)
CC : cholangiocarcinome
bHLH : basic-Helix-Loop-Helix
CA 19-9 : carbohydrate antigen 19.9
CCG : Clock Controlled Genes
CHC : carcinome hépatocellulaire
Clock : circadian locomotor output kaput
CRH : corticotropin-releasing hormone
Cry : cryptochrome
DD : dark-dark (obscurité constante)
DEN : diéthylnitrosamine
DHC : décalage horaire chronique
DSPS : Delayed Sleep Phase Syndrome (syndrome de retard de phase)
DTT : dithiothreitol
GOS : ostéosarcome de Glasgow
GSC : ganglion cervical supérieur
hADL : heures Après le Début de la Lumière
iNOS : inductible nitric oxyde synthase
IRM : imagerie par résonance magnétique
LD12 :12 : alternance de 12 heures de lumière (L) et de 12 heures de l'obscurité (D, pour darkness)
LL : lumière (L) constante
MGMT : méthyle guanine méthyle transférase
NPV : noyau paraventriculaire de l'hypothalamus
NSC : noyaux suprachiasmatiques
O4-EtdT : O4-ethyldeoxythymidine
O6-EtdG : O6-ethyldéoxyguanosine
P03 : adénocarcinome pancréatique

PAL : phosphatases alcalines

Per2 : period 2

Rb : retinoblastomE

RT-PCR : reverse transcriptase- polymerase chain reaction

TTFL : Transcription-Translation Feedback Loop

ZT : Zeitgeber

I. RESUME

Les organismes vivant possèdent des rythmes circadiens endogènes d'environ 24 heures, qui sont synchronisés par les cycles de l'environnement, et notamment l'alternance des jours et des nuits. De tels rythmes caractérisent la plupart des processus et fonctions biologiques des mammifères et sont générés par le système circadien, composé d'un pacemaker central, d'un ensemble de rythmes physiologiques et d'horloges moléculaires qui rythment le métabolisme et la prolifération cellulaire. Chez l'Homme, la disruption du système circadien semble augmenter le risque de cancer, ainsi que le souligne l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (2007, 2010). La disruption du système circadien provoquée par la destruction physique des noyaux suprachiasmatiques, une altération prolongée de l'environnement photopériodique, ou la mutation ou mise au silence de certains gènes de l'horloge circadienne accélère la croissance de cancers expérimentaux greffés chez l'animal et/ou la cancérogénèse dans certains modèles expérimentaux.

Mon projet de thèse visait à préciser le rôle de l'horloge circadienne dans la cancérisation hépatique expérimentale et sa prévention. Il était notamment nécessaire d'identifier et de comprendre le rôle éventuel des gènes de l'horloge circadienne *Per2* et *Cry1/Cry2* dans la cancérogénèse hépatique chimio-induite. Mon objectif a été alors l'identification des principaux mécanismes moléculaires et hormonaux impliqués dans les étapes précoces de la cancérogénèse hépatique, et qui sont sous le contrôle du système circadien. J'ai concentré mon approche sur certaines étapes de la prolifération cellulaire, de l'apoptose, du contrôle de l'intégrité génomique, et de l'inflammation. Le troisième objectif était la définition d'interventions thérapeutiques visant à prévenir la cancérogénèse hépatique par la prise en compte de l'horloge circadienne.

J'ai d'abord montré chez la Souris que la mutation du gène *Per2* provoquait une disruption circadienne de gènes de l'horloge circadienne, de gènes du cycle cellulaire et de l'apoptose dans le foie, et amortissait ou supprimait les rythmes de la température corporelle, de l'activité-repos, et de la corticostéronémie, malgré l'exposition au synchroniseur photopériodique. Cette altération de la coordination circadienne s'est traduite par l'accélération de la cancérogénèse hépatique induite par la diéthylnitrosamine. La majorité des lésions hépatiques observées à ~6 mois correspondaient à un carcinome hépatocellulaire. La mutation du gène *Per2* s'est révélée délétère en favorisant les mécanismes moléculaires de la cancérogénèse hépatique, dès l'initiation et les étapes précoces de la cancérisation

hépatique. Ainsi j'ai notamment identifié une surexpression des ARNm de l'oncogène *c-Myc* et de la cycline mitotique *Ccnb1*, une augmentation des concentrations hépatiques de l'Interleukine-6 (IL-6) et du Facteur Nécrosant des Tumeurs α (TNF- α), qui toutes concourent à la cancérogenèse hépatique. De plus, il existe une perte du contrôle circadien de l'expression des gènes du cycle cellulaire et de l'apoptose dans le foie des souris exposées à la diéthylnitrosamine. Ces résultats sont présentés dans la deuxième partie de résultats, et font l'objet d'un article soumis à *Cancer Research*.

J'ai ensuite étudié l'effet de la double délétion *Cry1/Cry2* dans la cancérogenèse hépatique induite par la diéthylnitrosamine. J'ai montré que les souris *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* présentaient une moindre toxicité systémique de la DEN, évaluée d'après la perte de poids corporel, mais une augmentation statistiquement significative des concentrations sériques des transaminases ALAT et ASAT, et des phosphatases alcalines, en comparaison des souris sauvages. J'ai mis en évidence que l'exposition au cancérogène altèrait les rythmes circadiens de l'activité locomotrice et de la température corporelle, de façon plus importante chez les souris *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* que chez les souris sauvages. J'ai évalué l'incidence de cancers hépatiques selon le génotype des souris et montré son quintuplement chez les souris *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}*. La majorité des lésions correspondaient à un cholangiocarcinome. Ces résultats font l'objet d'un article soumis pour publication au *Journal of Hepatology* (Partie V.3 de résultats).

L'alimentation programmée ou l'administration quotidienne de dexaméthasone constituent des interventions capables de renforcer la synchronisation du système circadien. J'ai montré que, contrairement à l'hypothèse avancée, l'alimentation programmée quotidienne de 6 h en milieu de phase d'activité nocturne, ou l'administration quotidienne de dexaméthasone en début de phase d'activité nocturne ne renforçaient les rythmes d'expression des gènes de l'horloge circadienne hépatique ni chez les souris sauvages, ni chez les *Per2^{m/m}* exposées à la diéthylnitrosamine. Ceci suggère une interaction de ce cancérogène avec les mécanismes de synchronisation de l'horloge génétique par l'alimentation programmée et la dexaméthasone. Cependant, ces deux interventions ont exercé des effets importants sur les étapes précoces de la cancérogenèse hépatique, et notamment la répression de *c-Myc* et de *K-ras*, la surexpression de *Wee1*, qui contrôle la transition G2/M du cycle cellulaire, et la diminution des concentrations hépatiques d'IL-6 et de TNF- α . Ces résultats suggèrent que des interventions ciblant le système circadien pourraient prévenir la cancérogenèse hépatique sans nécessairement renforcer l'horloge moléculaire génétique du foie (partie V.4 de résultats).

Afin de préciser le rôle de l'horloge circadienne dans la toxicité chronique de la DEN, j'ai exposé à une même dose de ce cancérigène des lots distincts de souris femelles sauvages ou porteuses de la mutation du gène *Per2* à six stades circadiens. J'ai ainsi montré que la toxicité de la DEN évaluée par la perte de poids, la mortalité, et les taux sériques des transaminases ALAT et ASAT était significativement plus importante chez les souris sauvages par rapport aux sauvages *Per2^{m/m}* à tous les horaires d'administration testés sauf à ZT11 (partie V.5 de résultats).

Enfin, j'ai contribué au programme européen de recherche C5sys visant à personnaliser la chronothérapie des cancers, selon les rythmes d'expression des gènes hépatiques. En utilisant des souris males et femelles de trois fonds génétiques différents, nous avons identifié trois classes de la chronotoxicité de l'irinotecan, qui différaient d'après la forme de la courbe de chronotoxicité, son amplitude et sa phase. Ainsi l'heure de meilleure tolérance à l'irinotecan, un médicament anticancéreux largement utilisé en cancérologie digestive, variait jusqu'à huit heures, selon le sexe et le fond génétique. Les marqueurs moléculaires permettant de discriminer ces 3 classes ont été recherchés. L'expression circadienne des ARNm de 27 gènes ont été mesurés dans le foie et le côlon au cours des 24 heures. L'analyse mathématique a révélé que *Bmal1* et *Rev-erba* étaient les deux séries temporelles les plus discriminantes. Ces résultats ont été validés en mesurant l'expression de ces deux gènes chez des souris *Per2^{m/m}* males et femelles, qui représente ma contribution à ce projet. L'ensemble des données a permis de construire et de valider un modèle mathématique capable de prédire l'heure optimale de l'irinotecan en se fondant sur la mesure des rythmes d'expression hépatique de *Bmal1* et de *Rev-erba*, indépendamment du sexe et du fonds génétique.

En conclusion, l'ensemble des résultats valident l'hypothèse que la mutation ou la mise au silence de trois gènes de la boucle négative de l'horloge circadienne moléculaire accélère la cancérogénèse hépatique et favorise la survenue de trois « caractéristiques » du cancer : instabilité génomique, prolifération cellulaire, et inflammation. Des interventions ciblant le système circadien pourraient prévenir la cancérogénèse hépatique en renforçant la régulation circadienne de ces voies de signalisation, sans nécessairement interagir avec l'horloge moléculaire de cet organe.

INTRODUCTION

II. INTRODUCTION

II.1. Les rythmes biologiques

II.1.1. Définition et caractérisation

La rythmicité est une caractéristique essentielle des phénomènes naturels et des êtres vivants. Depuis l'apparition des premiers organismes vivants sur la terre, ces derniers ont dû s'adapter aux cycles naturels tels que l'alternance de la lumière et de l'obscurité, l'alternance des périodes de chaud et de froid. En effet, on retrouve l'existence des oscillations temporelles à tous les niveaux de l'évolution du vivant, des organismes unicellulaires aux organismes complexes (animal et végétal).

Un rythme biologique se définit comme la variation périodique d'une mesure biologique au cours du temps. Cette définition désigne une grande variété de phénomènes biologiques rythmiques, couvrant des périodes allant de quelques millisecondes à plusieurs années et se produisant à l'échelle de différents systèmes biologiques.

Plusieurs méthodes mathématiques sont utilisées pour quantifier les paramètres d'un rythme biologique. Le **Cosinor** est le modèle le plus utilisé. Cette approximation des données expérimentales recueillies en fonction du temps par une fonction sinusoïdale permet de caractériser un rythme biologique par l'estimation de sa période, son amplitude, son acrophase, et son méso (Figure 1) (Nelson *et al.*, 1979; Bingham *et al.*, 1982).

- a) La première caractéristique d'un rythme est sa **période (τ)** qui représente la durée d'un cycle complet d'une variation (exprimée en secondes, minutes, heures,...). C'est par exemple l'intervalle de temps entre 2 pics ou 2 creux.
- b) Pour un rythme biologique, l'**amplitude (A)** est l'écart entre le niveau moyen et la valeur maximale.
- c) L'**acrophase (ϕ)** (Acro en latin, signifie le plus haut) dont l'opposée est la « bathyphase », est la position temporelle de l'occurrence de la valeur la plus élevée d'un rythme. L'étude des rythmes biologiques chez l'animal de laboratoire fait souvent appel à leur synchronisation par l'alternance de 12 heures de la lumière et 12 heures de l'obscurité, synchroniseur principal, ou Zeitgeber (ZT). Le temps est habituellement exprimé en référence au début de la lumière (ZT0, ou hADL -heures Après le Début de la Lumière)

d) .Le niveau moyen ajusté d'un rythme représente **le méSOR (M)** (Midline Estimating Statistic Of Rhythms). Il est exprimé en unité de la variable étudiée.

La Figure 1 représente un exemple de rythme biologique d'allure sinusoïdale et précise la terminologie utilisée pour le caractériser.

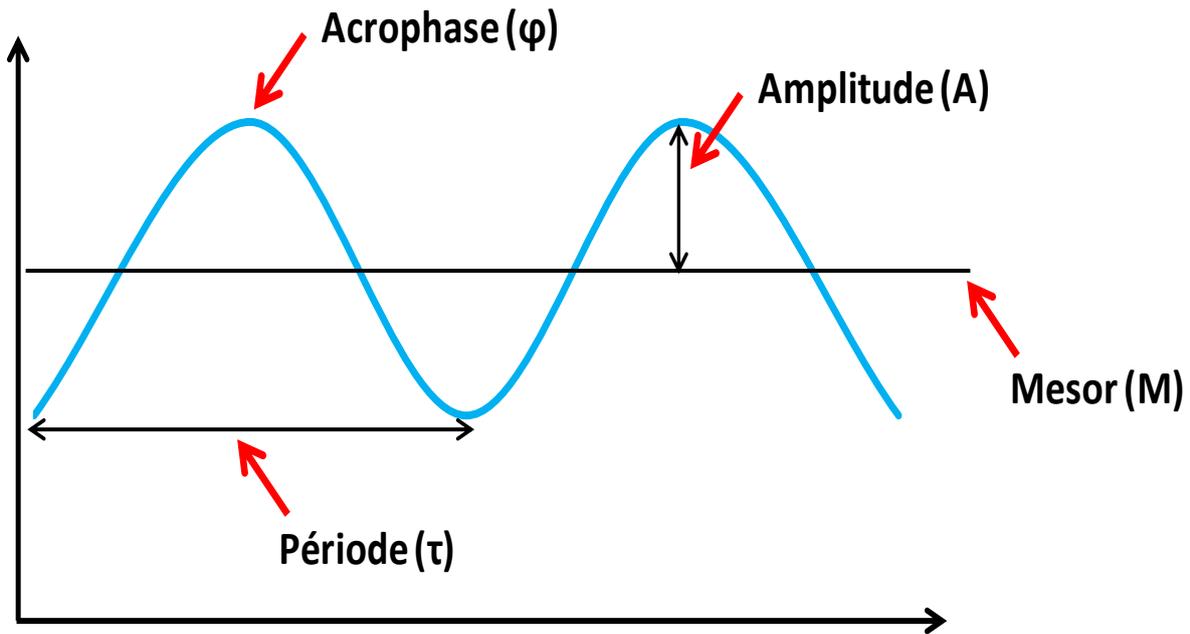


Figure 1 : Paramètres caractérisant un rythme biologique

Les rythmes biologiques peuvent être classés en fonction de leur période (Tableau 1) (Goldbeter *et al.*, 2010). On distingue alors :

- Les rythmes **ultradiens**, de période inférieure à 20 heures.
- Les rythmes **circadiens**, d'environ 24 heures (+ ou - 4 heures).
- Les rythmes **infradiens**, de période supérieure à 28 heures.

Tableau 1 : Principaux rythmes biologiques (Adapté de Goldbeter et al, 2010)

Domaines	Périodes	Fonctions
ultradien ($\tau < 20$ heures)	0,001 s à 10 s 1 s secondes à minutes 30 s à 20 min	neuronaux cardiaque Oscillations de calcium Oscillations biochimiques
circadien ($20 \text{ heures} \leq \tau \leq 28 \text{ heures}$)	24 heures	Cycle veille-sommeil sécrétion du cortisol Pression sanguine
infradien ($\tau > 28$ heures)	28 jours 1 an	Cycle ovarien Rhinite allergique

Mon projet de thèse concerne les rythmes **circadiens**, du latin **circa** (environ) et **dies** (jour), dont la période est d'environ 24 heures.

II.1.2. Contexte historique

L'existence de rythmes journaliers chez les plantes et les animaux est connue depuis longtemps. Au 4^{ème} siècle avant JC, Androsthènes, avait observé que les feuilles du tamarinier s'ouvraient au cours de la journée et se refermaient au cours de la nuit. Les premières publications démontrant l'existence de rythmes d'environ 24 heures proviennent d'études réalisées sur les plantes. En 1729, Jean-Jacques d'Ortous de Mairan a observé l'ouverture et la fermeture des feuilles de mimosa au cours du jour et de la nuit, même si la plante était en obscurité constante. Cette expérience démontrait qu'un facteur autre que l'environnement de la plante, possiblement un élément interne, pourrait expliquer ce phénomène. Par la suite, les observations des rythmes physiologiques ou comportementaux se sont accumulées au cours des siècles. En effet, l'endogénéité des oscillations circadiennes a été mise en évidence chez les animaux au début du 20^{ème} siècle. Lorsque des souris ou des rats sont placés dans des conditions lumineuses constantes (lumière ou obscurité continue), le rythme d'activité locomotrice est conservé. Dans un environnement lumineux rythmique, avec alternance de 12 heures de Lumière (L) et 12 heures d'obscurité, (D pour Darkness) (LD12 : 12), l'enregistrement de l'activité locomotrice de la Souris ou du Rat montre que celle-ci suit un rythme circadien de 24 heures, avec des valeurs élevées au cours de la nuit. Les animaux

placés en obscurité constante (DD) ne disposent plus des repères temporels de leur environnement, et sont dits en « libre cours ». Le rythme de l'activité locomotrice du Rat ou de la Souris persiste alors pendant plusieurs mois (Figure 2) (Dardente *et al.*, 2004).

C'est en 1959 que **Franz Halberg** a proposé le terme "**circadien**" pour désigner les rythmes de 24 heures. Il est considéré comme l'un des fondateurs de la **chronobiologie** moderne.

La **chronobiologie** se définit comme : « l'étude de l'organisation temporelle des êtres vivants, des mécanismes qui la contrôlent et de leurs altérations ».

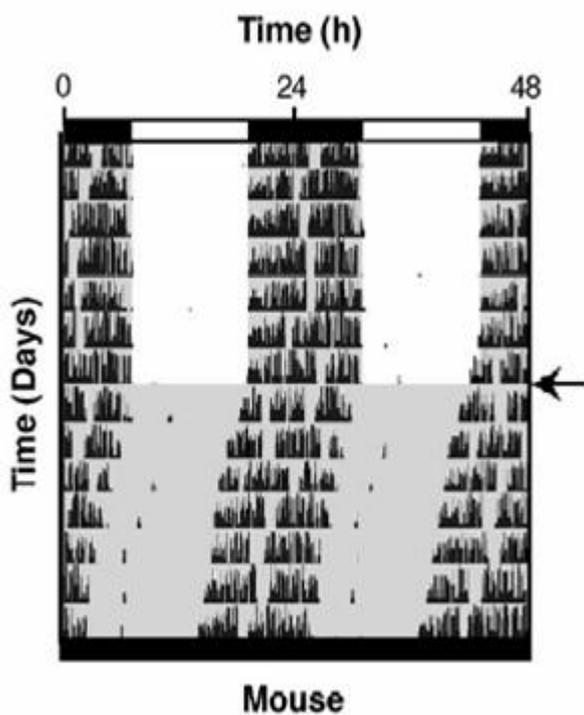


Figure 2: Exemple d'enregistrement de l'activité locomotrice d'une souris d'activité nocturne.

Enregistrements représentatifs de l'activité locomotrice de roue en double tracé. Les animaux sont maintenus en conditions LD12:12 (barres horizontales blanches et noires en haut), avant d'être placés en obscurité constante (barre horizontale noire en bas) au moment indiqué par la flèche. Les zones grisées symbolisent l'obscurité (D'après Dardente *et al.*, 2004).

II.2. Le système circadien et ses altérations

II.2.1. Organisation et synchronisation du système circadien

La rythmicité circadienne est à l'origine du concept d'horloge biologique. Le système circadien des mammifères est composé **1)** d'un pacemaker hypothalamique, les noyaux suprachiasmatiques (NSC), **2)** d'un système de signalisation, la physiologie circadienne, et **3)** d'horloges moléculaires présentes dans la majorité des cellules de l'organisme. Les horloges génétiques sont constituées d'une quinzaine de gènes spécifiques (Figure 3) (Reppert *et al.*, 2001; Reppert *et al.*, 2002; Mohawk *et al.*, 2012; Partch *et al.*, 2013).

Le synchroniseur est un facteur périodique externe, environnemental, physique, chimique, et parfois social, qui assure la régulation, le contrôle, et le maintien de la période propre des rythmes circadiens. L'alternance lumière/obscurité sur 24 heures constitue le synchroniseur prépondérant des rythmes circadiens. D'autres facteurs comme les comportements sociaux et environnementaux et les horaires de la prise alimentaire peuvent influencer la période des rythmes circadiens. Par exemple, le moment de la prise alimentaire détermine l'organisation temporelle des rythmes circadiens de la prolifération cellulaire intestinale et de certains paramètres métaboliques dans le foie. Notons que ces facteurs exogènes ne créent pas la rythmicité, mais la calibrent et en modifient les paramètres (Levi *et al.*, 2007; Ueda, 2007; Ukai *et al.*, 2010).

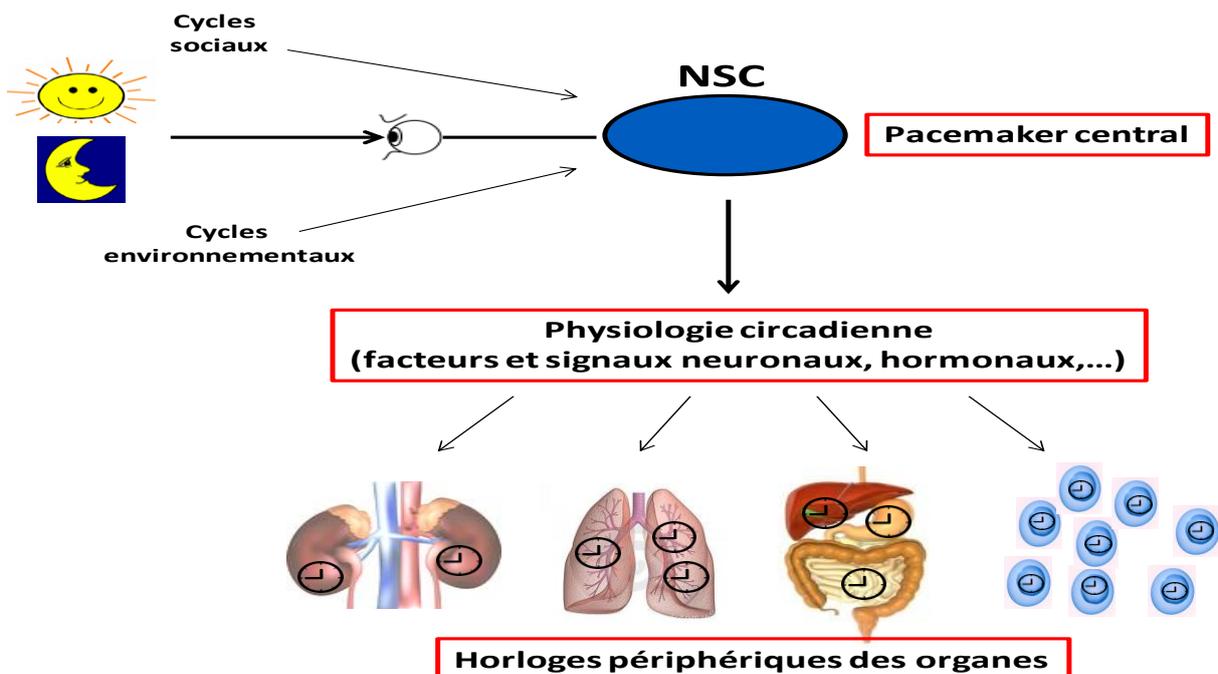


Figure 3 : Schéma d'organisation du système circadien (NSC : noyaux suprachiasmatiques)

II.2.2. Les noyaux suprachiasmatiques, pacemaker central

Une des caractéristiques fondamentales des rythmes circadiens est leur endogenité. Dans les années 1970, les scientifiques ont cherché à identifier la structure capable de générer les rythmes circadiens. Les travaux expérimentaux ont d'abord démontré que les noyaux suprachiasmatiques (NSC) constituaient l'horloge unique de l'organisme (Moore *et al.*, 1972; Stephan *et al.*, 1972). Les NSC sont localisés à la base du 3ème ventricule dans l'hypothalamus antérieur au dessus du chiasma optique (d'où leur nom) (Figure 4). Ils sont constitués de deux groupes symétriques de neurones d'environ 10 000 chacun, (Turek, 1985; Moore, 1997; Ko *et al.*, 2006; Mohawk *et al.*, 2011). Plusieurs expériences ont montré que les NSC génèrent effectivement de nombreux rythmes physiologiques et comportementaux. En effet, la destruction complète des noyaux suprachiasmatiques abolit les rythmes d'activité-repos, de la prise alimentaire, de la température corporelle, et le rythme de la sécrétion de mélatonine (Stephan *et al.*, 1972). A l'inverse, la greffe de NSC fœtaux à un animal dont les NSC ont été préalablement détruits rétablit les rythmes abolis (Ralph *et al.*, 1990). Enfin, les neurones de NSC mis en culture peuvent maintenir pendant plusieurs semaines un rythme circadien de leur activité électrique, même en absence d'un synchroniseur (Welsh *et al.*, 1995; Welsh *et al.*, 2010).

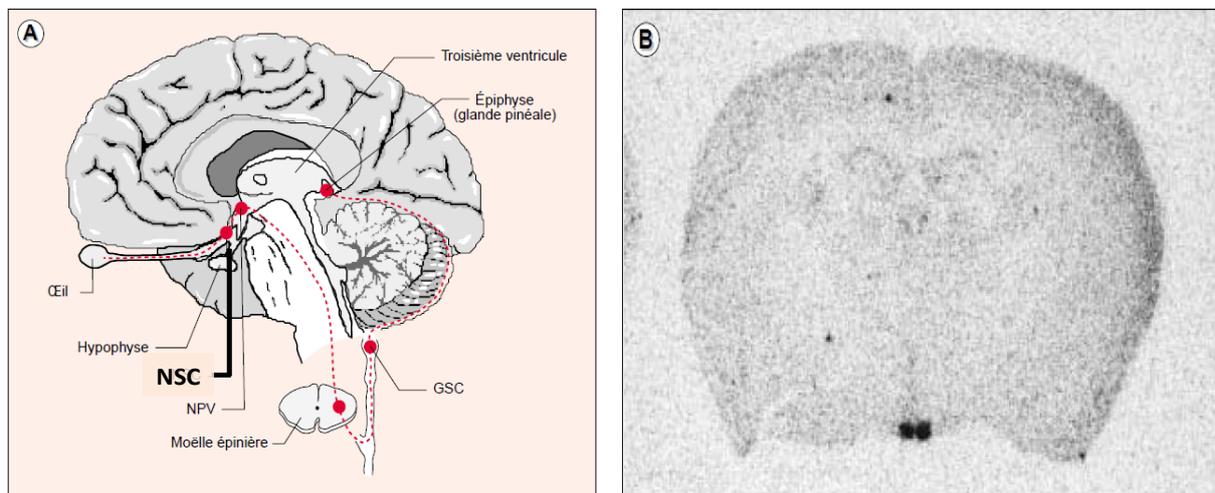


Figure 4 : Localisation des noyaux suprachiasmatiques. **A.** Schéma anatomique montrant la position des noyaux suprachiasmatiques (NSC) dans l'hypothalamus. **B.** Analyse de l'expression du gène codant pour le peptide VIP sur une coupe de cerveau de souris. Dans le cerveau, le VIP est exprimé spécifiquement au niveau du NSC et peut donc servir de marqueur pour cette structure. (NPV : noyau paraventriculaire de l'hypothalamus ; GSC : ganglion cervical supérieur). D'après (Ibata *et al.*, 1999).

II.2.3. L'horloge circadienne moléculaire

II.2.3.1. Découverte des gènes de l'horloge

L'approche systémique commence à révéler les mécanismes moléculaires de l'horloge dans la deuxième moitié du 20^e siècle. La démonstration initiale de l'existence d'une origine génétique de l'horloge circadienne a été faite chez *Drosophila melanogaster* par Konopka et Benzer en 1971. Un « *screening* » après mutagenèse chimique a permis d'isoler des mutants dont le rythme de l'activité locomotrice était supprimé, conduisant ainsi à identifier puis à cloner le gène *Period (Per)*, le premier gène connu responsable d'un rythme circadien. Celui-ci est situé sur le chromosome X de la Drosophile (Konopka *et al.*, 1971). Ensuite, d'autres gènes ont été identifiés à partir d'altérations spontanées ou provoquées des phénotypes circadiens : *timeless (tim)*, *frequency (frq)*, *clock*,... (Takahashi, 2004). Chez la souris, la mutagenèse chimique a permis d'obtenir des animaux dont le cycle activité-repos était significativement allongé. Le gène *Clock* pour « Circadian Locomotor Output Kaput » dont la mutation était responsable de cette altération a ensuite été caractérisé (Vitaterna *et al.*, 1994), puis cloné en 1997. Ce gène est situé sur le chromosome 5 de la souris, et sur le chromosome 4 de l'homme. Par la suite une dizaine d'autres gènes a été identifié : *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2*, *Bmal1*, *Reverb- α* ,... (Tableau 2).

Tableau 2 : Gènes de l'horloge génétique circadienne des mammifères. Adapté de (Zhang *et al.*, 2010).

Gène	Nom complet	Fonction	Rôle dans l'horloge
<i>Clock</i>	circadian locomotor output cycles kaput	Facteurs de transcription contenant un motif bHLH-PAS ; histone acétyltransferase	Activation des gènes de l'horloge avec E-Box
<i>Bmal1</i>	brain and muscle ARNT-like 1	Facteurs de transcription contenant un motif bHLH-PAS ; histone acétyltransferase	Activation des gènes de l'horloge avec E-Box
<i>Npas2</i>	neuronal PAS domain containing protein 2	Facteur de transcription contenant un motif bHLH-PAS	Paralogue de CLOCK ; dimerisation avec BMAL1 pour activer les gènes qui ont un E-box
<i>Per1, Per2, Per3</i>	period	Régulateurs de transcription avec domaine PAS	Répression des gènes de l'horloge avec E-Box
<i>Cry1, Cry2</i>	cryptochrome	Photorécepteurs, flavoprotéines	Répression des gènes de l'horloge avec E-Box
<i>Nr1d1;Nr1d2 (Rev-erba; Rev-erbβ)</i>	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1 & 2	Récepteurs nucléaires	Récepteurs nucléaires Répression des gènes de l'horloge avec RRE box
<i>Dec1 ; Dec2</i>	differentially expressed in chondrocytes	Facteurs de transcription contenant un motif bHLH	Répression de la transcription par CLOCK-BMAL1
<i>CSNK1D</i>	casein kinase 1, delta	Caseine kinase	Phosphorylation et déstabilisation de PER
<i>CSNK1E</i>	casein kinase 1, epsilon	Caseine kinase	Phosphorylation et déstabilisation de PER
<i>RORα ;RORβ ; RORγ</i>	retinoid-related orphan receptor	Récepteurs nucléaires	Activation des gènes de l'horloge par les éléments ROR (RREs)
<i>DBP</i>	D-site albumin promoter binding protein	Facteur de transcription contenant un motif RAR leucine-zipper	Activation des gènes de l'horloge avec D-box
<i>Tim</i>	timeless	Activité d'heterodimerisation	Interaction avec les autres protéines de l'horloge
<i>SIRT1</i>	sirtuin 1	Histone déacétylase, classe III	S'associe à PER2 ; Répression de la transcription induite par CLOCK-BMAL1
<i>GSK3β</i>	Glycogen synthase kinase 3 beta	Protéine kinase	Phosphorylation de REV-ERB-α et régulation de sa stabilité
<i>CSNK2A</i>	casein kinase 2, alpha polypeptide	Caséine kinase	Phosphorylation et déstabilisation de PER

II.2.3.2. Mécanismes moléculaires de l'horloge génétique

Une quinzaine de gènes sont impliqués dans la genèse et la distribution des messages rythmiques et sont qualifiés de "gènes horloges". Mohawk et ses collègues ont décrit le modèle de l'horloge moléculaire circadienne des mammifères (Mohawk *et al.*, 2012). Cette horloge est formée de 2 composantes principales : une composante activatrice et une autre inhibitrice. La composante de régulation positive fait intervenir les hétérodimères BMAL1/CLOCK ou BMAL1/NPAS2. Ces hétérodimères migrent dans le noyau et activent la transcription des gènes *Period* (*Per1, 2, 3*) et *Cryptochrome* (*Cry1, 2*) en se liant à l'ADN (via leur domaine bHLH-PAS : basic-Helix-Loop-Helix) au niveau d'une E-box (Gekakis *et al.*, 1998; Hogenesch *et al.*, 1998). Ainsi, l'hétérodimère BMAL1/CLOCK régule l'expression de "gènes contrôlés par l'horloge" (CCG, Clock Controlled Genes), qui à leur tour vont rythmer le métabolisme et la prolifération cellulaires. La composante principale de rétrocontrôle inhibitrice est formée des protéines PER(s) et CRY(s) qui constituent une boucle de rétrocontrôle négatif (TTFL). Les protéines PER(s) et CRY(s) forment des hétérodimères via leur domaine PAS et pénètrent dans les noyaux en inhibant l'activité transcriptionnelle du dimère CLOCK / BMAL1, ainsi que leur propre transcription (Kume *et al.*, 1999; Shearman *et al.*, 2000; Buhr *et al.*, 2013; Partch *et al.*, 2013). Un cycle complet de cette boucle dure environ 24 heures (Figure 5).

En effet, il y a une différence entre l'activation du gène *Clock* et celle son homologue *Npas2* dans le mécanisme moléculaire de l'horloge centrale et des horloges périphériques (DeBruyne *et al.*, 2007b; DeBruyne *et al.*, 2007a). En effet, *Clock* semble être indispensable dans le mécanisme moléculaire du foie mais pas pour celui des NSC.

D'autres boucles secondaires peuvent réguler l'activité transcriptionnelle des gènes de la boucle principale. En effet, le gène *Rev-erba* dont la transcription est activée par le dimère CLOCK/BMAL1, produit une protéine qui inhibe la transcription de *Bmal1*. Les récepteurs nucléaires *Rora*, *Rorβ*, et *Rorδ* sont activés par le dimère CLOCK/BMAL1. En retour, leurs protéines entrent dans les noyaux et activent *Bmal1*. D'autres protéines de l'horloge comme DEC1 et DEC2 peuvent interagir avec l'hétérodimère BMAL1/CLOCK pour l'activation de la transcription de *Per* et *Cry*. Récemment, plusieurs études ont montré que l'horloge moléculaire circadienne peut être régulée par certains microARNs (Cheng *et al.*, 2007; Pegoraro *et al.*, 2008; Hansen *et al.*, 2011; Kojima *et al.*, 2011; Chu *et al.*, 2013).

Il existe aussi de nombreuses régulations post-traductionnelles des protéines horloges de la boucle moléculaire principale (phosphorylations, SUMOylations, ubiquitinations, etc). La

stabilité et l'activité des protéines PER(s) et CRY(s) sont régulées par l'ubiquitination qui est assurée par un complexe protéique contenant la protéine β -TrCP pour PER et la protéine F-box FBXL3 pour CRY, et par la phosphorylation par les protéines kinases (CK1 ϵ/δ).

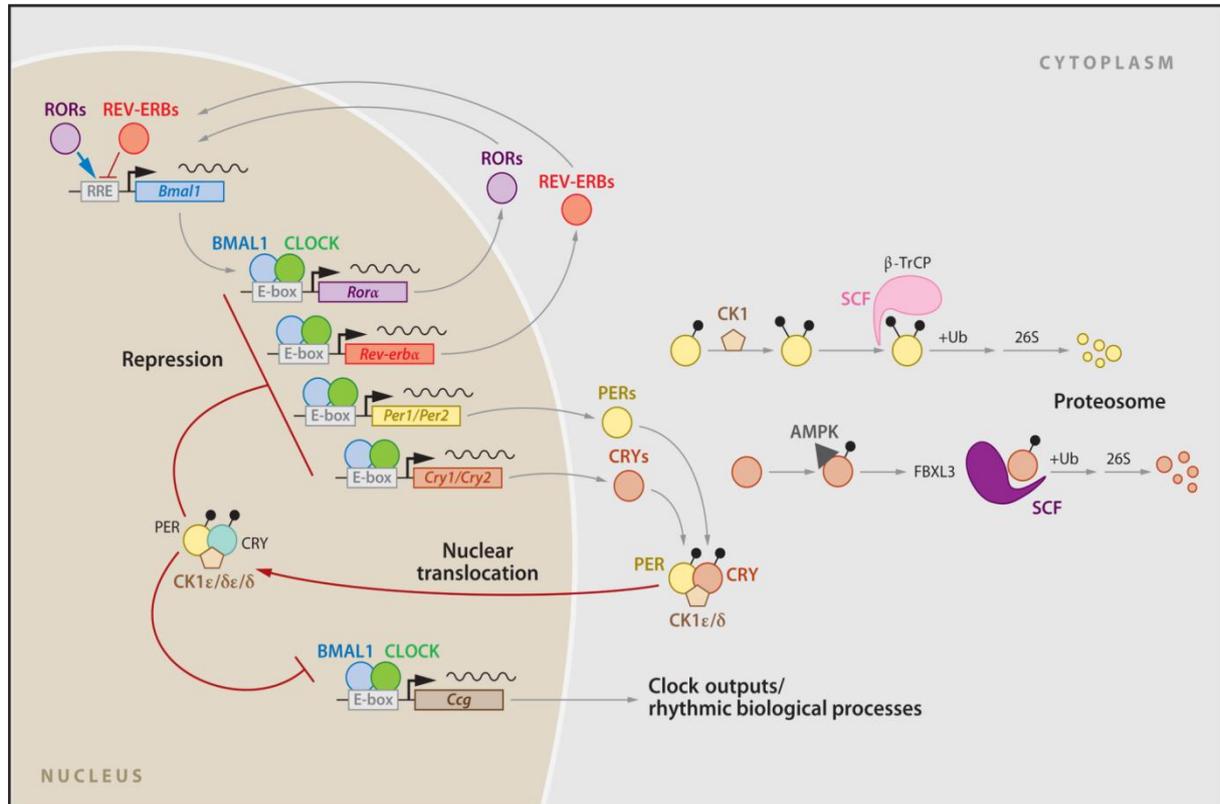


Figure 5 : Organisation moléculaire de l'horloge circadienne chez les mammifères. Une boucle de rétrocontrôle moléculaire et des boucles secondaires qui permettent les régulations transcriptionnelles et traductionnelles. Adapté de (Mohawk *et al.*, 2012).

II.2.4. Les horloges circadiennes périphériques

Les gènes de l'horloge sont exprimés non seulement dans les NSC, mais aussi dans d'autres régions du cerveau, dans le foie, le rein et la quasi-totalité des tissus (Yamazaki *et al.*, 2000; Yoo *et al.*, 2004). Les horloges circadiennes localisées dans les tissus ou organes sont appelées « horloges périphériques ». Une des premières études qui montre la persistance des rythmes circadiens dans les tissus périphériques chez des souris dont les NSC ont été détruits, a été réalisée dans notre laboratoire. Ces animaux ont montré la persistance d'un rythme d'expression du gène de la dihydropyrimidinedéshydrogenase dans le foie, ainsi qu'une distribution rythmique des phases du cycle cellulaire dans la moelle osseuse (Filipski *et al.*, 2004b). Les oscillateurs périphériques se différencient aussi de l'horloge principale par un

amortissement de leurs oscillations *in vitro*. Ainsi, le rythme du gène de l'horloge circadienne (*Period 2*) persiste dans certains nombre d'explants de tissus (foie, rein, poumon, ...) (Yoo *et al.*, 2004) (Figure 6). L'amortissement des oscillations dans les tissus périphériques ne résulte pas d'une perte de rythmicité mais de la désynchronisation des cellules entre elles (Nagoshi *et al.*, 2004; Welsh *et al.*, 2004). En plus, ces oscillations périphériques persistent dans des explants de tissus prélevés chez des animaux rendus arythmiques par une destruction chirurgicale des NSC. Le mécanisme moléculaire des horloges périphériques a été étudié, il indique que le fonctionnement cyclique des oscillateurs périphériques repose sur le même mécanisme moléculaire que celui des neurones des NSC (Yagita *et al.*, 2001).

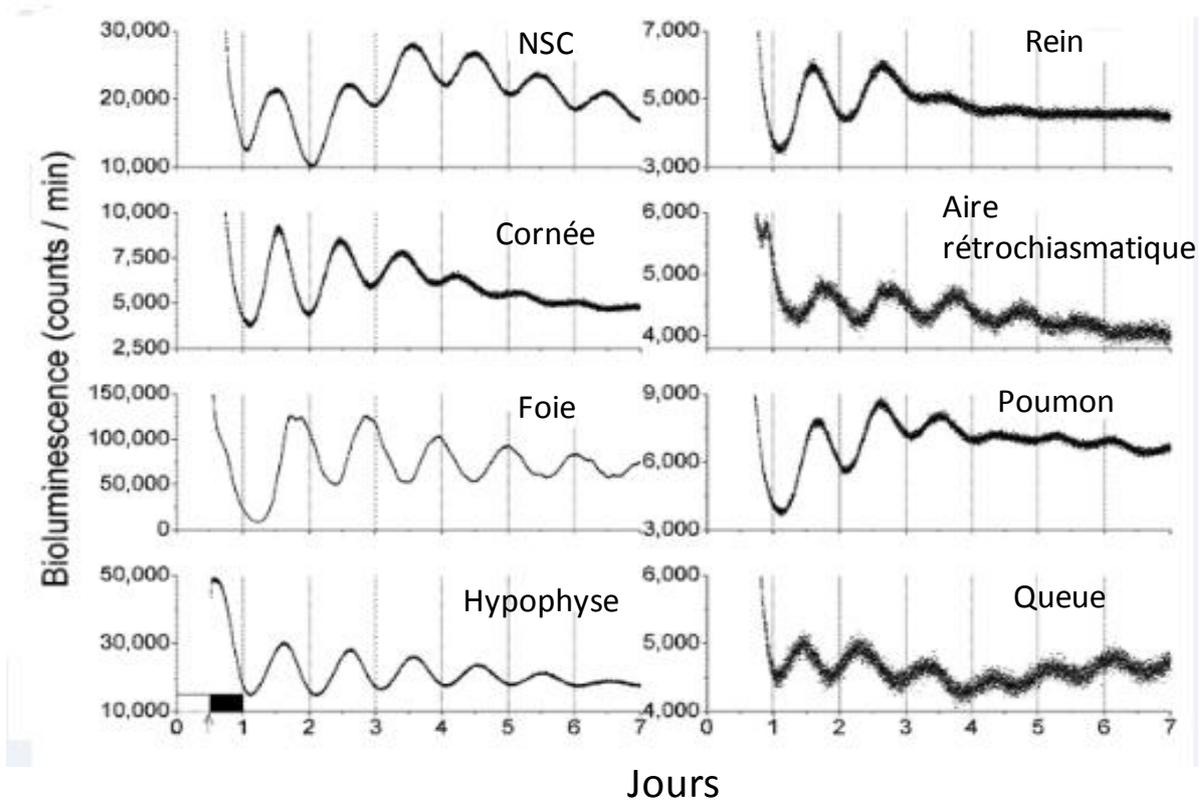


Figure 6 : Enregistrements en temps réel de la bioluminescence émise par divers tissus de souris mutantes *PER2-Luciférase*. Les tissus sont prélevés au moment de l'extinction de la lumière. Ils sont ensuite mis en culture et la bioluminescence est enregistrée par un système d'acquisition. Adapté de (Yoo *et al.*, 2004).

II.2.5. Coordination du système circadien

Les rythmes circadiens endogènes sont modulés par les cycles exogènes appelés "synchroniseurs" ou *Zeitgeber* (donneurs de temps). Dans les conditions naturelles, un être vivant est soumis à l'action de plusieurs synchroniseurs. L'alternance de la lumière et de l'obscurité est le facteur le plus puissant dans la synchronisation des horloges biologiques. D'autres facteurs peuvent moduler les rythmes circadiens, tels que les facteurs sociaux et environnementaux. En effet, L'information lumineuse est transmise par la rétine à l'horloge centrale biologique par l'intermédiaire du tractus rétino-hypothalamique, et permet la synchronisation des noyaux suprachiasmatiques avec l'environnement. L'horloge centrale (NSC) coordonne les horloges moléculaires des tissus et organes périphériques.

Les NSC constituent le « chef d'orchestre » qui synchronise les horloges périphériques (Yoo *et al.*, 2004), grâce à des signaux rythmiques chimiques, neuronaux, et hormonaux (Buijs *et al.*, 2001; Kornmann *et al.*, 2007a; Dibner *et al.*, 2010). Ceux-ci jouent aussi le rôle de biomarqueurs circadiens. La température corporelle, le rythme d'activité-repos, et les sécrétions hormonales, principalement les rythmes des glucocorticoïdes et de la mélatonine, constituent les principaux biomarqueurs du système circadien. Ainsi, le pacemaker central entraîne les horloges périphériques directement via le système nerveux autonome (sympathique et parasympathique). La sensibilité des organes aux messages nerveux et/ou hormonaux contrôlés par les NSC est alors différente d'un organe à l'autre. En effet, certains tissus semblent plus sensibles aux messages nerveux et d'autres aux messages hormonaux. Le cœur, le muscle strié squelettique et la rate seraient largement dépendants de connexions nerveuses, alors que le foie et le rein seraient plus dépendants de facteurs humoraux diffusibles (Guo *et al.*, 2005). Un autre niveau d'interactions existe entre les horloges moléculaires périphériques et les différentes fonctions cellulaires (cycle cellulaire, apoptose, métabolisme, détoxification, angiogénèse ...) (Eckel-Mahan *et al.*, 2009; Sahar *et al.*, 2009; Maier *et al.*, 2013).

Les horloges périphériques peuvent aussi être influencées par des facteurs exogènes. Par exemple, l'heure de la prise alimentaire et la qualité de l'alimentation peuvent modifier l'organisation et l'expression temporelle des grandes fonctions et des gènes dans les organes périphériques comme le foie (Stokkan *et al.*, 2001; Challet, 2013) (Figure 7).

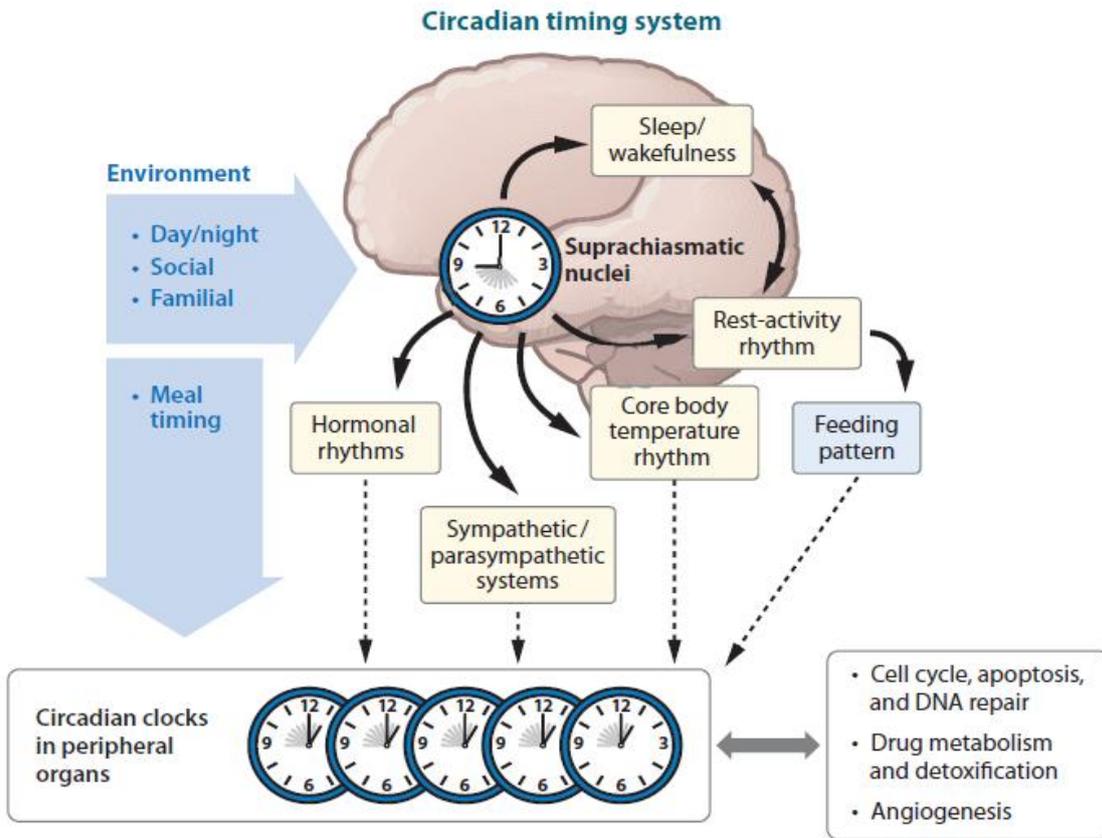


Figure 7 : Représentation schématique des voies de synchronisation des NSC et des différents biomarqueurs impliqués dans la coordination des horloges périphériques. L'horloge centrale (NSC) est synchronisée par des facteurs externes tels que l'alternance lumière/obscurité et les facteurs sociaux et familiaux. Ainsi, les NSC permettent la coordination des rythmes circadiens dans les horloges périphériques par l'intermédiaire des biomarqueurs circadiens. L'interaction entre les horloges moléculaires périphériques et les différentes fonctions cellulaires tels que le cycle cellulaire et le métabolisme constitue un nouveau niveau de la coordination temporelle. Adapté de (Levi *et al.*, 2010).

II.2.6. Principaux bio-marqueurs circadiens physiologiques

À ce jour, quatre marqueurs circadiens sont couramment utilisés comme indicateurs du système circadien : la température corporelle, le rythme d'activité-repos, la sécrétion de mélatonine, et la sécrétion de cortisol.

II.2.6.1. Rythme de la température corporelle

La température corporelle centrale est un paramètre physiologique soumis à un rythme circadien. Chez les rongeurs, le rythme de la température est largement utilisé comme un biomarqueur du rythme circadien (Figure 8) (Filipski *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2007; Filipski *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010).

En effet, la phase et la période de ce rythme semblent refléter fidèlement la synchronisation circadienne par les variations de l'exposition à la lumière et à l'obscurité chez les animaux et chez l'Homme (Krieger *et al.*, 1978; Kronauer *et al.*, 1982; Shanahan *et al.*, 1991; Martinez-Nicolas *et al.*, 2011).

L'amplitude du rythme de la température pourrait refléter la robustesse du rythme circadien. Chez l'Homme, le rythme de la

température centrale est sans doute le marqueur circadien le plus ancien en chronobiologie. La température corporelle centrale est élevée pendant la journée et basse pendant la nuit (Figure 9). Ce rythme peut être influencé par des facteurs environnementaux et comportementaux, tels que les exercices physiques.

L'évolution temporelle de la température corporelle semble aussi renseigner sur les modifications de l'organisation des rythmes circadiens au cours de situations pathologiques telles que le cancer.

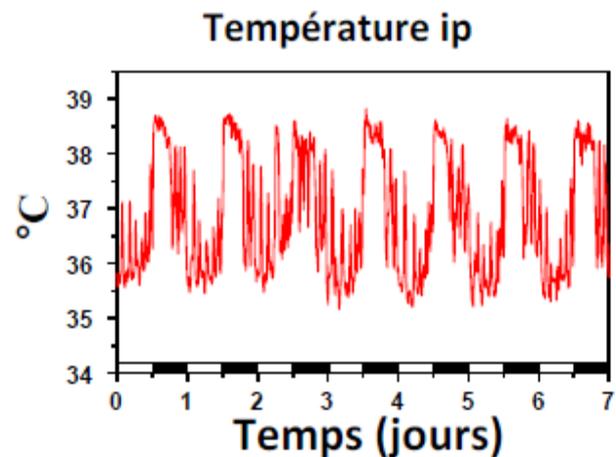
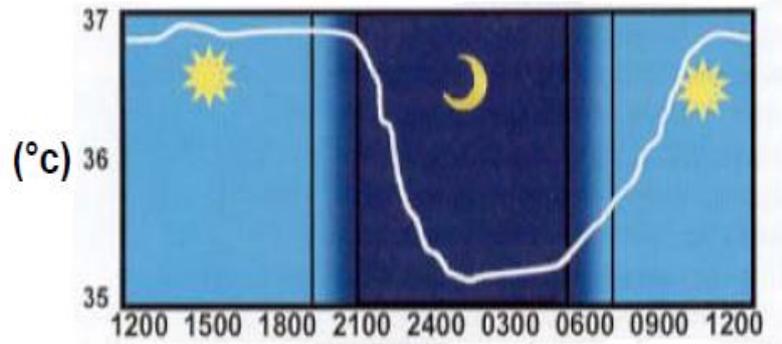


Figure 8 : Rythme circadien de la température centrale enregistré chez la souris.

Figure 9 : Rythme de la température corporelle centrale chez l'homme.



II.2.6.2. Rythme d'activité-repos

Avec la température corporelle, le rythme d'activité-repos est un des deux principaux biomarqueurs circadiens qui reflète le fonctionnement des noyaux suprachiasmatiques (NSC). En effet, la lésion complète des NSC abolit totalement le rythme d'activité-repos. De même, certaines mutations ou mises au silence des gènes de l'horloge peuvent perturber ou abolir ce rythme (Okamura *et al.*, 1999; Zheng *et al.*, 1999; Filipski *et al.*, 2002; Filipski *et al.*, 2009)

L'implantation de capteurs télémétriques chez les rongeurs de laboratoire permet de suivre le rythme d'activité-repos de façon non invasive. Les résultats montrent que ce rythme suit une période d'exactly 24 heures, avec des valeurs d'activité nocturne élevées (Figure 10) (Filipski *et al.*, 2002; Filipski *et al.*, 2004b; Li *et al.*, 2007; Filipski *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010).

Chez l'Homme, le rythme d'activité-repos a été notamment étudié depuis longtemps en psychiatrie chez les patients souffrant

des troubles du sommeil. En effet, l'actimétrie est une méthode relativement simple, qui permet d'enregistrer de façon continue et non invasive le rythme d'activité-repos à l'aide d'un accéléromètre porté au poignet (actimètre). Cette technique est largement utilisée pour évaluer le rythme circadien chez les patients cancéreux, notamment dans notre Unité.

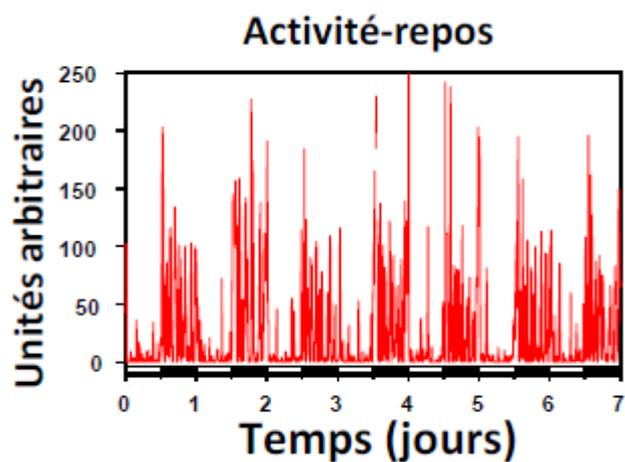


Figure 10 : Enregistrement télémétriques du rythme d'activité-repos chez la souris

II.2.6.3. Rythme de la mélatonine

La mélatonine a été isolée et identifiée pour la première fois en 1958 par le dermatologue américain Aaron Lerner. Cette hormone est ubiquitaire et retrouvée à tous les niveaux des règnes végétal et animal, depuis les plantes les plus primitives jusqu'aux animaux et l'Homme. Sa structure est identique dans tous les organismes (Lerner *et al.*, 1960; Quay, 1964; Hernandez-Ruiz *et al.*, 2004).

Chez tous les vertébrés, la mélatonine est principalement synthétisée dans la glande pinéale ou épiphyse à partir du L-tryptophane (Figure 11) (Rosenthal, 1991; Claustrat *et al.*, 2005; Lewy, 2007). L'ablation de la glande pinéale (pinéalectomie) réduit le taux de mélatonine à des niveaux non détectables, ce qui indique que cette glande est la source principale de production de cette hormone (Rosengarten *et al.*, 1972; Arendt, 1998). En l'absence de stockage intra-épiphysaire, la mélatonine est directement libérée dans le sang après sa synthèse. Le profil plasmatique de mélatonine représente fidèlement la sécrétion hormonale. La synthèse de la mélatonine suit un rythme circadien, avec un pic vers 03h00 à 04h00 du matin (Figure 12) (Rosenthal, 1991; Moore, 1997; Claustrat *et al.*, 2005).

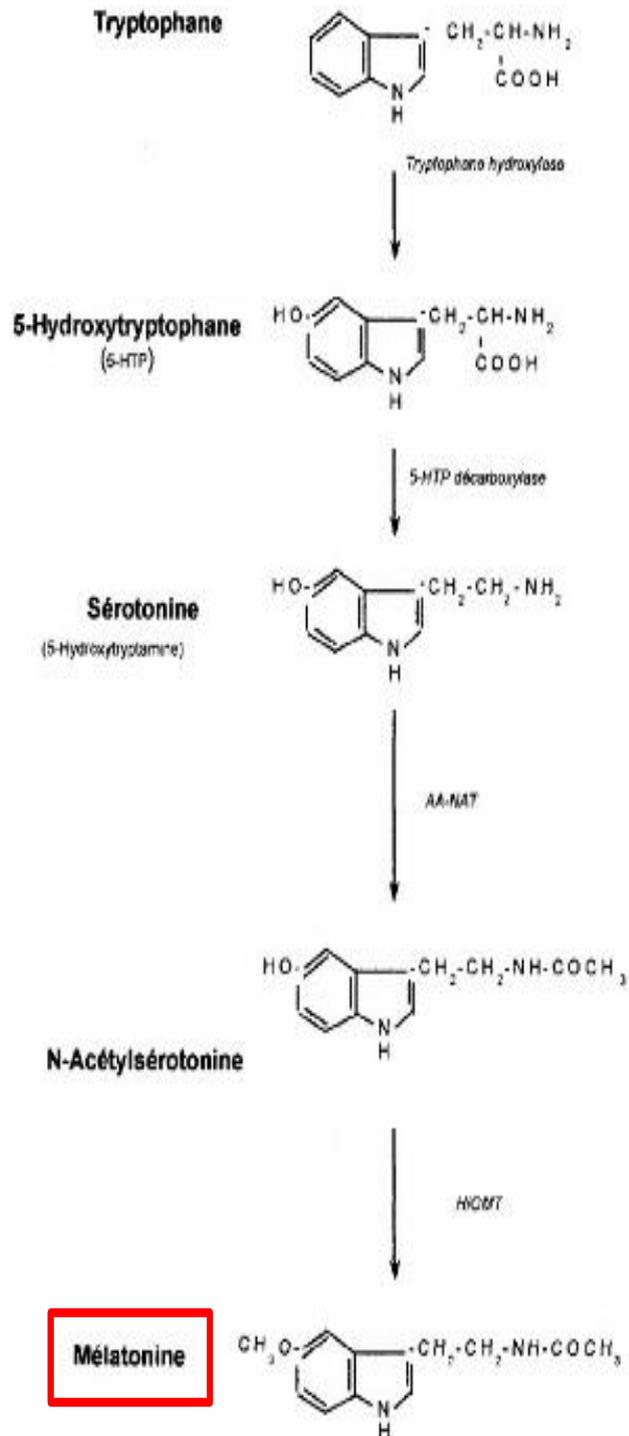


Figure 11 : Voie de la biosynthèse de la mélatonine par la glande pinéale

Le rythme de la mélatonine circulante constitue un marqueur très fiable du rythme circadien. En effet, la synthèse de cette hormone, tout comme sa libération dans la circulation, sont contrôlées par les noyaux suprachiasmatiques (Perreau-Lenz *et al.*, 2004).

Chez l'Homme, le rythme circadien de la mélatonine peut être influencé par plusieurs facteurs tels que l'âge, le sexe, le travail de nuit, le décalage horaire, et certaines situations pathologiques. Plusieurs études ont suggéré un rôle important de la mélatonine dans la thérapie et la prévention du cancer (Cerea *et al.*, 2003; Lissoni *et al.*, 2003; Blask *et al.*, 2005a; Lewy *et al.*, 2006; Jung-Hynes *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2013; Laothong *et al.*, 2013).

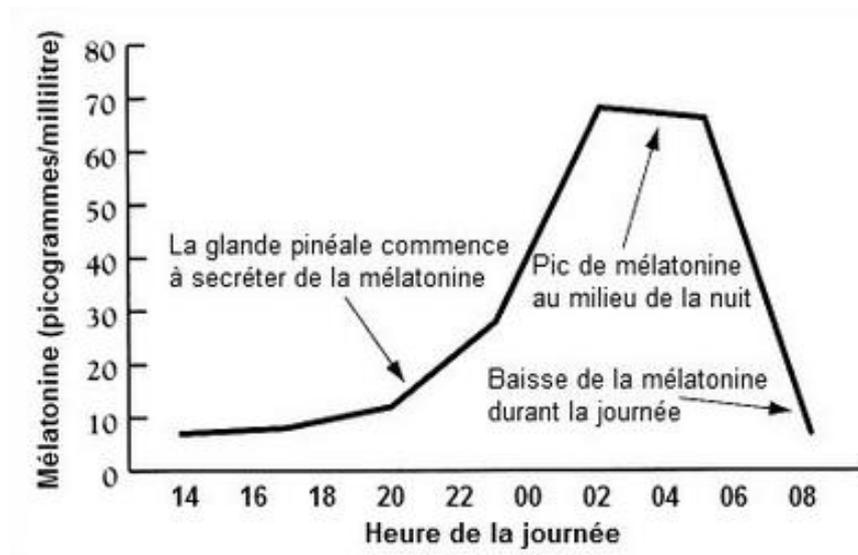


Figure 12 : Rythme circadien de la mélatonine (pg/ml) en fonction de l'heure du jour

Cependant, la synthèse de la mélatonine est très réduite dans certaines lignées de souris, en particulier de fonds C57BL/6, alors que les hybrides B6D2F1 présentent un rythme de mélatonine circulante et pinéale avec un pic diurne, ainsi qu'il a été montré dans notre laboratoire (Ebihara *et al.*, 1986; Li *et al.*, 2000). Les caractéristiques du rythme de la mélatonine dépendent ainsi du fonds génétique chez la Souris, de sorte que celui-ci ne constitue pas un rythme marqueur fiable du système circadien dans plusieurs lignées.

II.2.6.4. Rythme des glucocorticoïdes circulants

Le cortisol chez l'Homme ou la corticostérone chez le Rat et la Souris sont deux hormones indispensables à la vie. Elles sont synthétisées dans le cortex de la glande surrénale à partir du cholestérol (Figure 13).

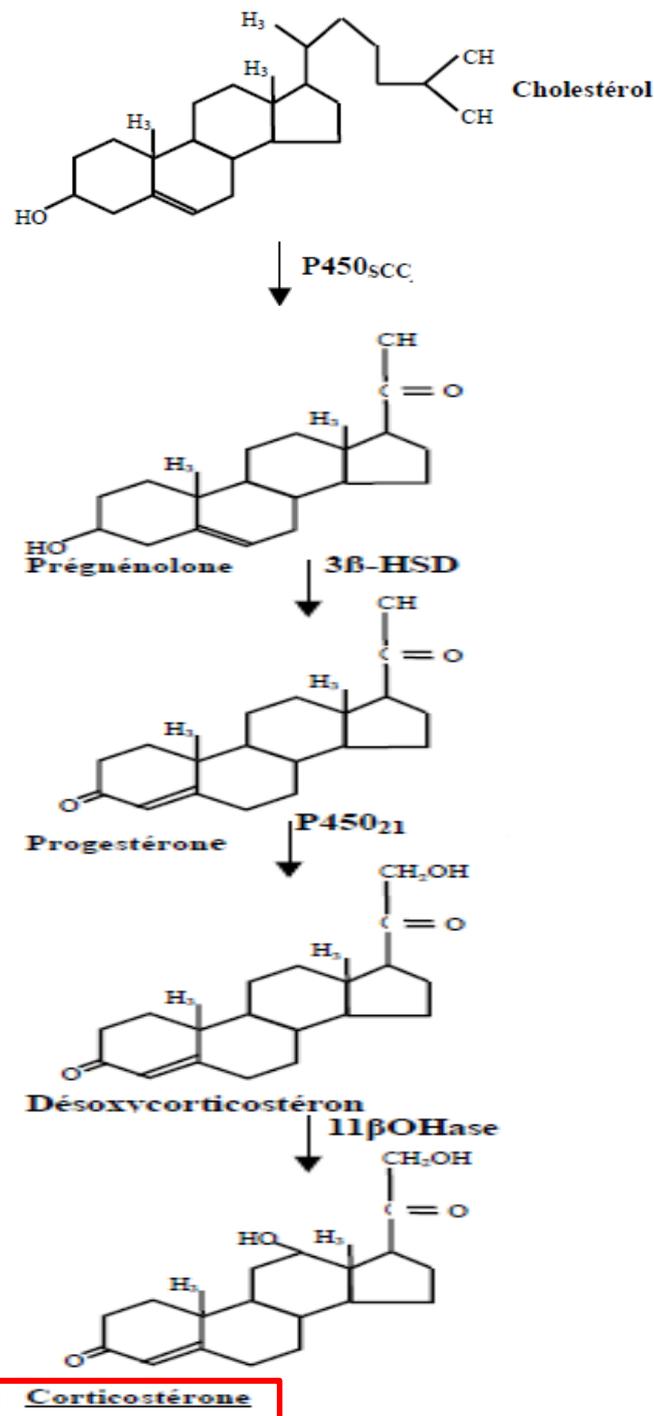


Figure 13 : Voie de la biosynthèse de la corticostérone.

La biosynthèse des glucocorticoïdes se fait en plusieurs étapes avec de nombreux métabolites intermédiaires. En effet, La CRH (Corticotropin-Releasing Hormone) est synthétisée dans les noyaux paraventriculaires (NPV) de l'hypothalamus, et puis elle est libérée dans le système porte hypothalamo-hypophysaire. Ce qui induit dans l'hypophyse antérieure la synthèse de l'hormone adrénocorticotrope ACTH (Adrenocorticotrophin hormone), puis sa sécrétion dans la circulation générale. L'ACTH ainsi libérée, stimule la synthèse et la libération de glucocorticoïdes par le cortex surrénalien. Selon les espèces, la stéroïdogénèse se traduit par la production principale de corticostérone (rat ou souris), de cortisol (Homme ou hamster syrien), ou d'un mélange des deux hormones (hamster sibérien) dans le cortex surrénalien. Outre le contrôle humoral de la sécrétion des glucocorticoïdes *via* l'ACTH, il existe en parallèle un contrôle nerveux de cette sécrétion par le système sympathique (Jasper *et al.*, 1994). La corticostérone a une demi-vie de 80 à 120 minutes, en raison de son inactivation rapide par le foie qui la rend hydrosoluble.

Après la destruction des NSC, les rythmes de la sécrétion d'ACTH et de corticostérone sont abolis. De même, les souris présentant une mutation des gènes de l'horloge circadienne *Per2*, ou une double délétion *Cry1/Cry2*, montrent une sécrétion arythmique de la corticostérone plasmatique (Oster *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2009; Lamia *et al.*, 2011). Ainsi l'horloge circadienne moléculaire contrôle la sécrétion endocrine des glucocorticoïdes (Moore *et al.*, 1972; Buijs *et al.*, 1993). En effet, la synthèse de la CRH est contrôlée par les NSC. La corticostérone sécrétée exerce un rétrocontrôle négatif à la fois sur la sécrétion de CRH et sur celle d'ACTH (Keller-Wood *et al.*, 1984).

Chez les rongeurs d'activité nocturne, le pic de la corticostérone plasmatique est situé à la transition jour-nuit (Figure 14). La sécrétion de corticostérone est fortement activée dans des conditions de stress. Il convient donc d'éviter que l'animal utilisé pour toute étude chronophysiological soit stressé.

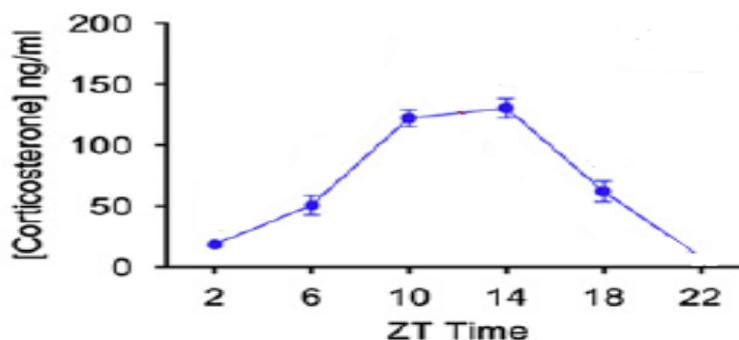


Figure 14 : Rythme circadien de la corticostérone plasmatique chez les souris Balb/c en fonction de ZT du temps.

Chez l'Homme, le pic de cortisolémie se produit vers 8h00 du matin, et est suivie par une diminution progressive jusqu'au soir, une phase de sécrétion autour de minuit et une élévation rapide dans la seconde partie de la nuit. Le rythme du cortisol peut être influencé par les facteurs environnementaux : le stress, l'exposition à la lumière, le travail de nuit, les situations pathologiques, etc (Weibel *et al.*, 1999). Plusieurs études ont montré que ce rythme était altéré chez des patients atteints de cancer (Touitou *et al.*, 1995; Mormont *et al.*, 2000; Sephton *et al.*, 2000).

Les glucocorticoïdes jouent un rôle très important dans plusieurs systèmes physiologiques. Ils ont des effets métaboliques (néoglucogénèse) et immunitaires (anti-inflammatoire). Par ailleurs, l'administration circadienne de glucocorticoïdes de synthèse est très largement utilisée en clinique en rhumatologie et en immuno-allergologie notamment (Buttgereit *et al.*, 2008).

II.2.7. Altérations du système circadien

Un organisme dont les horloges circadiennes fonctionnent en harmonie avec l'environnement, présente une bonne coordination de ses rythmes biologiques. Lorsque le système circadien reste coordonné mais n'est plus en phase avec les cycles de l'environnement qui le synchronisent, on parle d'une désynchronisation circadienne, qui peut se situer à deux niveaux : interne et externe. La désynchronisation est dite externe en cas d'altération des rapports usuels de phase avec les cycles de l'environnement. Dans ce cas, les horloges biologiques peuvent marcher à contre-courant avec les cycles de l'environnement. La désynchronisation interne ne dépend pas de l'alternance lumière/obscurité et des facteurs environnementaux et sociaux. Il s'agit au contraire d'une altération des relations physiologiques entre phases de rythmes circadiens, qui persistent.

Au contraire, la disruption circadienne indique la suppression apparente des rythmes circadiens. Elle peut être provoquée par des modifications internes à l'organisme ou liées à l'environnement.

II.2.7.1. Aspects cliniques

II.2.7.1.1. Altérations d'origine externe

Le **jet lag** ou décalage horaire résulte d'un changement rapide de fuseaux horaires lors d'un voyage intercontinentaux. En ce cas, le système circadien continue initialement à fonctionner

selon l'heure du départ, mais reçoit des signaux lumineux et environnementaux décalés, en rapport avec l'heure d'arrivée. Il en résulte une perte de la résonance entre l'heure physiologique de l'organisme et l'heure locale du pays de destination. En conséquence, peuvent survenir une fatigue, des troubles du sommeil (difficultés à s'endormir la nuit, diminution de la durée de sommeil, réveils précoces ...), des perturbations de la vigilance et une perte de concentration intellectuelle durant la phase d'adaptation au nouveau synchroniseur qui peut durer de quelques jours à quelques semaines (Waterhouse *et al.*, 1997; Waterhouse *et al.*, 2007; Sack, 2010). La vitesse et la durée nécessaires à cette adaptation varient selon l'individu, la direction du vol transmériidien (est ou ouest), et le nombre de fuseaux horaires traversés. Notons que les perturbations circadiennes liées au décalage horaire sont plus sévères pour un vol d'ouest en est.

La mélatonine représente un traitement efficace de certaines formes de désynchronisation. Son administration quotidienne en fin de journée accélère l'ajustement du cycle veille-sommeil au synchroniseur, en renforçant l'amplitude de son propre rythme et/ou du système circadien. Cette accélération est plus marquée dans le sens d'une avance de phase (voyage vers l'est) que d'un retard de phase (voyage vers l'ouest) (Touitou *et al.*, 1996; Arendt *et al.*, 1997; Rajaratnam *et al.*, 2001; Kostoglou-Athanassiou, 2013).

Le travail de nuit ou **travail posté** peut aboutir à une perturbation des rythmes circadiens. Cette perturbation des horloges biologiques est souvent accompagnée de troubles et symptômes tels que fatigue, perturbation de l'humeur, et mauvaise qualité de sommeil. Dans ces conditions, il s'agit d'un véritable problème de santé publique en raison de la dette de sommeil qui peut entraîner des risques d'accidents lors du travail et de la conduite automobile (Oginska *et al.*, 1993; Akerstedt *et al.*, 2010; Driesen *et al.*, 2010; Lombardi *et al.*, 2010).

La chronothérapie des troubles et des symptômes résultants du travail posté fait intervenir l'exposition à la lumière et l'utilisation de la mélatonine. Cependant, les horaires du travail sont organisés de façon très différente. En cas de longues durées de travail de nuit, l'exposition intense et répétée des travailleurs postés à la lumière pourrait accélérer l'adaptation en favorisant le décalage du pic de mélatonine endogène vers le début de la matinée (Arendt *et al.*, 1997; Claustrat *et al.*, 2001; Rajaratnam *et al.*, 2001). En conséquence, la vigilance nocturne serait améliorée et le sommeil diurne de récupération resterait en phase avec la sécrétion de la mélatonine. La prise de mélatonine exogène par les travailleurs postés de nuit pourrait diminuer le temps de l'adaptation au travail (Rajaratnam *et al.*, 2001; Sack, 2010).

Le dysfonctionnement du système circadien de l'Homme a d'abord été observé et caractérisé lors d'**expériences d'isolement** temporel prolongé où des individus volontaires sont restés pendant plusieurs semaines ou mois dans des grottes ou bunkers, sans aucune information sur l'heure qu'il était, c'est-à-dire sans montre, ni exposition aux synchroniseurs jour-nuit ni socioculturel.

Le syndrome d'avance de phase de sommeil ou ASPS (Advanced Sleep Phase Syndrome)

Le syndrome d'avance de phase de sommeil est un syndrome rare et le plus souvent familial, caractérisé par un endormissement et un réveil avancés. Les patients s'endorment spontanément entre 18h00 et 21h00 et se réveillent entre 1h et 5h (Ondze *et al.*, 2001; Sack *et al.*, 2007). Les patients touchés par ce dérèglement montrent :

- une somnolence vespérale majeure
- une incapacité à rester éveillé jusqu'au moment souhaité du coucher
- une incapacité à rester endormi jusqu'à l'heure souhaitée du lever.

La figure 15 montre l'enregistrement du rythme d'activité-repos d'un patient atteint de syndrome d'avance de phase du sommeil. On voit clairement que les heures de coucher et de lever sont avancées par rapport aux heures habituelles.

Chez les patients atteints de ce syndrome, la durée et la qualité du sommeil sont normales, mais les rythmes de la mélatonine, du cortisol et de la température corporelle présentent une avance de phase en comparaison des sujets sains (Figure 16).

Des formes familiales de ce syndrome ont été décrites avec une mutation sérine→glycine sur le gène *Per2*, conduisant à une modification du site de liaison à la caséine kinase CKIε de la protéine HPER2, ce qui inhibe la phosphorylation de PER2 par CKIε (Jones *et al.*, 1999; Toh *et al.*, 2001; Shanware *et al.*, 2011).

Quelques études ont montré que la luminothérapie matinale est capable de retarder l'heure du sommeil chez les individus atteints du syndrome d'avance de phase du sommeil (Campbell *et al.*, 1993; Palmer *et al.*, 2003).

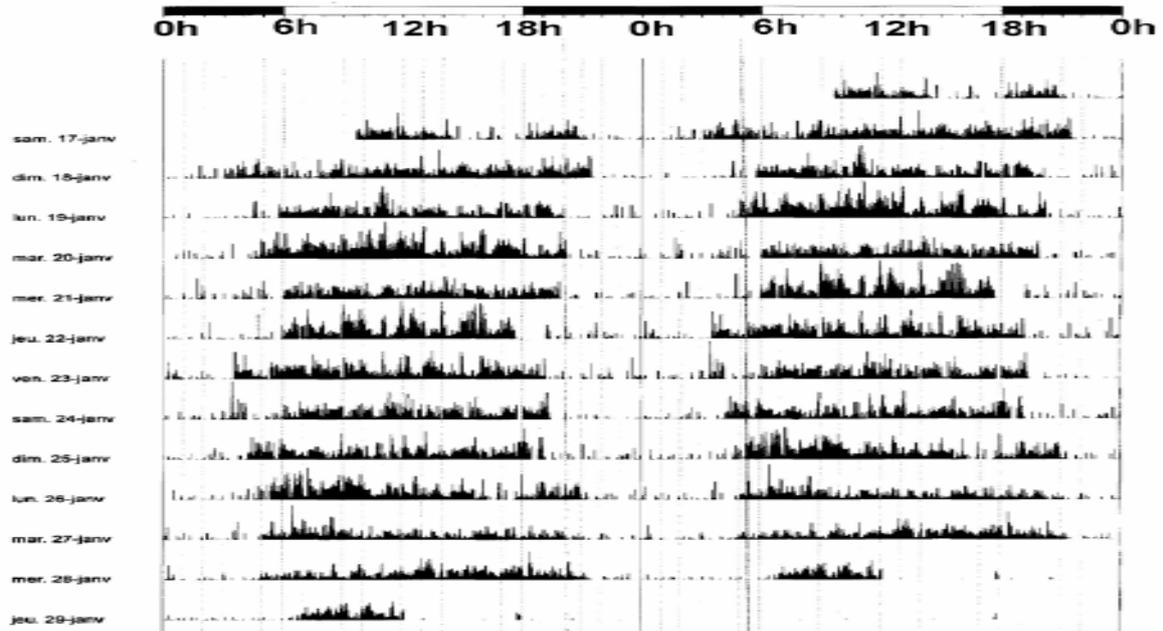
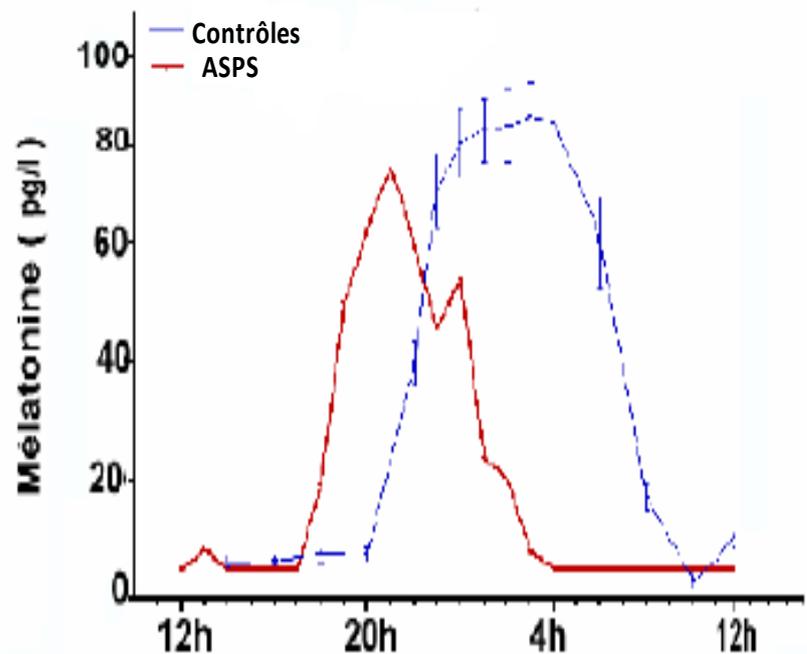


Figure 15 : Double représentation du rythme d'activité-repos d'un patient atteint de syndrome d'avance de phase du sommeil.

Figure 16 : Rythme de la mélatonine circulante chez des sujets contrôles et chez un sujet atteint de syndrome d'avance de phase du sommeil. On observe que le patient montre une avance de phase de la mélatonine par rapport aux sujets normaux.

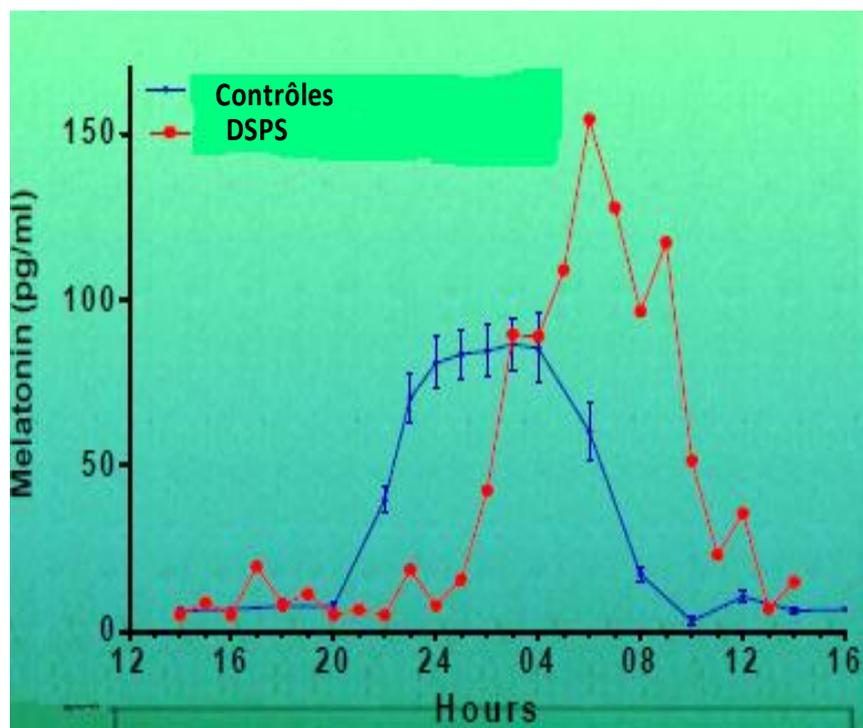


Le syndrome de retard de phase du sommeil ou DSPS (Delayed Sleep Phase Syndrome)

C'est un trouble plus fréquent que le syndrome d'avance de phase. Il toucherait 5 à 10 % des adolescents. Il est caractérisé par un décalage de l'ensemble des rythmes circadiens (veille-sommeil, mélatonine, cortisol, température corporelle,...) de quelques heures par rapport aux horaires habituels. Les patients atteints de ce syndrome s'endorment entre 2h00 et 5h00 du matin et se réveillent dans l'après-midi (Weitzman *et al.*, 1981; Nagtegaal *et al.*, 1998; Sack *et al.*, 2007). Les sujets atteints de ce syndrome montrent un rythme circadien de 24 heures sans anomalie de la durée ni de la qualité du sommeil. En outre, les patients ne consultent que lorsque le retard de phase interfère sérieusement avec leur vie socioprofessionnelle ou scolaire.

La figure 17 montre un exemple de retard de phase du rythme circadien de la mélatonine circulante chez un sujet atteint de DSPS par rapport aux contrôles.

Figure 17 : Rythme circadien de la mélatonine circulante chez des sujets contrôles et un sujet atteint de syndrome de retard de phase du sommeil. Le pic de la mélatonine a lieu vers 02h00 chez les sujets normaux, et au début de la matinée chez le sujet DSPS.



Dans quelques cas, l'origine de ce syndrome a été liée à un polymorphisme du gène de l'horloge circadienne *Per3* (Ebisawa *et al.*, 2001; Archer *et al.*, 2010).

Le traitement de ce syndrome repose essentiellement sur la chronothérapie. La phase du début du sommeil peut être avancée par une exposition matinale à la lumière pour bloquer la sécrétion de la mélatonine. Ce trouble du rythme circadien est aussi amélioré par

l'administration de mélatonine 1 à 2 heures avant l'heure du coucher souhaitée. Le traitement par la mélatonine vespérale permet en effet d'avancer l'heure d'endormissement (Czeisler *et al.*, 1981; Dahlitz *et al.*, 1991; Ito *et al.*, 1993; Sack *et al.*, 2007; Gooley, 2008).

II.2.7.1.2 Altérations d'origine interne

La désynchronisation interne ne dépend pas directement de l'alternance lumière/obscurité et des facteurs environnementaux et sociaux. On peut trouver ce dérèglement de l'horloge circadienne dans le vieillissement qui s'accompagne fréquemment d'une désynchronisation interne liée à la diminution de la plasticité et des capacités d'adaptation de l'organisme du sujet âgé (Touitou, 2001) ou bien dans certaines maladies génétiques et pathologies humaines. Les pathologies humaines comme le cancer et le diabète peuvent engendrer une disruption interne de système circadien. Chez les patients cancéreux, la disruption circadienne interne pourrait être la conséquence de leur maladie tumorale ou de leur traitement, mais elle pourrait aussi pré-exister au cancer. Cette disruption est associée à la survenue de symptômes généraux tels que la fatigue, les troubles de l'humeur, et la perte de l'appétit (Innominato *et al.*, 2009). Le degré de la disruption circadienne peut être quantifié par l'index de dichotomie ou d'autres paramètres statistiques calculés à partir de l'enregistrement ou la mesure de biomarqueurs circadiens tels que les rythmes de l'activité-repos, de la température temporelle, de la sécrétion du cortisol, et de la mélatonine.

II.2.7.2. Aspects expérimentaux

Chez les mammifères, la disruption circadienne a été étudiée à l'aide de plusieurs méthodes :

- Lésions des NSC
- Décalage horaire chronique (Jet lag)
- Mutations génétiques de l'horloge moléculaire

II.2.7.2.1 Destruction stéréotaxique des NSC

Le premier argument en faveur d'un rôle central des noyaux suprachiasmatiques dans le système circadien a été mis en évidence par la suppression du rythme d'activité locomotrice et de la température corporelle, ainsi qu'une altération des rythmes de la mélatonine, de la corticostérone, et des lymphocytes circulants chez des rats et des souris ayant subi une

destruction complète des NSC (Moore *et al.*, 1972; Stephan *et al.*, 1972; Filipski *et al.*, 2002; Filipski *et al.*, 2003; Filipski *et al.*, 2004b) (Figure 18).

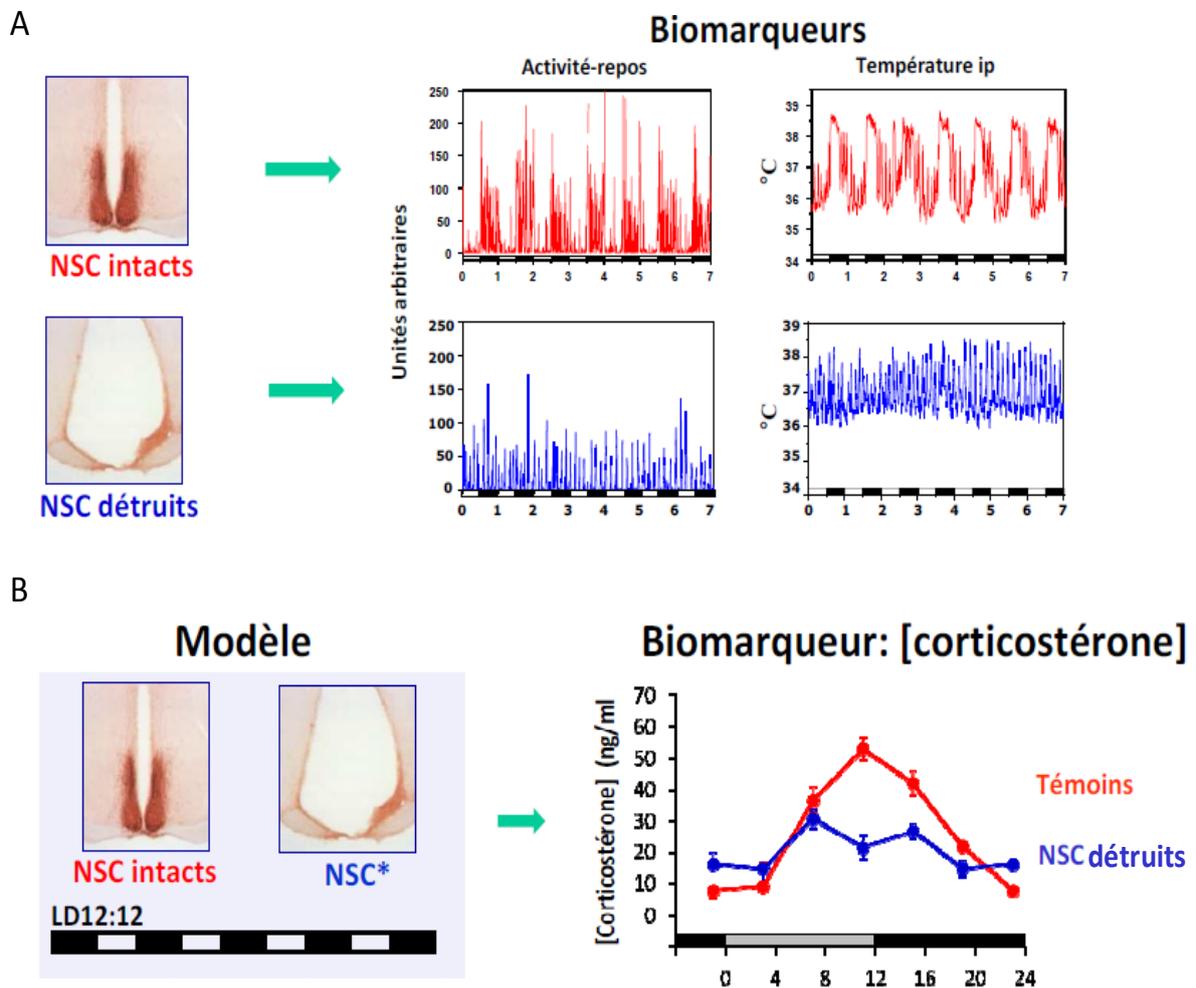


Figure 18 : Effets de la destruction par électrocoagulation sous repérage stéréotaxique des noyaux supra-chiasmatiques sur trois biomarqueurs circadiens physiologiques chez des souris ♂ B6D2F1. **A.** Exemple d'une perte totale des rythmes d'activité-repos et de température après l'ablation des NSC. **B.** Altération du rythme de la cortisolone circulante chez les souris ayant subi une ablation des NSC (courbe bleue) par rapport aux souris témoins (courbe rouge). Le pic de la cortisolonémie est avancé au milieu de la phase de lumière, et la concentration moyenne de la cortisolonémie est réduite, en comparaison des témoins. Adapté de (Filipski *et al.*, 2002).

Une étude récente utilisant des souris *PER2::Luciférase* (protéine de fusion) démontre la persistance des oscillations de *Per2* dans les organes périphériques (foie et reins) chez des souris ayant subi une ablation de NSC. Ces rythmes sont amortis par rapport aux oscillations trouvées chez les souris contrôles (Tahara *et al.*, 2012).

II.2.7.2.2 Décalage horaire chronique expérimental

Chez les rongeurs, on peut imposer un décalage horaire chronique en soumettant les animaux à une avance ou un retard de phase de 4 à 11 heures selon un protocole répété pendant plusieurs jours ou semaines. Les conséquences de l'exposition de l'animal pour le système circadien s'apparentent à celles provoquées par la destruction des noyaux suprachiasmatiques. En effet, le décalage horaire chronique entraîne une disruption physiologique et moléculaire des horloges circadiennes chez la Souris. Les animaux présentent une suppression des rythmes circadiens d'activité-repos et de la température corporelle, et une altération majeure des rythmes des sécrétions de la mélatonine et de corticostérone. Le décalage horaire chronique perturbe aussi profondément l'horloge moléculaire circadienne, dont plusieurs rythmes transcriptionnels sont supprimés dans les noyaux suprachiasmatiques, le foie, les poumons, les reins, ... (Illnerova *et al.*, 1987; Reddy *et al.*, 2002; Filipski *et al.*, 2004a; Filipski *et al.*, 2005; Filipski *et al.*, 2006; Davidson *et al.*, 2009; Wolff *et al.*, 2013).

Notre laboratoire a montré que les rythmes d'activité-repos et de la température corporelle étaient en règle supprimés par un décalage horaire chronique consistant en une avance de 8 h du début de la phase de lumière chaque 2 jours, en comparaison des rythmes de souris synchronisées par l'alternance de 12 heures de lumière et de 12 heures de l'obscurité (LD 12:12) (Figure 19A). Le rythme de la corticostérone plasmatique était bimodal chez ces souris (Figure 19B). La protéine PER1 dans les NSC présentait un amortissement de son rythme pour les souris exposées au décalage horaire chronique (Figure 19C) (Filipski *et al.*, 2004a).

A l'échelle moléculaire, le décalage horaire chronique abolit les rythmes d'expression des principaux gènes de l'horloge hépatique de la Souris. En effet, le rythme circadien de l'expression des ARNm de *Cry1* était supprimé, alors que ceux de *Rev-erba*, et de *Bmal1* devenaient ultradiens, avec une période apparente de 12 heures. Le rythme circadien de l'expression du gène *Per2* persistait, avec toutefois un amortissement considérable de son amplitude (Filipski *et al.*, 2005).

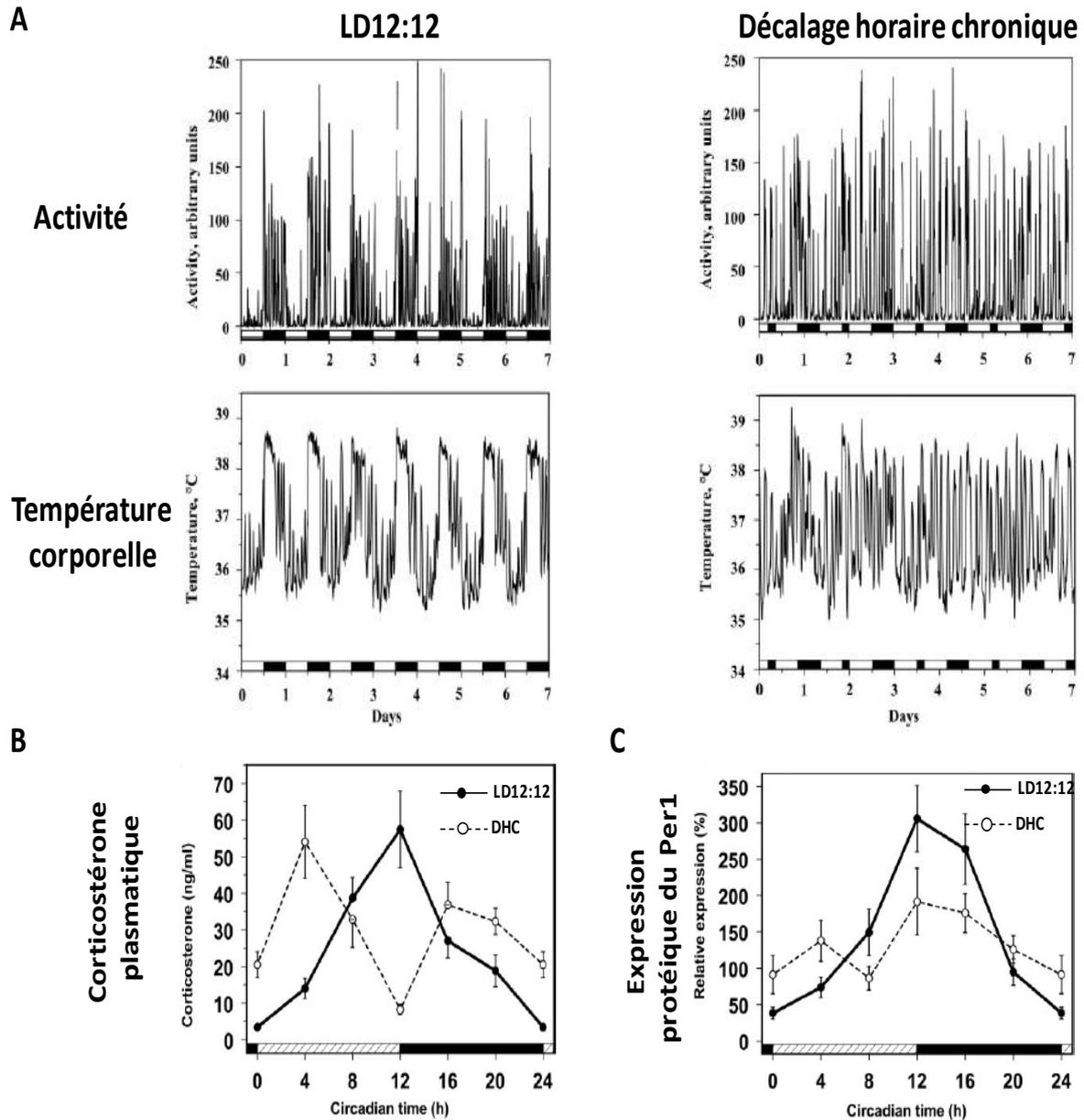


Figure 19 : Disruption circadienne des rythmes physiologiques et moléculaires chez des souris exposées à un décalage horaire chronique (DHC). **A.** Altération des rythmes d'activité-repos et de la température corporelle chez les souris en DHC (droite) par rapport aux souris synchronisées en alternance de 12 heures de la lumière de 12 heures de l'obscurité (gauche). **B.** Rythme circadien perturbé de la corticostérone plasmatique chez les souris en DHC. **C.** Amortissement du rythme circadien de la protéine PER1 dans les noyaux suprachiasmatiques. Adapté de (Filipski *et al.*, 2004a).

II.2.7.2.3. Mutations ou mise au silence des gènes de l'horloge circadienne

Un autre niveau de perturbations du système circadien résulte de la mutation ou de la mise au silence d'un ou plusieurs gènes de l'horloge. Ces mutations naturelles ou générées au laboratoire, entraînent une perturbation des rythmes de l'animal, et même dans certains cas une arythmie complète.

Mutations **Clock** : deux types de mutations du gène *Clock* ont été identifiées chez la Souris. La mutation homozygote *Clock*^{A19} est responsable d'un allongement de la période circadienne à 28 ou 30 h en obscurité continue, puis les animaux deviennent arythmiques (Vitaterna *et al.*, 1994; Antoch *et al.*, 1997; Spoelstra *et al.*, 2002; Asher *et al.*, 2006). Au contraire, les souris *Clock*^{-/-} qui présentent une délétion du gène *Clock* maintiennent leurs rythmes circadiens en DD, souvent avec un raccourcissement de la période en libre cours de 30 minutes, en comparaison des souris sauvages (Asher *et al.*, 2006; Debruyne *et al.*, 2006).

Les souris KO *Bmal1*^{-/-} présentent une altération de leur synchronisation par LD 12:12, et l'absence de tout rythme circadien en obscurité constante. C'est la seule mutation qui inactive totalement l'horloge circadienne (Bunger *et al.*, 2000).

Les souris mutantes *Per1* (*Per1*^{m/m}) présentent une période circadienne plus courte et plus instable (autour de 22.6 heures) par rapport aux souris sauvages (23.7 heures). En DD, ces animaux maintiennent un rythme circadien (Bae *et al.*, 2001; Cermakian *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2001), mais ne peuvent avancer la phase du rythme d'activité locomotrice en réponse à un flash lumineux (Albrecht *et al.*, 2001).

Deux types de mutation *Per2* ont été identifiés chez la Souris. Les mutants *Per2* (*Per2*^{m/m}) présentent une délétion dans la région codante pour le domaine PAS de l'interaction protéine-protéine, ce qui rend la protéine PER2 instable, et rapidement dégradée. Au contraire, les souris *Per2*^{-/-}, dont le gène est délété, n'expriment pas la protéine PER2 (Zheng *et al.*, 1999; Bae *et al.*, 2001). En DD, les souris *Per2*^{m/m} ont une période d'environ 22 heures, plus courte que celle des souris sauvages de même fonds génétique. Les *Per2*^{m/m} deviennent arythmiques en 2 à 18 jours. Contrairement aux souris sauvages, les souris *Per2*^{m/m} pourraient conserver leurs rythmes en lumière constante (LL) (Steinlechner *et al.*, 2002). Lorsque ces souris sont synchronisées en LD 12 12, elles ne sont pas capables de réaliser des retards de phase de l'activité locomotrice en réponse à une exposition à la lumière au début de la phase nocturne (Albrecht *et al.*, 2001).

Les souris mutantes pour le gène *Per3* ne présentent aucune altération majeure physiologique ou moléculaire. Elles sont rythmiques en DD et présentent un raccourcissement de 30 minutes de leur période circadienne par rapport aux souris sauvages. Elles répondent à un flash lumineux en début de nuit par un retard de phase (Shearman *et al.*, 2000).

La mise en silence du gène *Cry1* ou *Cry2* ne semble pas avoir de conséquence comportementale importante chez des souris maintenues en LD 12 : 12. Ces souris restent rythmiques en DD avec un raccourcissement de période d'une heure chez les KO *Cry1* (*Cry1*^{-/-}), et un allongement de période d'une heure chez les KO *Cry2* (*Cry2*^{-/-}). Après une exposition lumineuse de 15 minutes en début de phase nocturne, ces souris présentent un retard de phase plus important que celui observé chez les souris sauvages (van der Horst *et al.*, 1999; Vitaterna *et al.*, 1999). Les mutants *Npas2*^{-/-} montrent une rythmicité normale en LD, comparable à celle des souris sauvages. En obscurité continue, ces souris sont rythmiques pendant au moins 48 heures avec une période légèrement plus courte que celle des souris sauvages (Dudley *et al.*, 2003; DeBruyne *et al.*, 2007a).

Les souris qui présentent une mutation du gène *Rev-erba*^{-/-} restent rythmiques en DD et présentent une période de 30 minutes plus courte que les souris sauvages. Alors que l'inactivation de *Rev-erbb*^{-/-} ne semble pas avoir de conséquence notable du point de vue comportemental (Cho *et al.*, 2012).

Les doubles mutations des gènes de l'horloge sont responsables d'une disruption sévère du système circadien. Ainsi, les souris atteintes d'une double mutation *Per1/Per2* ne montrent aucune rythmicité circadienne en DD (Zheng *et al.*, 1999). De façon étonnante, les doubles mutants *Per1/Per3* et *Per2/Per3* montrent des phénotypes circadiens quasi-identiques à ceux des simples mutants *Per1* et *Per2* respectivement (Bae *et al.*, 2001).

Les souris doubles mutantes, à la fois pour *Cry1* et *Cry2* (*Cry1*^{-/-}*Cry2*^{-/-}), ne montrent pas de rythmicité circadienne en obscurité continue. Cependant en LD12 : 12, leur activité est masquée par la lumière et elles restent apparemment rythmiques (van der Horst *et al.*, 1999; Vitaterna *et al.*, 1999).

La délétion additionnelle du gène *Rev-erba* chez des souris présentant déjà une mutation du gène *Rev-erbb* induit de même une perte totale de la rythmicité en DD (Cho *et al.*, 2012).

L'effet d'une double mutation ***Cry2/Per2*** permet la restauration d'un phénotype circadien semblable à celui des souris sauvages. Les souris doubles mutantes ***Cry2/Per2*** sont rythmiques en DD. Inversement, les souris ***Per2/Cry1*** ne présentent aucun rythme en obscurité continue (Oster *et al.*, 2002). Alors que la période endogène des souris ***Per1/Cry1*** est très semblable à celle des souris sauvages, ces souris montrent une rythmicité circadienne en DD. Les doubles mutants ***Per1/Cry2*** présentent un rythme perturbé en LD 12 : 12. En DD, la perte de la rythmicité circadienne dépend de l'âge de ces souris. Elles ne deviennent arythmiques qu'à partir de l'âge de 6 à 12 mois (Oster *et al.*, 2003).

Toutes les combinaisons possibles de triples mutants des gènes *Per/Cry* sont arythmiques en DD (Oster *et al.*, 2003).

II.3. Foie et Cancérisation hépatique

II.3.1. Histologie et fonctions hépatiques et biliaires

Le foie est un organe abdominal vital, situé sous le diaphragme et masquant l'estomac. Il est entouré par une capsule conjonctive (la capsule de Glisson) et présente un aspect rouge brunâtre. Il est très richement vascularisé. De forme ovoïde, le foie est composé de deux parties appelées lobes : un lobe droit volumineux et un lobe gauche plus petit. Chez l'Homme, c'est la plus volumineuse glande de l'organisme qui assure nombreuses fonctions biologiques. Le foie possède de nombreuses fonctions de stockage, de synthèse, d'épuration, et des fonctions métaboliques indispensables à l'organisme :

- Le stockage des vitamines (A, D, K, E) et des éléments nutritifs jusqu'à leur sollicitation par l'organisme.
- La production de la bile qui aide à la digestion des graisses
- La décomposition de l'insuline et d'autres hormones
- La formation de glucose à partir d'acides aminés et de glycogène
- La synthèse des acides aminés, de cholestérol, et de triglycérides
- La dégradation du cholestérol en acides biliaires
- La synthèse des protéines plasmatiques et des facteurs de coagulation
- La synthèse des nucléosides nécessaires aux synthèses d'acides nucléiques dans tous les tissus de l'organisme
- Les biotransformation et détoxification des xénobiotiques

Le foie possède une disposition vasculaire particulière. Pour assurer ses différentes fonctions, il dispose d'un double apport sanguin : artériel et veineux. Il reçoit par l'artère hépatique un important débit sanguin riche en oxygène. La veine porte apporte le sang veineux riche en nutriments provenant du tube digestif. Ces deux gros vaisseaux, en entrant dans le foie, se divisent en plusieurs branches pour en alimenter les différentes parties. On appelle «segment» chaque partie du foie qui est alimentée par une branche de la veine porte hépatique et une branche de l'artère hépatique. En outre, le sang quitte le foie par trois veines hépatiques principales qui se jettent dans la veine cave inférieure qui retourne au cœur.

Le foie est organisé en un très grand nombre d'unités structurales et fonctionnelles appelées lobules qui comportent différents types cellulaires (Figure 20). L'organisation du foie en lobules résulte du réseau vasculaire irrigant le foie. De forme polygonale, le lobule est centré

sur une veine centrolobulaire et bordé par des « espaces portes interlobulaires » contenant les ramifications de la veine porte, de l'artère hépatique et des canaux biliaires. Chaque lobule est composé essentiellement de cellules appelées hépatocytes, mais il contient d'autres types cellulaires tels que les cellules endothéliales, qui constituent la paroi endothéliale des sinusoides, des capillaires sanguins hautement perméables, les cellules phagocytaires du système immunitaire ou cellules de Kupffer.

Les **hépatocytes** sont des cellules épithéliales disposées en travées séparées par les sinusoides. Leur noyau est volumineux, sphérique, et central, elles sont parfois binucléées. Ils sont très riches en organites intracellulaires tels les réticulum endoplasmiques lisse et granulaire, l'appareil de Golgi, les mitochondries et contiennent d'abondants grains de glycogène. Cette richesse en organites cytoplasmiques révèle une grande activité métabolique. Ce sont des cellules polarisées qui présentent un pôle vasculaire et un pôle biliaire. En effet, leur surface apicale n'est séparée du sang que par les cellules endothéliales des sinusoides. Alors que leur surface basale délimite et contribue à la formation des canalicules biliaires.

Les **cellules endothéliales** constituent la paroi des capillaires sinusoides et forment un tapis discontinu. Elles présentent des caractéristiques morphologiques très spécifiques. Leur cytoplasme est fenêtré par des pores intracytoplasmiques. Elles reposent sur une lame basale discontinue. Ces cellules permettent les échanges de petites molécules entre le sang et les hépatocytes. Les cellules endothéliales et les hépatocytes sont séparés par un espace appelé « espace de Disse ». Cet espace est limité par les microvillosités des hépatocytes et la lame basale des cellules endothéliales. Il renferme des cellules stellaires anciennement appelées « cellules de Ito ».

Les **cellules de Kupffer** sont les macrophages spécifiques du foie. Ces sont des cellules étoilées situés dans la lumière des capillaires sinusoides. Elles possèdent des prolongements cytoplasmiques qui recouvrent le pôle apical des cellules endothéliales. Ces cellules détruisent les hématies âgées, l'hémoglobine, les microbes et des petites particules de matière étrangère au sang. Après activation, ces cellules sécrètent des quantités importantes de cytokines pro-inflammatoires.

Les **cellules de Ito** sont des cellules étoilées qui participent aux stockages des lipides et de vitamines A, ainsi qu'à la synthèse des molécules qui entrent dans la constitution de la matrice extracellulaire. En cas de lésions hépatiques, ces cellules produisent du collagène qui va être responsable de la fibrose, caractéristique des cirrhoses hépatiques.

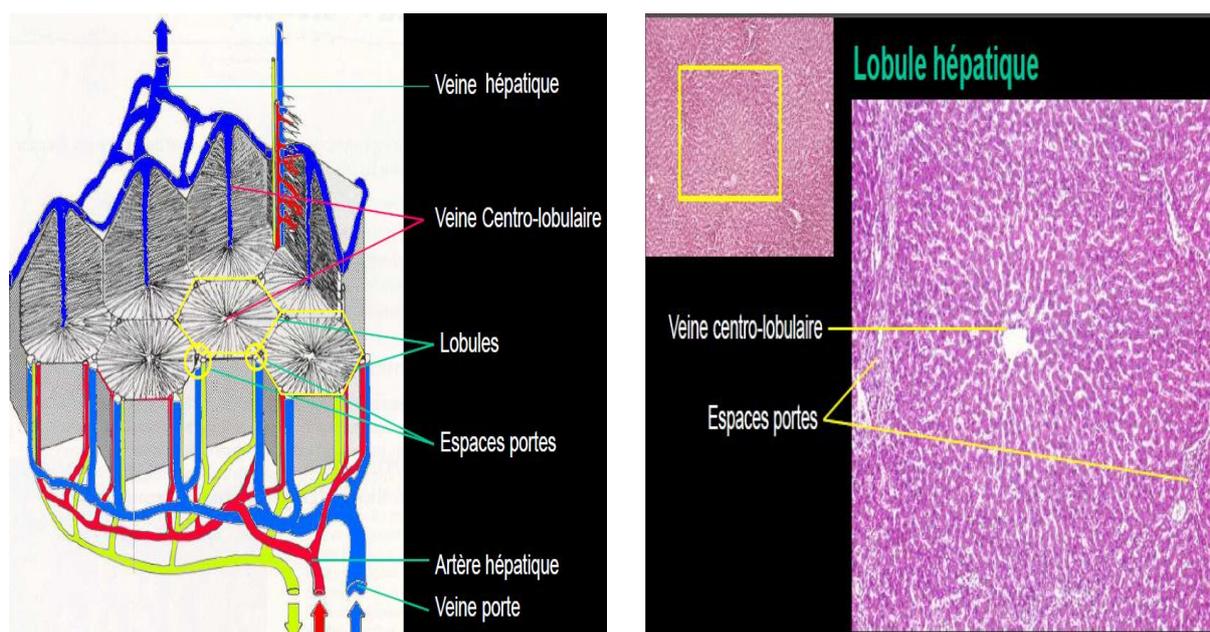


Figure 20: Unité structurale et fonctionnelle du foie humain

La bile

La bile représente la sécrétion exocrine du foie. Elle est synthétisée par les hépatocytes. La bile est formée d'eau, de cholestérol, d'acides biliaires, de phospholipides, de bilirubine... Une fois synthétisée par les hépatocytes, la bile est évacuée par les canalicules biliaires formés par les hépatocytes voisins vers les canaux biliaires interlobulaires tapissés de cholangiocytes, ou cellules épithéliales biliaires, au niveau de l'espace porte. Elle est enrichie par l'eau et les bicarbonates dans les canaux biliaires. La bile sort du foie par le canal hépatique au niveau du hile. Elle est ensuite stockée dans la vésicule biliaire où elle subit un processus de concentration par une réabsorption de 90% son eau. La bile élimine les métabolites endogènes et exogènes toxiques pour l'organisme

Le rôle digestif de la bile est assuré par les acides biliaires qui sont synthétisés à partir du cholestérol. Au cours du cycle entéro-hépatique, le cholestérol et les acides biliaires sont réabsorbés par les entérocytes de l'intestin grêle, puis retournés au foie par la veine porte. Les acides biliaires augmentent l'absorption intestinale du cholestérol, jouent un rôle important dans son métabolisme, et facilitent la digestion des lipides au niveau de l'iléon.

Les enzymes hépatiques

Les transaminases sont les enzymes majeurs du cytosol hépatique. Ils jouent un rôle très important dans le métabolisme des protéines. Ils transfèrent un groupe amine (NH₂) d'un acide aminé à un autre lors des nombreux processus chimiques qui se déroulent dans le foie. Ils participent aussi à la néoglucogenèse. Il existe 2 transaminases :

- **ALAT** (Alanine Amino Transferase)
- **ASAT** (Aspartate Amino Transferase)

L'ALAT se retrouve principalement dans les cellules hépatiques, alors que l'ASAT n'est pas spécifiquement hépatique. On peut en effet retrouver l'ASAT dans les muscles cardiaques et squelettiques. L'ALAT représente un marqueur biologique spécifique du foie. Une augmentation importante de l'ASAT avec un taux normal de l'ALAT n'est pas en faveur d'une atteinte hépatique. Une cytololyse hépatique se traduit par une libération sanguine des transaminases. En fait, une augmentation de taux d'ALAT et d'ASAT dans le sang reflète une pathologie hépatique aigue ou chronique telle qu'une hépatite virale, infectieuse, ou médicamenteuse, un cancer hépatique ou une autre pathologie du foie.

Les phosphatases alcalines (PAL) sont des enzymes présentes dans la plupart de tissus, mais plus spécifiquement dans le foie et les tissus osseux. Au niveau hépatique, elles sont localisées dans les microvillosités des canalicules biliaires. Elles catalysent l'hydrolyse d'une liaison ester monophosphate en libérant un ion phosphate et un groupement hydroxyle libre. L'augmentation des taux sanguins de PAL témoigne d'anomalies hépatobiliaires, telles qu'une cholestase ou ralentissement de l'excrétion biliaire, un cancer de l'épithélium biliaire,... En outre, ces enzymes peuvent être élevées dans quelques situations physiologiques telles que la grossesse. Ces enzymes ne constituent pas un marqueur spécifique des anomalies biliaires, car elles augmentent aussi lors de pathologies osseuses. Lors d'une cholestase ou d'un cancer biliaire, une élévation de taux sanguins de PAL est souvent associée à une augmentation d'une autre enzyme, la « γ Glutamyl transferase ».

La γ Glutamyl transferase (γ GT) est une glycoprotéine présente dans le foie et dans d'autres organes tels que le pancréas, les reins, et la rate. Dans le foie, elle est localisée dans les canaux biliaires, et les hépatocytes. Le taux sérique de γ GT est souvent d'origine hépatique. Une augmentation importante des taux de γ GT et de PAL témoigne d'une cholestase ou d'une anomalie biliaire, alors qu'une élévation de γ GT et des transaminases s'observe dans les hépatites et la cirrhose. Notons que la γ GT est notamment inductible par

l'alcool et par de nombreux médicaments. Elle sert aussi comme marqueur de l'alcoolisme chronique.

La **5' nucléotidase (5'NT)** est une phosphatase alcaline localisée dans la membrane des canalicules biliaires, et d'autres organes tels que le rein et le cerveau. Elle n'est pas inductible comme la γ GT.

II.3.2 Organisation circadienne du foie

Le foie est l'un des organes les mieux rythmés chez les mammifères. En fait, une variation circadienne caractérise presque 15% du transcriptome hépatique (Lowrey *et al.*, 2004; Schmutz *et al.*, 2012). Les gènes transcrits de façon rythmique sont impliqués dans diverses fonctions biologiques telles que le métabolisme des nutriments et des lipides, le métabolisme et la détoxification des xénobiotiques, la réponse immunitaire, et le cycle cellulaire (Akhtar *et al.*, 2002; Panda *et al.*, 2002; Oishi *et al.*, 2003; Vollmers *et al.*, 2009). Notons que les gènes dont la transcription est rythmée sont différents dans le foie et dans les NSC, révélant ainsi une spécificité tissulaire ou fonctionnelle du contrôle circadien de l'expression génétique (Panda *et al.*, 2002). Cependant, les rythmes qui caractérisent le transcriptome hépatique sont régulés par les NSC. En effet, l'ablation chirurgicale des NSC amortit ou abolit l'expression cyclique de plupart des gènes identifiés dans les puces ADN (Akhtar *et al.*, 2002). Les mutations de gènes de l'horloge peuvent exercer des effets semblables à ceux provoqués par l'ablation des NSC. Par exemple, la mutation *Clock* et la double délétion *Cry1/Cry2* altèrent profondément les variations rythmiques d'expression des gènes identifiés rythmés chez les souris sauvages (Oishi *et al.*, 2003; Vollmers *et al.*, 2009). L'amortissement ou la perte des rythmes circadiens des gènes hépatiques secondaires à l'ablation des NSC, au décalage horaire chronique ou à la mutation de gènes de l'horloge pourraient être prévenus par une alimentation programmée ou l'administration de dexaméthasone (Filipski *et al.*, 2005; Vollmers *et al.*, 2009; Schroeder *et al.*, 2013).

Environ 20% du protéome hépatique murin est contrôlé par l'horloge circadienne. Cependant, la moitié des gènes dont l'expression protéique est rythmée ne présente pas de rythme transcriptionnels. Les mutations de gènes *Clock* ou *Per2* perturbent les rythmes protéiques du foie (Reddy *et al.*, 2006). Par exemple, les rythmes circadiens des protéines BMAL1,

Aldolase, et Catalase sont altérés dans le foie des souris porteuses des mutations *Per2* ou *Clock*.

Les rythmes circadiens jouent un rôle important dans le métabolisme hépatique. L'analyse de centaines de métabolites présents dans le foie de souris sauvages ou présentant une mutation du gène *Clock* a révélé que 56% de ces composés dépendaient de l'horloge circadienne. Le taux de métabolites contrôlés par l'horloge est ainsi beaucoup plus élevé que celui attendu d'après les taux de rythmes identifiés dans le transcriptome et le protéome (Reddy *et al.*, 2006; Schmutz *et al.*, 2012). Par exemple, les six métabolites de la lysine sont contrôlés par l'horloge circadienne, alors que seul un des cinq métabolites du tryptophane montre une variation temporelle. Parmi les différents métabolites régulés par l'horloge circadienne hépatique, la majorité de métabolites des acides aminés et des xénobiotiques présentait des valeurs maximales pendant la phase nocturne (ZT15-ZT21), alors les rythmes de métabolites des nucléotides, de carbohydrate, et des lipides montraient un pic à ZT9 (Eckel-Mahan *et al.*, 2012). Le contrôle circadien du cycle cellulaire et de la réparation de l'ADN suggère que le métabolisme des nucléotides est régulé par l'horloge circadienne. Une étude japonaise, réalisée par le groupe d'Okamura, a montré que chez les souris portant d'une mutation conditionnelle de *Bmal1* spécifique du foie, la synthèse des nucléotides triphosphates à partir de leurs formes monophosphates (ATP, GTP, UTP) est perturbée. La phosphorylation des nucléotides monophosphates est assurée par des kinases spécifiques telles qu'*Ak2*, *Ak4* et *Cmpk2* dont leur expression présentait un rythme circadien dans le foie des souris sauvages. La mutation conditionnelle *Bmal1* diminuait l'expression d'*AK2* et d'*AK4*, et augmentait celle de *Cmpk2*. La dérégulation de ces taux d'expression peut provoquer un déséquilibre des taux de bases azotés (purine/pyrimidine). Ces résultats soulignent un rôle important du contrôle circadien sur la réparation de l'ADN et la détoxification des xénobiotiques (Fustin *et al.*, 2012).

II.3.3. Pathologies hépatiques et biliaires

Il existe une large gamme de pathologies hépatiques. Les taux sériques des enzymes hépatiques, l'imagerie, et l'histologie sur une biopsie constituent les 3 outils majeurs du diagnostic d'une pathologie hépatique.

La stéatose consiste en l'accumulation de triglycérides dans le cytoplasme des hépatocytes. C'est une pathologie réversible, mais aussi susceptible d'évoluer vers une fibrose, ou une

cirrhose, et aussi pourrait favoriser l'apparition des cancers hépatiques. La stéatose hépatique alcoolique est liée à une consommation excessive de l'alcool, alors il existe plusieurs facteurs de risque pour la stéatose hépatique non alcoolique tels que l'obésité, le diabète, la malnutrition et d'autres. Il existe deux formes de stéatose, une stéatose simple et une stéato-hépatite qui correspond à une stéatose associée à une inflammation et à des lésions hépatiques. La stéato-hépatite peut se transformer en fibrose, ou en cirrhose. Il existe aussi deux types de stéatose histologiques, la stéatose macrovacuolaire et la stéatose microvacuolaire.

L'hépatite correspond à une inflammation aiguë ou chronique du foie due à une cytolysse des cellules hépatiques. L'hépatite virale est principalement causée par les virus A, B, et C. Il existe aussi plusieurs types d'hépatites non virales, d'origine médicamenteuse, métabolique, toxique, auto-immune, ou alcoolique. Les hépatites peuvent évoluer vers une cirrhose et un carcinome hépatocellulaire.

La fibrose hépatique résulte de l'accumulation de la matrice extracellulaire riche en collagène dans l'espace de Disse. Elle forme ainsi un tissu cicatriciel qui remplace les cellules endommagées. Les cellules de Ito qui stockent la vitamine A, jouent un rôle très important dans la fibrogénèse hépatique. La fibrose hépatique est la complication commune des maladies hépatiques (stéatose, hépatite, ...). La localisation initiale de la fibrose dépend des zones principalement atteintes par l'agent causal, région centrolobulaire dans la maladie alcoolique, et espace porte dans les hépatites virales (Albanis *et al.*, 2001).

La cirrhose est caractérisée par l'existence d'une fibrose qui entoure les hépatocytes qui régénèrent et forment ainsi des « nodules de régénération ». La cirrhose se manifeste par une destruction progressive de l'architecture hépatique, dont l'aspect macroscopique devient nodulaire. On classe les cirrhoses selon la taille des nodules, micronodulaires, macronodulaires et mixte. La cirrhose est une pathologie irréversible. Les complications cliniques de la cirrhose sont nombreuses et en rapport avec l'insuffisance hépatique et la fibrose : fatigue, hypertension portale, encéphalopathie hépatique, ascite,...

La cholestase est l'arrêt ou la diminution de la sécrétion biliaire. Elle conduit à l'accumulation hépatique et plasmatique des substances normalement éliminées par la bile, et à une diminution des sels biliaires dans l'intestin. La cholestase conduit à une augmentation des taux sériques des enzymes hépatiques (PAL, γ GT, 5'NT). Elle peut évoluer vers une phase terminale caractérisée par une cirrhose biliaire, et donc vers un cancer des canaux

bilaires ou cholangiocarcinome. Il existe des formes génétiques de cholestase. Ces formes sont liées à des mutations de gènes des transporteurs biliaires.

Ils existent d'autres pathologies hépatiques comme **l'hémochromatose génétique** (surcharge en fer), **le syndrome de Wilson** (surcharge en cuivre), la cirrhose biliaire autoimmune,...

Les tumeurs du foie peuvent être classées en tumeurs bénignes et malignes.

Parmi les tumeurs bénignes, citons l'hémangiome, tumeur des cellules endothéliales, l'adénome hépatocellulaire, l'hyperplasie nodulaire focale,...

Les deux cancers malins primitifs les plus fréquents sont le carcinome hépatocellulaire et le cholangiocarcinome.

II.3.4. Le carcinome hépatocellulaire

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est le cancer primitif hépatique le plus fréquent. Il est dû à une prolifération maligne des hépatocytes. A l'échelle mondiale, c'est la 6^{ème} cause de cancer et la 3^{ème} cause de mortalité par cancer (Mancuso, 2013). En France, l'incidence annuelle est de 10,4/100.000 chez l'homme et de 2/100.000 chez la femme. Le nombre de nouveaux cas de HCC est passé de 1800 en 1980 à 6400 en 2005. Dans 70 à 90% de cas, le CHC se développe sur une cirrhose, le plus souvent d'origine alcoolique ou virale (B et C). Globalement, l'incidence du CHC est en augmentation, non seulement chez les patients atteints de cirrhose (Bosetti *et al.*, 2008; Jemal *et al.*, 2008), mais ainsi dans les sous-groupes de patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou ceux atteints de thalassémie (Sahasrabudde *et al.*, 2012; Ioannou *et al.*, 2013; Mancuso, 2013). Le CHC reste souvent asymptomatique pendant une longue période. Parmi les symptômes précoces possibles, on peut citer les douleurs abdominales, l'amaigrissement ou la perte d'appétit inexplicables, et la fièvre persistante. Les symptômes tardifs possibles se manifestent par une apathie, des vomissements de sang, un ictère, une hypertension portale, et/ou une ascite. L'augmentation de taux sérique de l'alphafoetoprotéine (AFP) est le marqueur circulant le plus utilisé dans le CHC, malgré sa faible sensibilité et spécificité. Il augmente dans 75% des cas de cancers du foie.

La transplantation (greffe du foie), la résection chirurgicale, la destruction percutanée, la chimio-embolisation et la chimiothérapie, en particulier les multi-inhibiteurs de tyrosine kinase constituent les principaux types de traitement du CHC (Mancuso, 2013).

II.3.4.1. Mécanismes moléculaires de l'hépatocarcinogénèse

L'hépatocarcinogénèse est un processus multi-étapes, où la cirrhose constitue un stade pré-néoplasique. A ce stade, les réactions inflammatoires et la régénération hépatique en réponse à la destruction des hépatocytes aboutissent à des altérations d'un certain nombre des facteurs de croissance comme le TGF- α ou IGF-2.

Le CHC s'accompagne d'une perte de la différenciation cellulaire, de l'adhésion cellulaire, de la matrice extra-cellulaire et d'une activation constitutive du signal de transduction qui permet la prolifération et la survie cellulaire. Les nodules tumoraux de CHC montrent des aberrations chromosomiques associées à des altérations génétiques et épigénétiques dans les cellules hépatocytaires. Ainsi, des études ont montré la réexpression des télomères dans les hépatocytes, ce qui participe à leur immortalisation. Des délétions alléliques ont été identifiées dans le CHC, principalement sur les chromosomes 1p, 4q, 5q, 6q, 7p, 8p, 9p, 10q, 11p, 13q, 16p, 16q et 17p, ainsi que des gains sur les chromosomes 1p, 6p, 7q, 8q et 17q (Thorgeirsson *et al.*, 2002; Hoshida *et al.*, 2010). Cette instabilité génomique contribue à l'inactivation ou l'activation de gènes suppresseurs de tumeurs ou d'oncogènes. Le rôle des altérations épigénétiques (hyper- ou hypométhylation) a été observé dans le CHC (Calvisi *et al.*, 2007). Par exemple, la surexpression de l'oncogène *c-Myc* a été corrélée à une hypométhylation de son promoteur. Par contre, l'hyperméthylation de promoteur du gène *CDKN2A* (suppresseur de tumeur) a conduit à son inactivation (Thorgeirsson *et al.*, 2002). Dans plusieurs cas, les mécanismes moléculaires impliqués dans les étapes d'initiation de la carcinogénèse sont liés à l'étiologie de CHC.

Très récemment, trois voies principales de l'hépatocarcinogénèse ont été décrites (figure 21) (Facciorusso *et al.*, 2012) :

- a) La voie **Wnt β -caténine**
- b) La voie **ERK**
- c) La voie **Akt/mTOR**

La voie **Wnt/ β -caténine** est activée par une mutation activatrice de la β -caténine, résultant en une accélération de la prolifération cellulaire. Les glycoprotéines Wnt se lient aux récepteurs transmembranaires « Frizzled », ce qui aboutit à l'inactivation du complexe protéique cytoplasmiques APC/Axine/GSK-3 β . L'activation de la voie Wnt, en inhibant ces complexes protéiques, inhibe la phosphorylation et la dégradation de la β -caténine, permettant ainsi sa translocation nucléaire. Dans le noyau, la β -caténine agit comme un facteur de transcription

pour plusieurs oncogènes. Des mutations activatrices de la β -caténine ont été mises en évidence dans 20 à 40% des CHC (de La Coste *et al.*, 1998; Facciorusso *et al.*, 2012). Ces mutations ont été identifiées sur le complexe inhibiteur de la β -caténine (GSK-3 β , Axine 1), ce qui entraîne une accumulation de la protéine, sa translocation dans le noyau et l'activation de ces gènes cibles. Parmi les gènes cibles de cette voie, on retrouve des oncogènes (*c-Myc*, *Cyclin D*), des gènes antiapoptotiques (*Survivine*), des gènes impliqués dans l'invasion (*MMPs*), ou l'angiogénèse (*VEGF*) (Roberts *et al.*, 2005). En outre, Les mutations de la β -caténine apparaissent plus fréquentes dans les CHC associées au Virus d'hépatite C que dans celles associées au Virus d'hépatite B (Huang *et al.*, 1999; Hsu *et al.*, 2000).

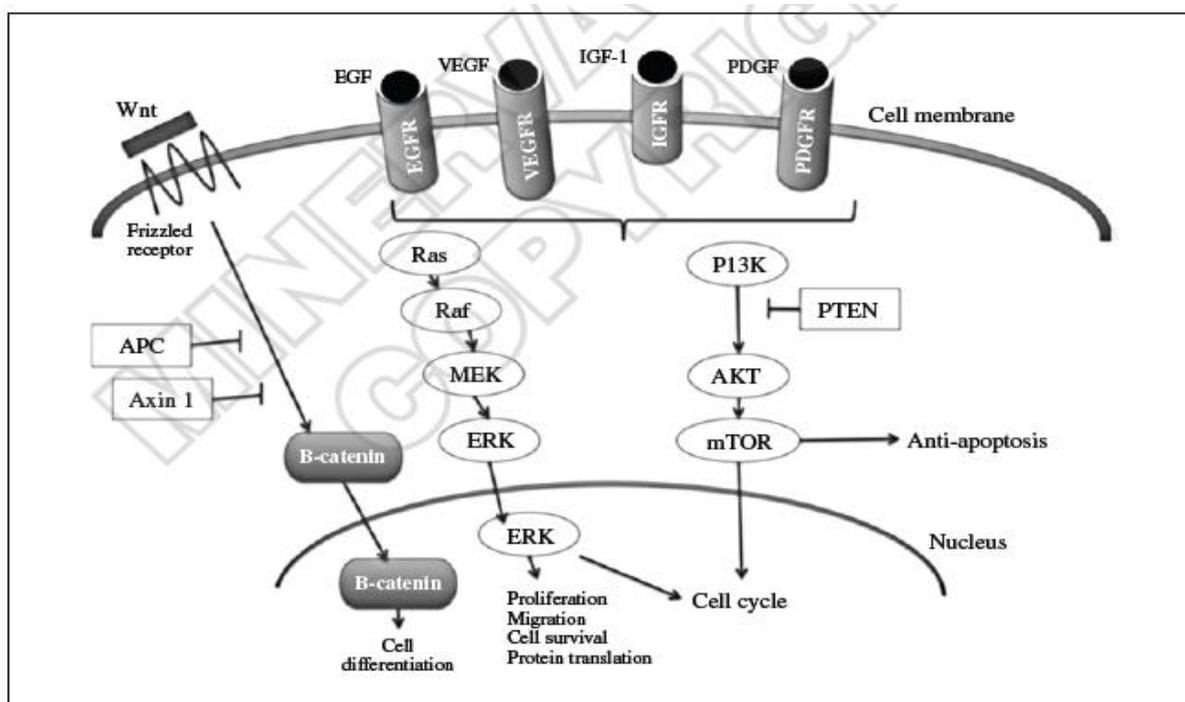


Figure 21 : Trois principales voies de signalisation identifiées dans le carcinome hépatocellulaire. Adapté d'après (Facciorusso *et al.*, 2012).

La voie de signalisation **ERK** joue un rôle très important dans plusieurs processus biologiques tels que la prolifération, la survie, la différenciation et la migration cellulaire. L'activation de cette voie est assurée par l'activation de récepteurs membranaires tels que l'EGFR et l'IGFR, mais aussi la survenue de mutations somatiques, notamment au niveau des gènes codant pour la protéine RAS ou la protéine RAF. La fixation des facteurs de croissance sur leurs récepteurs membranaires active la protéine Ras, qui à son tour active Raf, MEK, et ERK.

Une fois, la protéine ERK transportée dans le noyau, celle-ci active les facteurs de transcription *c-Jun* et *c-Fos* qui régulent l'expression des gènes impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire (Dhillon *et al.*, 2007).

La voie de signalisation **AKT / mTOR** est impliquée dans la régulation de l'apoptose, de la croissance et du cycle cellulaire, ainsi que de l'angiogenèse. Cette voie est dérégulée dans plusieurs types de cancers. Elle est activée dans 50 % des cas de CHC (Llovet *et al.*, 2008). AKT est un proto-oncogène, qui a de nombreuses cibles dont mTOR. En réponse à des stimuli de facteurs de croissance, AKT induit l'activation de mTOR qui permet de réguler plusieurs signaux impliqués dans le cycle cellulaire (*Cyclin D1*), la survie cellulaire (*Mdm2/P53*), et l'angiogenèse (*HIF1/2*). **PTEN** est un régulateur négatif de cette voie. Sa mutation entraîne une activation d'Akt (Roberts *et al.*, 2005). La mutation PTEN ou la diminution de son expression ont été trouvés dans 40% des cas de CHC (Hu *et al.*, 2003).

D'autres voies de signalisation sont ainsi trouvées altérées dans le CHC. La voie de **P53** joue un rôle dans la stabilité génomique soit en induisant l'apoptose, soit l'arrêt du cycle cellulaire. Dans le CHC, la mutation *P53* a été trouvée dans 20 à 35 % de tumeurs analysées. Les mutations *P53* ont été toujours liées à des CHC moins différenciés, de plus grande taille et d'une survie réduite des patients (Qin *et al.*, 2002).

Le gène **Retinoblastome (Rb)** est un autre suppresseur de tumeur impliqué dans le développement de CHC. Une perte d'hétérozygotie a été trouvée dans 25 à 50% des cas de CHC humains. L'inactivation de *Rb* a augmenté la progression tumorale et la métastase chez de nombreux patients (Zhang *et al.*, 1994; Shiraha *et al.*, 2013).

Plus de 90% des cas de CHC sont associés à une inflammation chronique. Récemment, plusieurs études sur la souris ont identifié des voies de signalisation qui ont permis d'établir les liens entre l'inflammation chronique et le CHC (Nikolaou *et al.*, 2013).

La voie **NF-κB** est la voie principale activée dans le CHC associé à une inflammation chronique. En fait, l'activation de cette voie stimule la transcription des centaines de gènes impliqués dans la régulation de l'inflammation, l'apoptose, prolifération, et la survie cellulaire.

D'autres voies de signalisation ont été identifiées dans le CHC associé à une inflammation chronique (STAT, MAPK) (Nikolaou *et al.*, 2013).

II.3.4.2. Modèles animaux de carcinome hépatocellulaire

Plusieurs modèles animaux ont été développés pour étudier les mécanismes moléculaires et la physiopathologie du CHC. Parmi les modèles d'induction chimique d'hépatocarcinome du Rat ou de la Souris, relevons l'exposition à l'aflatoxine B1, au tétrachlorure de carbone, ou à la diéthylnitrosamine (DEN). Plusieurs modèles de souris transgéniques sont utilisés depuis plusieurs années pour l'étude de la cancérogénèse hépatique, et notamment les souris transgéniques *P53*^{-/-} ou *PTEN*^{-/-}, ou celles qui surexpriment des gènes viraux de l'hépatite B et C, des oncogènes (*c-Myc*, *β catenin*,...), ou des facteurs de croissance (*TFG-α*, *TGF-β1*, *EGF*, *FGF19*,...). Un troisième type de modèles animaux fait appel à la formation de xénogreffes tumorales, après injection sous-cutanée (ectopique) ou intrahépatique (orthotopique) de cellules tumorales hépatiques humaines dans des souris immunodéficientes (Heindryckx *et al.*, 2009; De Minicis *et al.*, 2013).

Modèle de cancérogénèse hépatique induite par la diéthylnitrosamine (DEN).

La **DEN** est un cancérogène hépatique largement utilisé pour induire le cancer du foie chez les rongeurs de laboratoire. C'est un liquide légèrement jaune soluble dans l'eau, l'éthanol, et dans les solvants organiques. Son point d'ébullition est de 175-177°C. Elle est sensible à la lumière. La DEN est retrouvée dans les cigarettes, la viande, et les boissons alcooliques. L'agence internationale de recherche sur le cancer a conclu que DEN était cancérogène chez toutes les espèces animales testées, et est probablement cancérogène chez l'homme (Groupe 2A) (Verna *et al.*, 1996).

La première étape du métabolisme de la DEN conduit à la formation de α -hydroxynitrosamine. En effet, DEN est hydroxylée dans le foie essentiellement par les cytochromes 2E1 et 2A5. Ensuite, elle subit d'autres transformations qui aboutissent à la formation d'un ion diazonium. La formation d'adduits à l'ADN résulte de l'interaction de cet ion avec l'ADN (Figure 22). Ces adduits à l'ADN modifient ou altèrent l'expression des gènes et participent à la cancérogénèse. Les principaux adduits à l'ADN formés après exposition à la DEN sont la O6-ethyldéoxyguanosine (O6-EtdG) et la O4-ethyldeoxythymidine (O4-EtdT). En outre, la Méthyle Guanine Méthyle transférase (MGMT) joue un rôle très important dans la réparation de ces adduits (Verna *et al.*, 1996; Lim *et al.*,

1999). La détoxification de la DEN est principalement assurée par la glutathion-S-transférase (GST) (Muzio *et al.*, 1999).

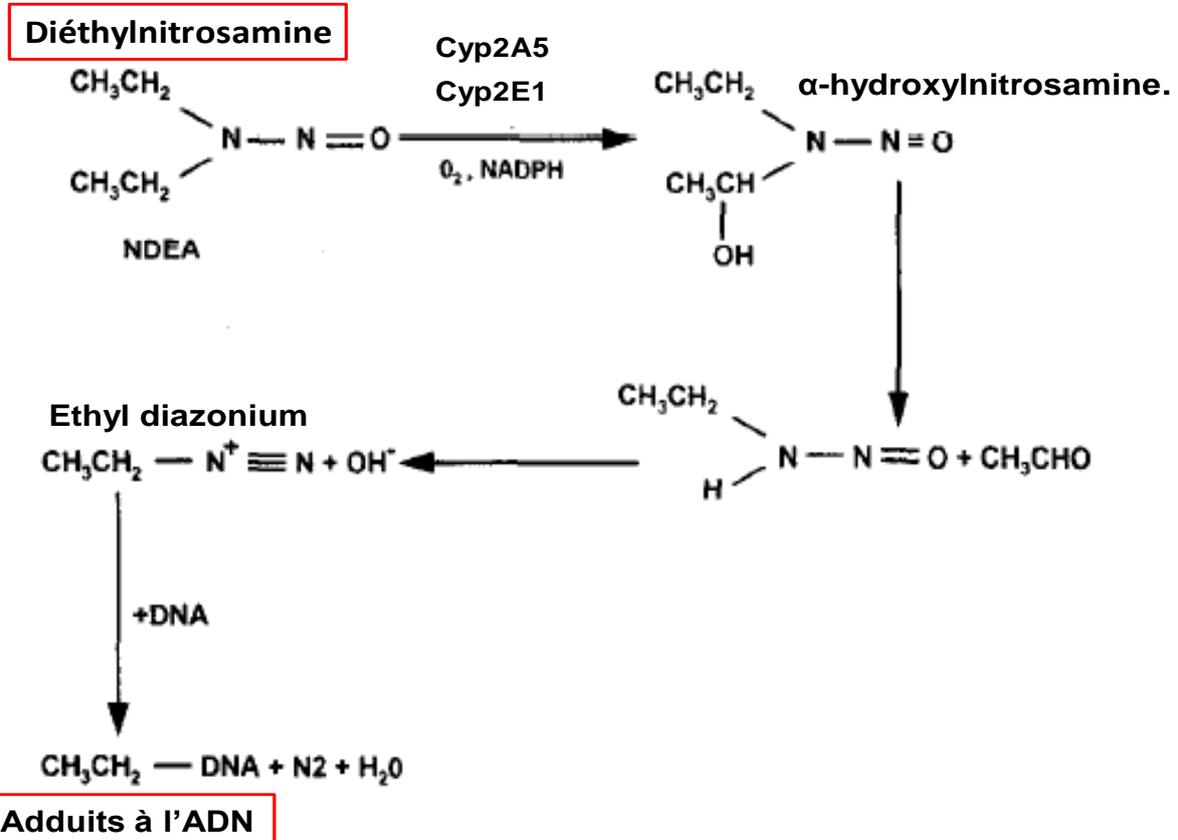


Figure 22: Transformation de la diéthylnitrosamine dans le foie par les cytochromes P450 et formation d'adduits à l'ADN. Adapté d'après (Verna *et al.*, 1996).

Il a été démontré que le développement de CHC chez les souris exposées à la DEN constituait le modèle qui ressemblait le mieux à celui des CHC humain (Lee *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005).

L'activation de DEN dans le foie contribue à l'accumulation des mutations géniques dans les hépatocytes. Cependant, DEN entraîne la mort cellulaire des hépatocytes par apoptose et nécrose. Les cellules apoptotiques et nécrotiques libèrent leurs constituants nucléaires et cytoplasmiques tels que les nucléotides libres, les protéines chaperons, les métabolites de la purine (acide urique, ATP, adenosine), ... (Zeh *et al.*, 2005). Ces constituants déclenchent l'activation de la voie de signalisation intracellulaire NF-κB dans les macrophages du foie (cellules de Kupffer). Le NF-κB est un dimère qui peut être composé de 5 membres différents : p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50 et p52 (appelés protéines rel). Ils sont caractérisés

par la présence d'un domaine hautement conservé, le domaine RHD (Rel Homology Domain) responsable de la dimérisation et de la liaison à l'ADN. Le NF- κ B est maintenu sous une forme inactive dans le cytoplasme des cellules non stimulées par les protéines inhibitrices I κ Bs. Ces protéines empêchent la translocation nucléaire de NF- κ B, et en conséquence sa fixation sur ses domaines de liaison à l'ADN. L'activation de cette voie contribue à la phosphorylation de I κ B, et par suite à leur dégradation par le protéasome. La dégradation de l'inhibiteur permet de démasquer le signal de localisation nucléaire des sous-unités NF- κ B et ainsi le transport des complexes dans le noyau. Une fois transloqués, les dimères NF- κ B peuvent alors se fixer sur les séquences promotrices et activer ou réprimer les gènes cibles dans les macrophages. Parmi les gènes cibles de la voie NF- κ B, on peut citer les gènes de la réponse immunitaire (IL-6, TNF- α , IL-8), de la survie cellulaire, et des facteurs de croissance. Ces constituants déclenchent une inflammation, et induisent la prolifération et la régénération hépatique. En outre, les cytokines pro-inflammatoires activent à leur tour la voie NF- κ B dans les macrophages du foie et les hépatocytes. Les gènes ciblés par l'activation de cette voie dépendent du type cellulaire. Dans les hépatocytes et les cellules tumorales, l'activation de NF- κ B conduit à l'activation des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (*GADD45 β* , *BFL1*, *Cyclin D1*), et des gènes anti-apoptotiques (BCL-X) (Karin *et al.*, 2005; Luedde *et al.*, 2011a) (Figure 23).

Le rôle de l'IL-6 dans la promotion du carcinome hépatocellulaire a été prouvé. En effet, des souris présentant une mutation du gène de l'*IL-6* développent moins de carcinomes hépatocellulaires que les souris sauvages exposées à la DEN (Naugler *et al.*, 2007).

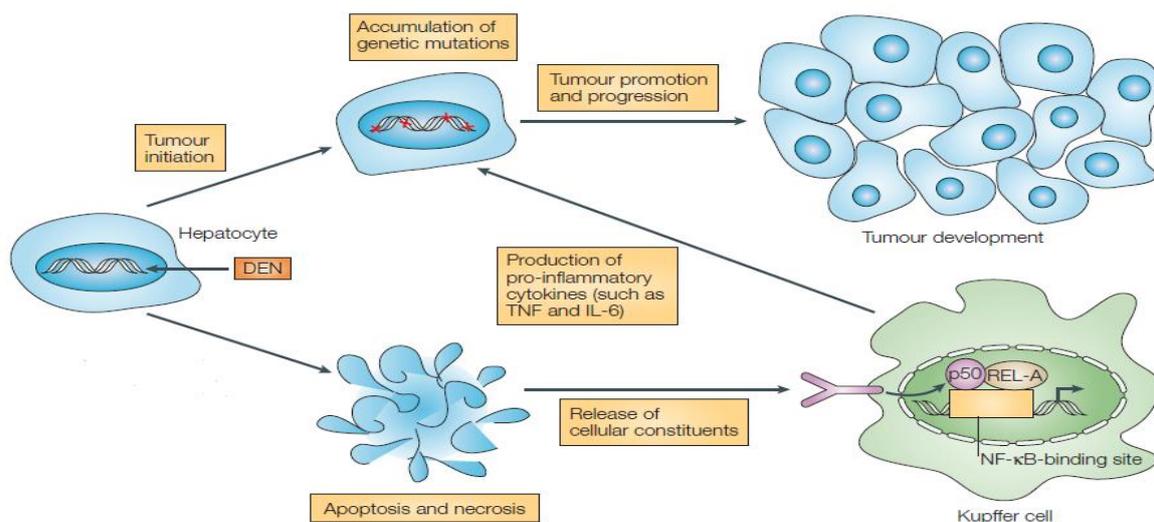


Figure 23: Transformation de DEN dans le foie et induction du CHC. Adapté d'après (Karin *et al.*, 2005).

II.3.5. Le cholangiocarcinome

Le Cholangiocarcinome (CC) est un cancer des cellules biliaires ou cholangiocytes. C'est le 2^{ème} cancer primitif le plus fréquent du foie. Il représente 3% des cancers digestifs. Cette incidence, variable dans le monde est supérieure chez les Asiatiques et a augmenté au cours des 30 dernières années dans les pays occidentaux. Le taux de survie à 5 ans n'a pas augmenté durant cette période (Michaud, 2002; Bouvier *et al.*, 2004; Rizvi *et al.*, 2013). L'incidence de CC est légèrement supérieure chez les hommes par rapport aux femmes (Everhart *et al.*, 2009). Les cholangiocarcinomes surviennent de façon prédominante entre 50 et 70 ans, mais certains ont été décrits avant 30 ans (Tompkins *et al.*, 1981; Zabron *et al.*, 2013).

Selon leur localisation, on distingue les cholangiocarcinomes en 3 grandes classes.

le cholangiocarcinome intra-hépatique est un cancer rare qui se développe à partir des cellules épithéliales des canaux biliaires à l'intérieur du foie ; **le cholangiocarcinome extra-hépatique** est subdivisé en deux sous-classes, le cholangiocarcinome péri-hilaire et le cholangiocarcinome distal ; enfin **le cancer de la vésicule biliaire** (Zabron *et al.*, 2013). Dans les pays occidentaux, plus de 80% des CC sont sporadiques et n'ont aucun facteur de risque défini (Khan *et al.*, 2012). Les facteurs de risque qui ont été identifiés sont généralement associés à une inflammation chronique des voies biliaires. Parmi ces facteurs, on peut citer la cholangite sclérosante primitive, les cholangites parasitaires et virales, la cirrhose hépatique, et les maladies biliaires congénitales telles que les dilatations kystiques congénitales, ou la maladie de Caroli. L'incidence de CC varie selon les pays. Par exemple, les parasitoses des voies biliaires (*clonorchis sinensis* et *opisthorchis veeverini*), expliquant la forte incidence du cholangiocarcinome en Extrême-Orient (Zabron *et al.*, 2013).

L'augmentation de taux sérique de **CA 19-9** reste le marqueur le plus spécifique et sensible de CC. En effet, Le CA 19.9 est spécifique dans 50 à 80% et sensible dans 40 à 70% des cas de CC. D'autres marqueurs tumoraux (ACE, CA 125) moins sensibles sans davantage de spécificité sont aussi utilisés isolés ou associés au CA 19-9 (Ramage *et al.*, 1995; Patel *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 2012). Le diagnostic est le plus souvent tardif à un stade avancé, et repose essentiellement sur l'imagerie (Romagnuolo *et al.*, 2003; Khan *et al.*, 2012). La résection chirurgicale est la seule thérapeutique à visée curative du cholangiocarcinome. (Steel *et al.*, 2011; Itoi *et al.*, 2012; Zabron *et al.*, 2013).

II.3.5.1. Mécanismes moléculaires du Cholangiocarcinogénèse

Dans la majorité des cas, le développement du CC est associé à une inflammation chronique, condition dans laquelle l'accumulation des cytokines, des facteurs de croissance, des acides biliaires et la régénération hépatique favorisent l'apparition d'altérations génétiques. Des pertes chromosomiques ont été identifiées dans le CC, principalement sur les chromosomes 3p, 4q, 6q, 9p, 13q, 14q, 8p, 17p, et 21q, ainsi que des gains sur les chromosomes 1q et 7p (Rizvi *et al.*, 2013; Sia *et al.*, 2013). Les cytokines pro-inflammatoires augmentent l'expression de l'oxyde nitrique synthase inductible (**iNOS**). L'accumulation de l'oxyde nitrique conduit à des altérations structurelles de l'ADN telles que mutations, amplifications, et délétions, et conduit aussi à l'inactivation des enzymes de réparation de l'ADN (Jaiswal *et al.*, 2000; Rizvi *et al.*, 2013).

L'**IL-6** est une cytokine qui joue un rôle très important dans le développement du CC. Au cours d'une inflammation chronique des voies biliaires, le taux d'IL-6 est augmenté dans le sérum et les voies biliaires (Akiyama *et al.*, 1998; Fava *et al.*, 2012). L'activation de P38 MAPK par l'IL-6 diminue l'expression de *P21*, qui est un régulateur négatif du cycle cellulaire, par ailleurs régulé par l'horloge circadienne (Tadlock *et al.*, 2001). Plusieurs études ont montré que l'IL-6 permettait de réguler l'apoptose dans le CC. Cette cytokine induit la transcription du gène anti-apoptotique *Mcl-1* par l'activation de *STAT-3*, un gène souvent surexprimé dans le cholangiocarcinome (Kobayashi *et al.*, 2005; Isomoto *et al.*, 2007). Ainsi, la voie de signalisation **JAK/STAT** est-elle activée dans de nombreux CC, favorisant ainsi l'accumulation de mutations par l'induction d'une résistance accrue à l'apoptose (Isomoto *et al.*, 2007).

Le récepteur **ERBb-2** intervient aussi dans le développement et la progression du CC. En effet, l'activation de ERBb-2 induit la prolifération des cholangiocytes malins, et active à son tour les voies de signalisation P42/44 MAP Kinases et P13K/Akt (Sirica *et al.*, 2002; Sirica, 2008). Ainsi, les récepteurs à l'EGF, dont fait partie ERBb2, présentent une mutation dans environ 15% des CC (Leone *et al.*, 2006).

Plusieurs études ont montré le rôle de **COX-2** dans le développement du CC. Cet enzyme est activé par l'IL-6, ERBb-2 et par les acides biliaires. Il s'accumule au cours du développement de la cirrhose biliaire, et dans les cellules de CC. La surexpression de COX-2 dans des lignées cellulaires de CC semble favoriser la prolifération cellulaire (Zhang *et al.*, 2004; Sirica, 2005).

Plusieurs mutations d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs ont été fréquemment détectées dans les CC. La mutation **P53** a été trouvée dans 44 % de tumeurs analysées, alors celle de **K-ras** a été détectée dans 16% des cas (Ong *et al.*, 2012). Une corrélation entre l'expression aberrante de *p53* et le degré de différenciation cellulaire a été retrouvée (Ito *et al.*, 2001).

II.3.5.2. Modèles animaux de cholangiocarcinome

Les modèles animaux sont indispensables à la compréhension et l'étude des aspects histologiques, moléculaires et physiopathologiques du CC (De Minicis *et al.*, 2013). Les modèles de xénogreffes de CC consistent à injecter des lignées de cellules humaines de CC à des souris immunodéprimées. Ces modèles sont utilisés pour tester l'efficacité de nouvelles approches thérapeutiques du CC.

Il existe plusieurs modèles de CC chimiquement induits chez l'animal, parmi lesquels on peut citer l'administration de diéthylnitrosamine associée à une cholestase provoquée par la ligature des canaux biliaires, ou l'administration de diméthylnitrosamine suivie par une exposition parasitaire à *Opistorchis viverrini*, ainsi que l'exposition au thioacetamidet (Ko *et al.*, 2013).

L'exposition au tétrachlorure de carbone de souris porteuses d'une mutation du gène P53 provoque l'apparition de CC. Les souris double KO *Smad4-Pten* peuvent développer des CC dès l'âge de 4-7 mois (Xu *et al.*, 2006).

Un nouveau modèle fondé sur le rôle de la cholestase dans la physiopathologie du CC a été proposé par Yang et collègues en 2011. Ils ont exposé les souris à la diéthylnitrosamine pendant 2 semaines puis ligaturé les canaux biliaires. Ensuite, ils ont exposé à nouveau les souris à la DEN (Yang *et al.*, 2011; De Minicis *et al.*, 2013). Ce nouveau modèle a permis d'obtenir un cholangiocarcinome seulement chez ces animaux, en comparaison de ceux exposés à la DEN en l'absence de ligature biliaire. L'augmentation d'incidence est expliquée par l'inflammation chronique des voies biliaires secondaire à leur ligature, qui entraîne l'augmentation des concentrations des enzymes hépatiques circulantes et de la bilirubinémie. Au niveau moléculaire, l'expression de *c-Myc* est surexprimée dans les cholangiocytes, les hépatocytes, et les cellules inflammatoires du foie. Une surexpression des gènes de l'hypoxie *Hif-1α* et *Hif-2α* et de la *Cyclin D1* a été observée dans les cellules des voies biliaires, en amont de leurs ligatures, et l'administration de la DEN (Yang *et al.*, 2011).

II.4. Système Circadien et cancer

II.4.1. Aspects cliniques et épidémiologiques

II.4.1.1. Disruption circadienne d'origine environnementale et cancer

Les études épidémiologiques indiquent que les altérations circadiennes résultant d'un décalage horaire chronique lié à un vol transméri dien ou au travail posté de nuit pourraient favoriser le développement de cancers. En effet, l'agence internationale de recherche sur le cancer (IARC) basée à Lyon a conclu en Octobre 2007 que le travail posté qui provoquait une disruption circadienne était probablement cancér ogène chez l'Homme (groupe de risque 2A) (Straif *et al.*, 2007).

A la suite de cette expertise internationale, le Danemark est devenu le premier pays à considérer le cancer du sein comme maladie professionnelle secondaire au travail posté, en l'absence d'autre facteur de risque connu et à condition qu'au moins un poste nocturne soit survenu chaque semaine pendant 20 ans (Wise, 2009).

Le risque de cancer qui résulte d'une disruption circadienne augmente avec la fréquence des vols transméri diens, le nombre d'années de travail posté, la fréquence de changements d'horaires de travail, et le nombre de nuits travaillées (Stevens *et al.*, 2011; Bhatti *et al.*, 2012; Haus *et al.*, 2013)

Le décalage horaire chronique et le travail posté prolongé ont été associés à un risque accru de développer un cancer du sein, mais aussi possiblement du côlon, ou de la prostate. D'autres données épidémiologiques suggèrent un accroissement du risque de cancer de l'ovaire, de l'endomètre, du poumon, du pancréas, de leucémie, et de lymphome non hodgkinien, (Rafnsson *et al.*, 2001; Schernhammer *et al.*, 2001; Schernhammer *et al.*, 2003; Kubo *et al.*, 2006; Viswanathan *et al.*, 2007; Lahti *et al.*, 2008; Kloog *et al.*, 2009; Knutsson *et al.*, 2013).

II.4.1.2 Valeur pronostique du système circadien

La disruption circadienne associée au cancer ou à ses traitements constitue un facteur de mauvais pronostic de survie chez les patients cancéreux, selon plusieurs publications notamment issues de notre laboratoire. En effet, la perturbation des rythmes d'activité-repos, de température, de mélatonine, ou de cortisol ont été significativement associées à une altération de la qualité de vie globale et à une moindre survie (Mormont *et al.*, 2000; Innominato *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012a).

II.4.1.3. Disruption de l'horloge moléculaire et cancer

La pertinence clinique de la perturbation de l'horloge circadienne moléculaire a été confirmée par le fait que les gènes et/ou les protéines de l'horloge sont souvent dérégulés ou réprimés dans les cancers humains, en comparaison avec les tissus de référence (Tableau 3). Les variations épigénétiques telles que la méthylation du promoteur ou la dérégulation transcriptionnelle des gènes jouent un rôle important dans la mise au silence des gènes de l'horloge circadienne dans les cancers humains. Par exemple, dans le cancer du sein, de l'endomètre, et dans la leucémie myéloïde chronique, la moindre expression des gènes de l'horloge est souvent associée à une hyperméthylation des îlots CpG ou, pour les gènes *Per*, à une acétylation du promoteur (*Shih et al., 2006; Yang et al., 2006; Kuo et al., 2009*).

Tableau 3 : Dérégulation des gènes circadiens dans les cancers humains. Adapté d'après (Fu et al., 2013).

Type de cancer	Gènes dérégulés ou réprimés	Fonctions affectées	Références
Cancer du sein	<i>Bmal1, Clock, Cry1, Cry2, Per1, Per2, Per3, Npas2</i>	Apoptose, cycle cellulaire, réparation de l'ADN, remodelage de chromatine	(<i>Chen et al., 2005; Gery et al., 2007b; Winter et al., 2007; Hoffman et al., 2008; Xiang et al., 2008; Kuo et al., 2009; Hoffman et al., 2010; Dai et al., 2011</i>)
Leucémies	<i>Bmal1, Clock, Per1, Per2, Per, Cry1, Cry2</i>	Cycle cellulaire, remodelage de chromatine, réparation de l'ADN	(<i>Yang et al., 2006; Eisele et al., 2009; Lewintre et al., 2009; Taniguchi et al., 2009; Sun et al., 2010</i>)
Cancer du colon	<i>Clock, Per1, Per2, Per3</i>	remodelage de chromatine, réparation de l'ADN	(<i>Brandi et al., 2004; Hoffman et al., 2008; Mostafaie et al., 2009; Zhou et al., 2012</i>)
Cancer de l'endomètre	<i>Cry1, Per1, Per2, Per3</i>	remodelage de chromatine	(<i>Shih et al., 2006</i>)
Carcinome hépatocellulaire	<i>Cry2, Per1, Per2, Per3, Tim</i>	Cycle cellulaire, remodelage de chromatine	(<i>Lin et al., 2008</i>)
Cancer du cerveau	<i>Cry1, Cry2, Per1, Per2, Per3</i>	Apoptose, cycle cellulaire	(<i>Fujioka et al., 2006; Xia et al., 2010; Luo et al., 2012</i>)
Cancer du poumon	<i>Clock, Per1, Per2, Per3</i>	Cycle cellulaire, remodelage de chromatine, réparation de l'ADN	(<i>Gery et al., 2007a</i>)
Lymphome non hodgkinien	<i>Npas2</i>	Cycle cellulaire, réparation de l'ADN, réponse immunitaire	(<i>Zhu et al., 2007; Hoffman et al., 2008</i>)
Lymphome diffus à grandes cellules	<i>Bmal1, Clock</i>	remodelage de chromatine	(<i>Taniguchi et al., 2009</i>)
Ostéosarcome	<i>CK1e, Per2</i>	Apoptose, Cycle cellulaire	(<i>Yang et al., 2008</i>)
Cancer de l'ovaire	<i>Bmal1, CK1e, Clock, Cry1, Cry2, Per1, Per2, Per3</i>	Apoptose, Cycle cellulaire	(<i>Tokunaga et al., 2008</i>)
Cancer du pancréas	<i>Bmal1, CK1e, Clock, Cry1, Cry2, DECI, Per1, Per2, Per3, Tim, and Tipin</i>	Apoptose, Cycle cellulaire, remodelage de chromatine	(<i>Pogue-Geile et al., 2006; Suzuki et al., 2008; Oda et al., 2009; Relles et al., 2013</i>)
Cancer de la prostate	<i>Bmal1, CK1e, Clock, Cry1, Cry2, Npas2, Per1, Per2, Per3</i>	Apoptose, Cycle cellulaire, réparation de l'ADN	(<i>Cao et al., 2009; Zhu et al., 2009; Jung-Hynes et al., 2010; Jung-Hynes et al., 2011</i>)

II.4.2. Aspects expérimentaux

Plusieurs études expérimentales ont montré l'effet d'une disruption circadienne environnementale, génétique, ou pharmacologique dans la cancérogenèse induite et la progression tumorale. Les résultats obtenus ont montré que le système circadien ou certains de ses composants pourrait jouer un rôle très important dans la prévention et la suppression des tumeurs.

II.4.2.1. Destruction des NSC et croissance tumorale

Les souris males B6D2F1, dont les NSC ont été détruits présentent une abolition des rythmes d'activité/repos et de la température corporelle, ainsi qu'une altération profonde des rythmes de la corticostérone et des lymphocytes circulants. La question s'est posée du rôle d'une telle disruption circadienne dans la progression cancéreuse. Ces animaux ont été transplantés avec deux modèles de tumeurs : l'ostéosarcome de Glasgow (GOS) et l'adénocarcinome pancréatique (P03). La croissance de ces deux tumeurs expérimentales s'est révélée deux à trois fois plus rapide chez les souris dont les NSC étaient détruits.

Ces résultats ont montré pour la première fois que la perturbation de la coordination circadienne par la destruction du pacemaker central accélérât la croissance tumorale (Figure 24). Les noyaux suprachiasmatiques exercent ainsi une fonction « anti-tumorale » (Filipski *et al.*, 2002). Notons que les souris avec une destruction partielle des NSC ont montré une croissance tumorale similaire à celle chez les souris témoins.

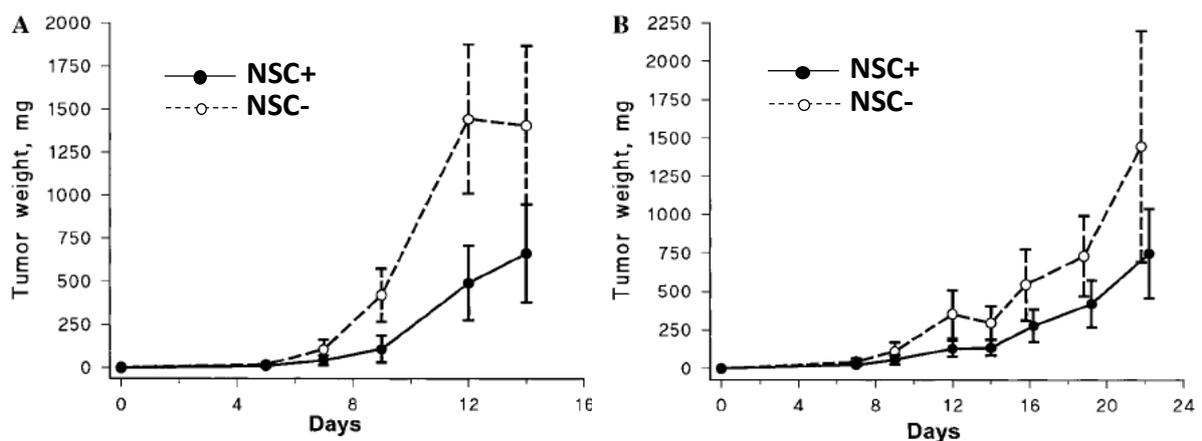


Figure 24 : Croissance tumorale chez des souris témoins (NSC+) ou après destruction des noyaux suprachiasmatiques (NSC-). Ces souris sont porteuses de l'ostéosarcome de Glasgow (A) ou de l'adénocarcinome pancréatique (B). Adapté de (Filipski *et al.*, 2002).

II.4.2.2. Modifications de l'environnement photopériodique et cancer

Plusieurs études, notamment conduites dans notre laboratoire, montrent que certaines altérations du cycle lumière/obscurité, principal synchroniseur du système circadien, favorisent le développement de tumeurs spontanées ou induites et accélèrent la croissance tumorale.

II.4.2.2.1 Décalage horaire chronique

Le décalage horaire chronique (DHC) ou « Jet lag chronique » peut supprimer les principaux rythmes physiologiques, comportementaux, et moléculaires, tout comme la destruction des NSC. Le DHC peut aussi accélérer de même la progression tumorale, et favoriser la cancérogenèse chimio-induite.

Parmi les schémas de DHC, celui qui provoque la disruption circadienne la plus marquée, implique l'avance de phase du début de la lumière de 8 heures chaque 2 jours. La greffe sous cutanée d'un ostéosarcome de Glasgow pousse près de deux fois plus rapidement chez les souris exposées pendant 10 jours à un tel DHC que chez les souris qui restent exposées à la même synchronisation par LD12 :12. (Filipski *et al.*, 2004a; Filipski *et al.*, 2005).

A l'échelle moléculaire, le foie et les tumeurs des souris en DHC présentent une disruption circadienne moléculaire sévère et une dérégulation importante du cycle cellulaire et de l'apoptose. En effet, les gènes circadiens *Bmal1*, *Rev-erba*, et *Per2* présentent un amortissement de leurs rythmes et une diminution de leurs taux moyens d'expressions dans le foie et les tumeurs implantées. La disruption de l'horloge circadienne moléculaire provoque une dé-répression de l'expression circadienne de proto-oncogène *c-Myc* et une répression de *P53* dans le foie et les tumeurs des souris exposées à une DHC.

L'alimentation programmée sur 24 heures, en débutant pendant la phase d'obscurité peut inverser la progression tumorale accélérée sous DHC, en restaurant les rythmes circadiens transcriptionnels, notamment des gènes *Rev-erba* et *Per2* dans le foie et les tumeurs greffées. L'alimentation programmée renforce le rythme circadien et réprime l'expression de *c-Myc* dans les tumeurs, mais non dans le foie (Filipski *et al.*, 2005).

L'alimentation programmée pourrait aussi intervenir dans la prévention de la progression tumorale. En effet, une étude réalisée chez des souris males B6D2F1 a montré que la croissance tumorale de l'adénocarcinome pancréatique P03 a été ralentie de moitié chez les souris exposées à une alimentation programmée de ZT2 à ZT6, en comparaison de celles nourries ad libitum, indépendamment de la valeur énergétique des aliments (Li *et al.*, 2010).

L'étude du transcriptome tumoral a révélée que la transcription de plus de 400 gènes tumoraux du cycle cellulaire, du métabolisme énergétique et de la réponse immunitaire étaient entrainée par l'alimentation programmée (Li *et al.*, 2010). D'autres études ont confirmé que le DHC accélérât la progression de tumeurs pulmonaires greffées chez des souris ou des rats (Logan *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012b).

Outre un effet sur la progression tumorale, le DHC accélère la cancérogenèse hépatique. Les souris mâles B6D2F1 synchronisées par LD 12 : 12, reçoivent une dose cumulée de 243 mg/kg de DEN sur une durée de 46 jours. Ces animaux développent des cancers hépatiques, éventuellement associés à des tumeurs dans autres organes (poumons, reins). L'exposition d'un lot d'animaux à un DHC, après l'exposition à la DEN permet de démontrer le rôle promoteur du DHC dans ce modèle. Deux nodules tumoraux ou plus ont été trouvés dans 77% des souris exposées au DEN+ DHC comparées à 33% des souris exposées à DEN seule. La concentration sanguine de l'aspartate amino-transférase (ASAT), un enzyme qui reflète la toxicité hépatique, était significativement supérieure chez les souris exposées au DEN+DHC par rapport à celles exposées à DEN seule. Notons que les souris exposées au DHC+ DEN présentaient une altération sévère des rythmes circadiens de l'activité-repos et de la température corporelle, en comparaison de celles exposées à la DEN puis maintenues en LD12 :12 (Filipski *et al.*, 2009).

II.4.2.2.2 Exposition nocturne ou continue à la lumière

Plusieurs études ont montré que l'exposition nocturne à la lumière pouvait aussi accélérer la cancérogenèse spontanée ou induite et favoriser la croissance de tumeurs implantées chez les rats et les souris (Dauchy *et al.*, 1999; van den Heiligenberg *et al.*, 1999; Blask *et al.*, 2005b; Cos *et al.*, 2006; Vinogradova *et al.*, 2009; Vinogradova *et al.*, 2010; Yasuniwa *et al.*, 2010; Dauchy *et al.*, 2011). L'administration de mélatonine pourrait contrebalancer cet effet (Baturin *et al.*, 2001; Vinogradova *et al.*, 2008; Kannen *et al.*, 2011).

Chez le Rat, l'exposition prolongée à la lumière constante (LL) pendant plus de 6 semaines supprime les rythmes circadiens de la température corporelle, de l'activité-repos, et perturbe les rythmes de la mélatonine et des lymphocytes circulants. L'exposition en LL de rats préalablement exposés à une dose de 10 mg/kg/jour de DEN pendant 6 semaines, permet de tester le rôle promoteur de la disruption circadienne provoquée par LL. La cancérogenèse hépatique a été accélérée chez ces animaux en comparaison de ceux restant synchronisés par

LD12 : 12. L'administration de DEN suivie de phénobarbital, un promoteur établi de la cancérogenèse hépatique, provoque un taux d'hépatocarcinomes similaire à celui trouvé chez les rats en LL. Les nodules tumoraux macroscopiques ont été identifiés chez 72% des rats exposés à DEN seule, chez 89% des rats exposés à DEN+ Phénobarbital, et chez 95% des rats exposés à DEN+ LL. Ainsi, la disruption circadienne provoquée par l'exposition constante à la lumière joue le rôle de promoteur de l'hépatocarcinogénèse (van den Heiligenberg *et al.*, 1999).

Une autre étude a montré que la tumeur issue d'une lignée cellulaire d'hépatome (7288CTC) implantée chez des rats exposés en LL proliférait plus rapidement que celle implantée chez des rats en LD12 : 12 (Dauchy *et al.*, 2011).

II.4.2.3. Gènes circadiens et cancer

Plusieurs études expérimentales ont montré que les gènes circadiens semblaient jouer un rôle au cours des processus cancéreux. Il apparaît maintenant que plusieurs mutations des gènes de l'horloge pourraient favoriser le développement de cancers ou accélérer leur progression.

Le système circadien des souris dont le gène *Per2* présente une mutation ou une délétion (*Per2^{m/m}* et *Per2^{-/-}*) est profondément altéré (Zheng *et al.*, 1999). En outre, ces souris présentaient à partir de six mois une hyperplasie spontanée des glandes salivaires et développent des cancers spontanés avec une fréquence anormale (Fu *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2010). Ainsi, 30 % des souris *Per2^{m/m}* mourraient avant 16 mois, la moitié avec un lymphome, alors que les souris sauvages ne développaient pas de lymphome avant 20 mois. Les souris *Per2^{m/m}* présentaient aussi une hypersensibilité aux rayons γ , qui provoquaient un blanchiment et une perte des poils prématurés, ainsi qu'une augmentation très significative de l'incidence de cancers par rapport aux souris sauvages irradiées. En fait, la même dose d'irradiation γ (à ZT10) provoquait un lymphome chez 71% des souris *Per2^{m/m}* et seulement 5% des souris sauvages (Fu *et al.*, 2002). A l'échelle moléculaire, la mutation *Per2* favorisait la cancérogenèse radio-induite en réduisant le taux de l'apoptose suite à la répression de la transcription de *P53* dans les thymocytes. En outre, l'expression circadienne hépatique des ARNm de *c-Myc* est augmentée, alors que celle de *P53* est significativement réduite chez les souris *Per2^{m/m}* par rapport aux souris sauvages. Le proto-oncogène *c-Myc* joue un rôle-clé dans la prolifération cellulaire et l'apoptose. Les gènes *cycline D1* et *GADD45alpha*, qui sont sous le contrôle de *c-Myc*, présentaient une expression circadienne chez les souris normales

qui disparaît chez les souris *Per2^{m/m}*. En effet, le gène de l'horloge *Bmal1* agit directement sur la boîte E du promoteur P1 de *c-Myc* en inhibant sa transcription. Ces résultats ont conduit à proposer *Per2* comme un gène suppresseur de tumeur (Fu *et al.*, 2002).

Les souris porteuses de la mutation hétérozygote *APC^{min/+}* développent des polypes et cancers colorectaux spontanés. La combinaison de la mutation *Per2* avec celle de *APC^{min/+}* doublait le taux de tumeurs colorectales par rapport à la mutation *APC^{min/+}* seule. Le mécanisme fait intervenir une augmentation de l'expression de β -caténine et de la *Cycline D* (Wood *et al.*, 2008).

En accord avec ces résultats obtenus *in vivo*, la surexpression du gène *Per2* a réduit la prolifération cellulaire et accru l'apoptose dans plusieurs lignées tumorales en culture. Au contraire, la diminution de l'expression de *Per2* par des siARN (Si-*Per2*) a accéléré la prolifération maligne en culture (Gery *et al.*, 2005; Hua *et al.*, 2006; Wood *et al.*, 2008; Miyazaki *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2010; Gu *et al.*, 2012). Dans des lignées cellulaires de leucémie humaine (K562), et de carcinome pulmonaire ou mammaire murins, la surexpression de *Per2* arrêta le cycle cellulaire et augmentait l'apoptose en accroissant notamment l'expression de *p53* et de *Bax* et en diminuant celle de *c-Myc*, de *Bcl2* et de la *Cyclin B1*. Au contraire, l'extinction du gène *Per2* par utilisation de Si-*Per2* a provoqué des effets inverses (Hua *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2010). De plus, la diminution de l'expression de *Per2* dans les lignées tumorales coliques (HCT116, SW480) a augmenté la croissance cellulaire et a induit une surexpression de la β caténine et de la *Cycline D* (Wood *et al.*, 2008). Cependant, contrairement à tous les résultats précités en faveur du rôle suppresseur de tumeur de *Per2*, une étude récente a rapporté l'absence de différence pour la cancérogenèse radio-induite selon l'existence ou non d'une mutation de *Per2* (Antoch *et al.*, 2013).

Pourtant, d'autres études montrent que les souris dont les gènes *Per2* et *Per1* ont été inactivés (*Per2^{m/m}Per1^{-/-}*) développaient aussi davantage de cancers spontanés. Ainsi un lymphome spontané survenait à l'âge de 20 mois chez 17.5% des souris porteuses de la double mutation *Per1/Per2*, et seulement 5% chez les souris sauvages. L'exposition à une dose unique de rayons γ doublait ce pourcentage dans les 2 génotypes (Lee *et al.*, 2010).

La mutation homozygote *Bmal1^{-/-}* n'exerce aucun effet sur la cancérogenèse spontanée ou radio-induite. Cependant les souris hétérozygotes *Bmal1^{+/-}* étaient significativement plus sensibles au développement de tumeurs spontanées ou induites par irradiation. Ainsi un lymphome spontané survenait chez 12% des souris *Bmal1^{+/-}* et chez 33% de ces animaux

après irradiation γ alors que l'irradiation ne provoquait de lymphome que chez 10 % des animaux sauvages (Lee *et al.*, 2010). Les modèles *in vitro* suggéraient aussi une fonction suppresseur de tumeur pour *Bmal1*. En effet, La suppression de l'expression de *Bmal1* dans des cellules murines de cancer du colon (C26) a augmenté la prolifération tumorale et réduit l'apoptose (Zeng *et al.*, 2010). Très récemment, il a été montré que la sous-expression de *Bmal1* par utilisation d'ARN interférents, a diminué l'invasion des cellules tumorales issues de cancer du poumon humain, en association avec une activation de la voie de signalisation PI3K-Akt-MMP-2 (Jung *et al.*, 2013).

Enfin Lee et collègues ont montré que la double délétion *Cry1/Cry2* augmentait la susceptibilité des souris à développer des cancers spontanés ou radio-induits. Les souris porteuses de la double délétion *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* développent une faible incidence spontanée de lymphomes (13%) et de tumeurs hépatiques (6%). Ces taux sont doublés pour ces 2 types de tumeurs après l'exposition des animaux aux rayons γ . Des résultats similaires ont été trouvés chez les souris *Cry1^{-/-}Cry2^{+/+}* (Lee *et al.*, 2010). A l'inverse, la double délétion *Cry1/Cry2* n'aurait aucun effet sur la cancérogenèse radio-induite tant *in vivo* qu'*in vitro* (Gauger *et al.*, 2005). Les souris *P53^{-/-}* portant la double délétion *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* développent moins de tumeurs spontanées que les souris *P53^{-/-}* (Ozturk *et al.*, 2009). Dans des lignées tumorales humaines, la combinaison de la double délétion *Cry1/Cry2* avec une mutation *P53*, induit l'apoptose par activation du gène *P73* après exposition aux rayonnements ultraviolets ou à l'oxaliplatine, médicament anticancéreux largement utilisé en cancérologie digestive. La croissance des tumeurs *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-} P53^{-/-}* greffées est réduite par rapport aux tumeurs *P53^{-/-}* chez des souris exposées à l'oxaliplatine (Lee *et al.*, 2011).

PROBLEMATIQUE
ET
OBJECTIFS

III. PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS

III.1. Problématique générale

Le système circadien est composé d'un pacemaker hypothalamique, les noyaux suprachiasmatiques, d'un système de signalisation rythmique, la physiologie circadienne, et d'horloges moléculaires, constituées d'une quinzaine de gènes spécifiques. Le système circadien contrôle de nombreuses fonctions biologiques qui jouent un rôle essentiel dans la cancérogenèse, la progression tumorale et l'activité thérapeutique, et notamment le métabolisme et la détoxification des xénobiotiques, la réparation de l'ADN, le cycle de division cellulaire, l'apoptose, et l'angiogénèse. Le système circadien est synchronisé par l'alternance du jour et de la nuit au cours des 24 h, mais aussi par les cycles socioprofessionnels et familiaux, ainsi que les heures de prise alimentaire pour ce qui est des horloges périphériques.

En 2007, l'Organisation Internationale de la Recherche sur le Cancer identifiait le travail posté, capable de provoquer une disruption du système circadien, comme cause probable de cancer (groupe 2A). Notre laboratoire a par ailleurs montré que la disruption circadienne constituait également un facteur de mauvais pronostic chez les patients cancéreux. De même, les gènes de l'horloge circadienne sont souvent dérégulés ou réprimés dans plusieurs cancers humains, et leur moindre expression a été associée à un moindre pronostic. La cancérogenèse expérimentale chimio- ou radio-induite, tout comme la progression d'une tumeur avérée sont accélérées en cas de perturbation profonde du système circadien, que celle-ci siège au niveau du pacemaker central, de la physiologie circadienne, et/ou de l'horloge moléculaire. A l'inverse, la coordination circadienne peut être induite ou renforcée par une chronothérapie ciblant le système circadien, d'ordre pharmacologique, tel que la dexaméthasone, ou nutritionnel, tel que l'alimentation programmée. Les effets de telles interventions ont été démontrés sur le transcriptome hépatique.

Les recherches réalisées dans le cadre de cette thèse testent les hypothèses que (1) la disruption circadienne moléculaire accélère la cancérogenèse chimio-induite, et (2) le renforcement du système circadien par une intervention ciblant les horloges biologiques permet de prévenir la cancérogenèse.

III.2. Problématique spécifique et objectifs

La disruption circadienne qui résulte d'une mutation du gène de l'horloge *Per2* ou d'une double délétion *Cry1/Cry2* accélère la cancérogénèse radio-induite. En effet, la mutation constitutive du gène *Per2* décuple l'incidence de lymphomes chez la Souris, vraisemblablement parce que la mutation de *Per2* est associée à une dérégulation du proto-oncogène *c-Myc*, et à une répression de *P53*, bien mises en évidence dans le foie (Fu *et al.*, 2002). Il existe cependant une étude discordante qui ne retrouve aucune association entre la mutation *Per2* et la fréquence de cancers radio-induits (Antoch *et al.*, 2013). De même la double délétion *Cry1/Cry2* augmente la cancérogénèse induite par les rayonnements γ (Lee *et al.*, 2010). Ces données indiquent que l'horloge circadienne ou certains de ses composants pourraient jouer un rôle suppresseur de tumeur.

Le foie est l'un des organes les mieux rythmés de l'organisme aux plans génomique, protéomique et métabolomique. Cependant, l'exposition de rats en lumière constante (LL) supprime en 6 semaines la coordination circadienne. L'exposition en LL de rats dont l'hépatocarcinogénèse a été initiée par une exposition chronique à la DEN joue le rôle d'un promoteur équivalent au phénobarbital, l'agent promoteur de référence (van den Heiligenberg *et al.*, 1999). De même, le décalage horaire chronique (DHC) provoque une disruption circadienne physiologique et moléculaire hépatique. L'exposition de souris à un DHC, après initiation de l'hépatocarcinogénèse par administration chronique de DEN, constitue également un promoteur efficace de cancers hépatiques (Filipski *et al.*, 2009). Trois types principaux de cancers hépatiques sont identifiés dans cette dernière étude, le carcinome hépatocellulaire, largement le plus fréquent, mais aussi quelques cas de cholangiocarcinome ou d'hépatosarcome. Les mécanismes font intervenir la suppression des rythmes circadiens des gènes de l'horloge hépatique par le décalage horaire chronique, ainsi que la surexpression de *c-Myc* et la répression de *P53* en comparaison du foie d'animaux synchronisés par LD12 :12 (Filipski *et al.*, 2005).

La pertinence de ces recherches pour le cancer hépatique humain est confortée par le fait que les gènes de l'horloge *Per1*, *Per2*, *Per3*, et *Cry2* seraient réprimés dans le carcinome hépatocellulaire humain (Lin *et al.*, 2008).

A l'inverse, un renforcement du système circadien peut être obtenu par une programmation temporelle de l'alimentation, dont l'accès est restreint pendant 6 à 12 h chaque 24 h. Une telle alimentation programmée amplifie le rythme thermique ainsi que le rythme des ARNm de

Per2 et d'autres gènes de l'horloge hépatique, et inhibe de moitié la croissance d'une tumeur transplantée, en comparaison d'une alimentation ad libitum (Filipski *et al.*, 2005).

Mon travail de thèse a pour but de répondre aux trois questions suivantes:

- Est-ce que la disruption circadienne moléculaire et physiologique provoquée par la mutation du gène *Per2* ou la mise au silence des gènes *Cry1/Cry2* modifie la cancérogénèse hépatique chimio-induite ?
- Quels sont les principaux gènes, cytokines et hormones régulés par l'horloge circadienne qui sont impliqués dans l'initiation de la cancérogénèse hépatique ?
- Est-ce qu'une intervention nutritionnelle ou pharmacologique ciblant le système circadien pourrait prévenir le développement des cancers hépatiques ?

L'une des retombées attendues de ce travail est aussi de fournir des données expérimentales originales permettant d'appréhender le rôle du système circadien dans la cancérogénèse hépatique, aspect jusqu'ici négligé au plan épidémiologique.

**CONDUITE ET
METHODOLOGIE
GENERALE DU PROJET**

IV. CONDUITE ET METHODOLOGIE GENERALE DU PROJET

IV.1. Conduite générale du projet

Ce projet a pour but d'étudier l'effet de la disruption circadienne génétiquement induite par de mutations des gènes de l'horloge (*Per2^{m/m}* ou *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}*) dans la cancérisation hépatique. Ainsi, il aborde le rôle d'une intervention thérapeutique ciblant l'horloge circadienne dans la prévention de la cancérisation hépatique. Ce projet est divisé en cinq sections :

IV.1.1. Rôle du gène *Per2* dans la cancérogénèse hépatique

L'objectif est d'établir le rôle de la disruption circadienne liée à la mutation du gène *Per2* dans la cancérisation hépatique induite par un cancérogène hépatique, la diéthylnitrosamine (DEN). La DEN a été administrée à ZT11 par voie intrapéritonéale pendant 7 semaines pour une dose cumulée de 402 mg/kg à des souris ♂ sauvages ou mutantes du gène *Per2* (*Per2^{m/m}*), de fonds génétique 129SvEv^{Brd}/C57BL/6-Tyrc-Brd. La toxicité de la DEN a été évaluée d'après la perte de poids corporel, le taux des enzymes hépatiques circulantes et la survie des souris. Les altérations de la physiologie circadienne ont été documentées d'après les enregistrements télémétriques continus de l'activité locomotrice et de la température corporelle, à l'aide d'un capteur implanté dans la cavité péritonéale. Six mois après le début des injections de DEN, les nodules tumoraux ont été comptés sur des coupes histologiques des foies de tous les survivants.

J'ai ensuite étudié la régulation circadienne de différents mécanismes moléculaires dont la dérégulation constitue une caractéristique (« hallmark ») de cancer, en particulier la prolifération incontrôlée, l'instabilité génomique, l'apoptose, et l'inflammation. Ces quatre étapes participent à l'initiation de la cancérisation hépatique chimio-induite. Des lots différents de souris ♂ "sauvages" ou *Per2^{m/m}* ont été traitées par DEN ou NaCl 0.9% à ZT11 pendant 17 jours pour une dose cumulée de 195 mg/kg de DEN. Vingt-quatre heures après la fin des injections, des lots différents de souris de chaque génotype sont euthanasiés à 6 stades circadiens pour doser la corticostéronémie plasmatique et mesurer les concentrations protéiques d'IL-6 et de TNF- α hépatiques, et l'expression des ARNm de gènes de l'horloge (*Clock*, *Bmal1*, *Rev-erba*, *Cry1*, et *Cry2*) ou de gènes connus pour leur implication dans la

cancérogénèse hépatique dans les domaines de l'instabilité génomique (*ATM*), de l'apoptose (*P53* et *Bcl2*) ou de la prolifération cellulaire (*Wee1*, *Ccnb1*, *c-Myc*, et *K-ras*).

Cette étude a mis en évidence que la disruption circadienne provoquée la mutation du gène *Per2* accélère l'hépatocarcinogénèse, en induisant une perte du contrôle circadien de la prolifération cellulaire, de l'apoptose, et de l'inflammation.

IV.1.2. Rôle des gènes *Cry1* et *Cry2* dans la cancérogénèse hépatique

L'effet de la double délétion *Cry1/Cry2* dans la cancérisation hépatique a été étudié chez des souris ♂ "sauvages" ou *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* de fonds génétique C57BL/6. Tous les animaux ont reçu une dose fixe de DEN à ZT11 pendant 9 semaines pour une dose cumulée de 406 mg/kg. La perte de poids a été suivie pendant l'expérience. Les taux des transaminases (ALAT et ASAT) ont été déterminés lors de 4 prélèvements réalisés à différents intervalles après la fin des injections de DEN. Les rythmes de la température corporelle et de l'activité-repos ont été suivis à l'aide de capteurs téléométriques implantés dans la cavité péritonéale. Cinq mois après la fin de l'administration de DEN, les souris sont sacrifiées pour quantifier les nodules tumoraux et déterminer les types de tumeurs induites dans le foie des souris sauvages et *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}*.

Cette étude a montré que la double délétion *Cry1/Cry2* accélérât la cancérogénèse hépatique, et favorisait la formation de cancers des voies biliaires.

IV.1.3. Prévention de la cancérogénèse hépatique par alimentation programmée ou chronocorticothérapie

Le rôle d'une intervention thérapeutique ciblant l'horloge circadienne par une alimentation programmée ou par l'administration de dexaméthasone a été étudié. Des souris ♂ "sauvages" ou *Per2^{m/m}* de fonds génétique 129SvEv^{Brd}/C57BL/6-Tyrc-Brd ont reçu une dose fixe de DEN à ZT11 pendant 17 jours pour une dose cumulée de 195 mg/kg de DEN. Un lot de souris avait accès à l'alimentation de ZT14 à ZT20 et un autre lot a reçu une injection quotidienne de dexaméthasone à ZT14. L'injection de dexaméthasone et l'alimentation programmée sont commencées une semaine avant l'administration de diéthylnitrosamine et poursuivies jusqu'à la fin de l'expérimentation. Les souris de chaque génotype ont été euthanasiées 24 heures après la fin des injections. L'expression circadienne des gènes de l'horloge, de la prolifération,

et de l'apoptose et les concentrations des cytokines ont été déterminées dans le foie des deux génotypes.

En comparant les résultats obtenus dans cette étude avec ceux obtenus chez les souris en *ad libitum* exposées à la DEN (partie V.2. de résultats), nous avons trouvé que ces types d'intervention modifient le système circadien et plusieurs rythmes impliqués dans la cancérogenèse hépatique, suggérant ainsi leur rôle potentiel dans la prévention de la cancérogenèse hépatique.

IV.1.4. Rôle de la mutation constitutionnelle du gène *Per2* dans la chronotoxicité de la diéthylnitrosamine

L'objectif est ici d'identifier un rythme éventuel de toxicité de la DEN chez des souris ♀ "sauvages" ou *Per2^{m/m}* de fonds génétique 129SvEv^{Brd}/C57BL/6-Tyrc-Brd. Des lots distincts de souris ont été traitées par une dose fixe quotidienne de DEN pendant 17 jours pour une dose cumulée de 195 mg/kg à 6 horaires circadiens différents : ZT3, 7, 11, 15, 19, et 23. La toxicité a été évaluée par la perte de poids et le taux de mortalité dans chaque lot durant l'expérimentation. Vingt quatre heures après la dernière injection, les souris ont été euthanasiées pour doser les transaminases sériques, et le foie a été prélevé à la recherche de possibles de lésions hépatiques induites par DEN. Les résultats obtenus montrent que la toxicité de la DEN était plus importante chez les souris sauvages par rapport aux *Per2^{m/m}*.

IV.1.5. Rôle de la mutation constitutionnelle du gène *Per2* dans la chronotoxicité de l'irinotécan

Cet objectif du projet européen C5Sys était de prédire l'heure de meilleure tolérance de l'irinotécan indépendamment du sexe et du patrimoine génétique de la Souris. En utilisant des souris mâles et femelles de trois fonds génétiques différents, trois classes de chronotoxicité de l'irinotécan ont été identifiées. Ensuite, on a cherché à identifier des marqueurs moléculaires permettant de discriminer ces 3 classes. Les expressions circadiennes de gènes de l'horloge, du métabolisme de l'irinotécan, du cycle cellulaire et de l'apoptose ont été mesurées dans le foie et/ou le colon des souris. *Bmal1* et *Rev-erba* ont été identifiés comme les deux gènes les plus discriminants. Ces résultats ont été ensuite validés en mesurant l'expression de ces deux

gènes chez des souris males et femelles présentant une mutation de *Per2*. L'ensemble des données a permis de construire un modèle mathématique capable de prédire l'heure optimale de l'irinotecan avec une fiabilité importante.

Ces sections sont résumées dans le tableau récapitulatif suivant (Tableau 4)

Expérience	Objectif	Lignée (sexe)	Nombre des souris	Produit injecté Dose mg/kg/jour (Dose cumulée)	Stades circadiens d'administration	Stades circadiens de prélèvement	Paramètres étudiés
1	Effet de la mutation <i>Per2</i> sur la cancérogénèse hépatique	129SvEv ^{Brd} / C57BL/6-Tyrc-Brd (♂)	13 WT 13 <i>Per2^{m/m}</i>	DEN 15 puis 12 (402 mg/kg)	ZT 11	ZT 11	Nombre des nodules tumoraux hépatiques Perte du poids corporel Survie Rythmes de la température et d'activité-repos
			30 WT 30 <i>Per2^{m/m}</i>	0	ZT 11	ZT 3, 7, 11, 15, 19, et 23	
2	Effet de la double délétion <i>Cry1/Cry2</i> sur la cancérogénèse hépatique	C57BL/6 (♂)	16 WT 15 <i>Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}</i>	DEN 12 puis 10 (406 mg/kg)			ZT 11
			41 WT 41 <i>Per2^{m/m}</i>	DEN 15 (195 mg/kg)	ZT 11	ZT 3, 7, 11, 15, 19, et 23	Expression hépatique de gènes de l'horloge, et de prolifération. Concentrations protéiques hépatiques d'IL-6 et de TNF-α Concentrations protéiques sériques de corticostérone
3	Intervention thérapeutique ciblant l'horloge circadienne pour la prévention de la cancérogénèse hépatique	129SvEv ^{Brd} / C57BL/6-Tyrc-Brd (♂)	41 WT 41 <i>Per2^{m/m}</i>	DEN 15 (195 mg/kg)	ZT 11	ZT 3, 7, 11, 15, 19, et 23	
4	Chronotoxicité de la diéthylinitrosamine	129SvEv ^{Brd} / C57BL/6-Tyrc-Brd (♀)	41 WT 30 <i>Per2^{m/m}</i>	DEN 15 (195 mg/kg)	ZT 3, 7, 11, 15, 19, et 23	ZT 3, 7, 11, 15, 19, et 23	Expression hépatique de Bmal1 et de Rev-erba
5	Personnalisation de la chronothérapie	129SvEv ^{Brd} / C57BL/6-Tyrc-B (♂ et ♀)	30 WT 30 <i>Per2^{m/m}</i>	0		ZT 3, 7, 11, 15, 19, et 23	

IV.2. Souris et synchronisation

Les souris sauvages (WT), *Per2^{m/m}* et *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* sont placées dans des caissons chronobiologiques à température contrôlée (21-23°C). Elles sont synchronisées avec une alternance de 12h de lumière et de 12h d'obscurité (LD 12:12) pendant 3 semaines avant et durant les expérimentations, avec un accès libre à l'eau et à la nourriture (sauf pour l'expérience de l'alimentation programmée). Toutes les procédures sont exécutées selon les directives françaises pour l'expérimentation (décret 87-843).

IV.3. Bio-marqueurs circadiens

Deux semaines avant le début de l'administration de diéthylnitrosamine, un capteur télémétrique de température corporelle et d'activité-repos (PhysiolTel, TA10TA-F20, Data Sciences, MN, États-Unis) est implanté dans la cavité péritonéale de la souris sous anesthésie par isoflurane. Une semaine plus tard, ces capteurs sont activées à l'aide d'un aimant, et les données sont transmises par des ondes radio et reçues par des antennes (RPC-1) placées sous chaque cage. Les informations sont automatiquement détectées par des matrices 'Data Exchange' et transférées à un ordinateur qui collecte toutes les données avec le logiciel 'Dataquest Acquisition System ART 2.3'. Ce système permet d'enregistrer les deux variables sur l'animal conscient et non contraint toutes les dix minutes pendant quelques jours à quelques mois sans perturber l'animal.

IV.4. Protocoles d'administration de diéthylnitrosamine

La diéthylnitrosamine (DEN, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) est un liquide jaune volatile, et sensible à la lumière. Une solution initiale de DEN à 10 mg/ml est préparée chaque semaine et conservée à +4°C. La solution finale injectée est ensuite diluée à partir de cette solution dans du sérum physiologique (NaCl à 0,9%) en fonction de la dose souhaitée Sa concentration est toujours mélangée avant l'utilisation. La solution cancérogène est stockée à 4°C. L'administration chronique de DEN se fait par voie intrapéritonéale.

IV.5. Interventions à visée préventive

La solution initiale de la **déxaméthasone** (10 mg/ml) est préparée à partir de déxaméthasone 21-phosphate disodium (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) à une dose molaire

équivalente dans l'eau distillée. La dose injectée (1 mg/kg de poids de la souris) est ensuite préparée et conservée à 4°C. L'injection se fait quotidiennement par voie intrapéritoneale à ZT14.

L'alimentation programmée est réalisée en restreignant l'accès à la nourriture à une durée de 6 heures pendant la phase d'obscurité, de ZT14 à ZT20.

L'injection de dexaméthasone et l'alimentation programmée sont commencées une semaine avant l'administration de diéthylnitrosamine et poursuivies jusqu'à la fin de l'expérimentation.

IV.6. Histopathologie

Les organes sont prélevés juste après la mort ou le sacrifice des souris. Ils sont fixés au formol pendant 24 heures dans 4% de paraformaldéhyde. Ils sont ensuite déshydratés et inclus en paraffine. Pour chaque échantillon, trois coupes sériées de 4 µm d'épaisseur sont faites à l'aide d'un microtome. Les coupes sont ensuite étalées sur des lames et colorées à l'hémalum-érythrosine-safran (coloration HES). La lecture des lames est réalisée par une anatomopathologiste confirmée spécialiste de pathologie hépatique (Professeur C. Guettier).

IV.7. Prélèvements sanguins et tissulaires

Les prélèvements sanguins ou l'euthanasie des animaux avant prélèvement tissulaire sont effectués en lumière blanche pour les animaux en phase lumineuse et en lumière rouge pour ceux en phase d'obscurité. Le sang est prélevé au niveau du sinus retro-orbitaire.

Les organes destinés à l'analyse histologique (foie, poumon, et reins) sont prélevés et mis dans des cassettes puis placés pendant 24 h dans le formol pour fixation avant inclusion en paraffine.

Pour les mesures d'expression de gènes et des concentrations hépatiques de cytokines, trois fragments du même lobe hépatique et de 100 mg chacun sont prélevés, mis dans l'azote liquide et gardés à -80°C.

IV.8. Dosage des Enzymes hépatiques circulantes

Le sang est prélevé sans anticoagulant. Il est immédiatement centrifugé pendant 15 minutes à 4°C à 4000 rpm. Le sérum (150 µl) est récupéré et gardé à -80°C. Les mesures de transaminases et de phosphatases alcalines sont faites par Dr P. Pham (service de Biochimie, Bâtiment Fred Siguiier, Hopital Paul Brousse).

IV.9. Mesure des concentrations protéiques sériques de corticostérone par ELISA.

Le sang est prélevé sur des tubes héparinisés toutes les 4 heures pendant 24 heures chez des souris traitées par DEN ou contrôles. Après chaque prélèvement, le sang est centrifugé à 4°C pendant 15 minutes à 5000 rpm. Le plasma (200 µl) est récupéré et gardé à -80°C. Juste avant le dosage, le plasma est dilué 100 fois, et les concentrations de corticostérone plasmatique sont déterminées à l'aide d'un kit Corticosterone Enzyme Immunoassay (Enzo life science, Villeurbanne- France).

IV.10. Mesure des concentrations hépatiques de cytokines par ELISA

Chaque fragment hépatique est broyé à 4°C avec 1 ml de tampon de lyse (Tris 20 mM, EDTA 2 mM, EGTA 5 mM, NaCl 100 mM, DTT 0.5 mM, 0.1% de triton, et un cocktail d'anti-protéases) par un homogénéisateur mécanique (Ultra Turrax). La solution obtenue est centrifugée à 12 000 rpm pendant 15 minutes à 4°C, et le surnageant est ensuite conservé à 80°C.

Le dosage des protéines hépatiques est réalisé en utilisant un liquide de Bradford. L'absorbance est lue à 595 nm après une incubation de 5 minutes à température ambiante par un spectrophotomètre (BioPhotometer). Les concentrations hépatiques d'IL-6 et de TNF- α sont déterminées à l'aide des kits ELISA selon les instructions du fabricant (Invitrogen).

IV.11. Extraction et mesure d'expression des ARNm par RT-PCR

L'extraction des ARN est réalisée selon une méthode dérivée de celle mise au point par Chomczynski et Sacchi (1987). Chaque fragment hépatique prélevé du foie est lysé avec une solution d'extraction contenant du thiocyanate de guanidium et du phénol. Après addition de 200 µl de chloroforme et agitation rapide, le mélange est centrifugé à 12 000 rpm durant 20 minutes à 4°C. La phase aqueuse est récupérée, mélangée à un volume équivalent

d'isopropanol, et placée une nuit à -80°C. Le lendemain, après centrifugation (12 000 rpm, 30 minutes, 4°C), le culot d'ARN est lavé avec 500 µl d'éthanol 70% froid. Une dernière centrifugation à 12 000 rpm durant 20 à 4°C est réalisée. Le culot est ensuite séché, puis resuspendu dans l'eau MilliQ stérile, et les solutions d'ARN sont conservées à -80°C (Chomczynski et Sacchi, 1987). La quantité d'ARN totaux est mesurée au spectrophotomètre à 260 nm. L'intégrité et la qualité des ARN sont contrôlées par électrophorèse sur gel d'agarose 1%.

La transcription inverse (RT-PCR) est une étape qui consiste à la transformation des ARNm en ADNc grâce à une transcriptase inverse. En effet, 5 µg d'ARN totaux sont incubés durant 5 minutes à 65°C en présence des amorces. Cette étape consiste à dénaturer les ARNm. Le mélange est placé directement dans la glace. Les dNTP (10mM), le Dithiothreitol (DTT), et la transcriptase inverse sont ajoutés au milieu réactionnel. La synthèse des ADNc est ensuite réalisée lors de l'incubation à 42°C pendant 50 minutes, suivie par une 2^{ème} incubation à 65°C pendant 15 minutes. Les ADNc obtenus sont conservés à -20°C.

La quantification des ADNc spécifique d'un gène est réalisée par une **amplification enzymatique en chaîne (QPCR)** à l'aide d'un thermocycler LightCycler®480 (Roche applied science). Cette réaction s'est faite en présence d'un produit fluorescent, le SYBR Green qui est un agent intercalent de l'ADN. L'amplification est effectuée de la manière suivante :

- Un cycle de dénaturation de 5 minutes à 95°C
- 40 cycles d'amplification composés dont chaque cycle est composé de 3phases :
 - Dénaturation (5 secondes à 95°C)
 - Hybridation (5 secondes à 60°C)
 - Amplification (10 secondes à 72°C)
- Un cycle de refroidissement : 1 minute à 35°C

IV.12. Analyses statistiques

La moyenne et ses limites de confiance à 95% ont été calculées pour toutes les données quantitatives, en fonction de génotype, des conditions expérimentales, et du temps de prélèvement.

Les séries temporelles ont été analysées par Cosinor, qui est une approximation des séries temporelles par une fonction cosinusoidale. Elle permet de caractériser un rythme par

l'estimation de ses paramètres : la phase, l'amplitude A, et le niveau moyen ou mésor, avec leurs limites de confiance à 95 %. Le test de Hotelling permet de comparer les paramètres d'un rythme entre plusieurs populations. L'analyse spectrale est également utilisée pour déterminer la période et les paramètres des rythmes, lorsque la période est à priori inconnue.

Les comparaisons inter groupes ont été réalisées avec la version 18 du logiciel SPSS (Statistical Package for Social Sciences, Chicago, IL, Etats-Unis). Les différences inter groupes sont validées statistiquement par des analyses de variance ANOVA. Les courbes de survie ont été comparées avec le test de Log-rank. Alors que l'incidence des tumeurs dans les différents groupes a été validée par Kruskal-wallis. $P < 0.05$ signifie que la différence inter groupe est statistiquement significative.

RESULTATS

V.1. Aspects généraux de la chronothérapie du cancer

V.1.1. Résumé

E. Ortiz-Tudela, **A. Mteyrek**, A. Ballesta, P.F. Innominato, and F. Lévi

Le système circadien contrôle le cycle cellulaire, l'apoptose, et le métabolisme des médicaments, ainsi que leur transport et leur détoxification dans les tissus sains. En conséquence, dans les modèles expérimentaux, la tolérance à une chimiothérapie anticancéreuse varie jusqu'à plusieurs fois en fonction de l'heure d'administration des médicaments. La meilleure efficacité antitumorale d'un anticancéreux seul ou combiné correspond à leur délivrance au moment de leurs heures respectives de meilleure tolérance. Les modèles mathématiques révèlent qu'une telle coïncidence entre chronotolérance et chronoefficacité est expliquée par la différence entre la robustesse du système circadien et les paramètres du cycle cellulaire de l'hôte et du cancer. Les essais cliniques ont démontré qu'une chimiothérapie administrée selon le rythme circadien améliorerait la tolérance en comparaison d'une chimiothérapie classique à débit constant ou administrée aux horaires de plus grande toxicité. Cependant, le sexe, le patrimoine génétique, et le mode de vie influencent la tolérance et l'efficacité de la chronothérapie. Ces découvertes nécessitent de faire intervenir la biologie des systèmes pour optimiser et modéliser la chronothérapie des cancers, en repérant systématiquement l'organisation circadienne des principales voies impliquées dans la chronopharmacologie, d'abord dans des cultures cellulaires synchronisées, puis dans des modèles de souris, comme nous venons de le montrer pour l'irinotécan. Les recherches actuelles de modélisation de la chronothérapie ont pour objectif d'améliorer la tolérance et l'efficacité des médicaments anticancéreux par la prise en compte du système circadien individuel des patients.

Cancer Chronotherapeutics: Experimental, Theoretical, and Clinical Aspects

E. Ortiz-Tudela, A. Mteyrek, A. Ballesta, P.F. Innominato, and F. Lévi

Abstract The circadian timing system controls cell cycle, apoptosis, drug bioactivation, and transport and detoxification mechanisms in healthy tissues. As a consequence, the tolerability of cancer chemotherapy varies up to several folds as a function of circadian timing of drug administration in experimental models. Best antitumor efficacy of single-agent or combination chemotherapy usually corresponds to the delivery of anticancer drugs near their respective times of best tolerability. Mathematical models reveal that such coincidence between chronotolerance and chronoefficacy is best explained by differences in the circadian and cell cycle dynamics of host and cancer cells, especially with regard circadian entrainment and cell cycle variability. In the clinic, a large improvement in tolerability was shown in international randomized trials where cancer patients received the same sinusoidal chronotherapy schedule over 24 h as compared to constant-rate infusion or wrongly timed chronotherapy. However, sex, genetic background, and

E. Ortiz-Tudela

INSERM, UMRS776 "Rythmes biologiques et cancers", Paul Brousse Hospital, Villejuif, France

Department of Physiology, Chronobiology Laboratory, University of Murcia, Murcia, Spain

A. Mteyrek

INSERM, UMRS776 "Rythmes biologiques et cancers", Paul Brousse Hospital, Villejuif, France

ParisSud University, UMR-S0776 Orsay, France

A. Ballesta

INSERM, UMRS776 "Rythmes biologiques et cancers", Paul Brousse Hospital, Villejuif, France

INRIA Rocquencourt, BANG Project Team, Le Chesnay Cedex, France

ParisSud University, UMR-S0776 Orsay, France

P.F. Innominato • F. Lévi (*)

INSERM, UMRS776 "Rythmes biologiques et cancers", Paul Brousse Hospital, Villejuif, France

ParisSud University, UMR-S0776 Orsay, France

Department of Oncology, APHP, Chronotherapy Unit, Paul Brousse Hospital, Villejuif, France

e-mail: francis.levi@inserm.fr

A. Kramer and M. Mewes (eds.), *Circadian Clocks, Handbook of Experimental*

261

Pharmacology 217, DOI 10.1007/978-3-642-25950-0_11,

Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

lifestyle were found to influence optimal chronotherapy scheduling. These findings support systems biology approaches to cancer chronotherapeutics. They involve the systematic experimental mapping and modeling of chronopharmacology pathways in synchronized cell cultures and their adjustment to mouse models of both sexes and distinct genetic background, as recently shown for irinotecan. Model-based personalized circadian drug delivery aims at jointly improving tolerability and efficacy of anticancer drugs based on the circadian timing system of individual patients, using dedicated circadian biomarker and drug delivery technologies.

Keywords Cancer • Circadian rhythms • Chronotherapy • Survival • Chronotolerance • Chronoefficacy • Mathematical models • Clinical trials

1 Context

Cancer is a systemic disease, and therefore, it can profoundly affect daily activities, sleep, and feeding, as well as cellular metabolism (Mormont and Lévi 1997; Barsevick et al. 2010). Thus, cancer patients often experience fatigue, which prevents them to carry on their daily routines (Weis 2011). Cancer patients on chemotherapy further experience treatment-related adverse events such as nausea, vomiting, or diarrhea, which also impair their quality of life (Van Ryckeghem and Van Belle 2010). Besides, most anticancer treatments are administered within hospital wards, a condition which also disrupts the daily routines of cancer patients. Indeed, cancer, treatments and hospitalization can alter the rest–activity pattern of patients.

The endogenous circadian rhythm in rest–activity is controlled by the suprachiasmatic nuclei in the hypothalamus (Hastings et al. 2003). This rhythm has been commonly evaluated in cancer patients as a biomarker that reflects the robustness of the circadian timing system (CTS) (Mormont et al. 2000; Ancoli-Israel et al. 2003; Calogiuri et al. 2011; Berger et al. 2007). Moreover, patients suffering from circadian disruption have a poorer survival outcome, compared to those with a robust CTS, as indicated with rest–activity or cortisol patterns (Mormont et al. 2000; Sephton et al. 2000; Innominato et al. 2009). Studies in mice have backed up the above clinical findings, since anatomical or functional SCN suppression or clock gene mutations accelerated cancer progression (Filipski et al. 2002, 2004, 2005, 2006; Fu et al. 2002; Otálora et al. 2008).

On the other hand, treatment effects vary according to dosing time. This has especially been shown both for the tolerability and the efficacy of anticancer drugs. The findings have led to the concept of cancer chronotherapy, with circadian timing of drug delivery playing a crucial role for improving tolerability and/or efficacy (Lévi et al. 2010). Cancer chronotherapeutics is a field of research that aims at optimizing cancer treatments through the integration of circadian clocks in the design of anticancer drug delivery (Lévi and Okyar 2011).

2 Circadian-Based Cancer Treatments

The CTS rhythmically controls both drug metabolism and cellular detoxification, thus alters drug interactions with their molecular targets as well as DNA repair and apoptosis over 24 h in healthy tissues. The CTS also regulates healthy cell cycle (Antoch and Kondratov 2013). Since many anticancer drugs target a given stage of the cell division cycle, the clock-controlled cell proliferation events also represent a critical determinant of anticancer drug cytotoxicity (Haus 2002; Granda et al. 2005; Tampellini et al. 1998; Smaaland et al. 2002). Both orders of mechanisms are responsible for large and predictable changes in the tolerability of anticancer drugs. In contrast, cell divisions usually occur in an asynchronous fashion in cancer tissues (Fu and Lee 2003; Lévi et al. 2007a). The temporal dissociation between healthy and cancer tissues provides the main rationale of cancer chronotherapy, which aims at minimizing treatment toxicities, while maximizing efficacy through properly timing treatment delivery (Lévi and Okyar 2011). However, there may be a circadian regulation of malignant tumors that can involve the CTS control of vascular endothelial growth factor-mediated neo-angiogenesis (Koyanagi et al. 2003; Lévi et al. 2010).

Tolerability rhythms have been demonstrated for more than 40 anticancer drugs, including cytokines, cytostatics, antiangiogenic agents, and cell cycle inhibitors in mice or rats synchronized with an alternation of 12 h of light and 12 h of darkness (Lévi et al. 2010). Lethal toxicity and/or body weight loss following anticancer drug administration usually varies two- to tenfold as a function of circadian timing (Lévi and Schibler 2007). Experimental evidence reveals that both dose and circadian timing jointly play a critical role for the antitumor efficacy of 28 anticancer agents in mice, using tumor growth inhibition or increase in life span as established measures of treatment efficacy in experimental systems (Lévi et al. 2010).

2.1 Circadian Control of Detoxification

Chronotolerance and chronoefficacy result from an array of cellular rhythms involving drug detoxification and/or bioactivation enzymes as well as drug transporters. These cellular rhythms can now be explored in synchronized cell cultures (Lévi et al. 2010; Ballesta et al. 2011; Dulong et al. Chronopharmacology of irinotecan at cellular level. Unpublished). They translate into the well-known circadian changes shown for drug exposure and elimination at whole organism level. In mice, circadian clocks control Phase I metabolism enzymes such as CYP450 and carboxylesterases as well as Phase II detoxification enzymes such as glucuronosyltransferases and glutathione S-transferases enzymes (Martin et al. 2003) and ABC transporters including *abcb1a/b* and *abcc2* (Murakami et al. 2008; Okyar et al. 2011).

2.2 Circadian Control of Cell Cycle

Each cell has a molecular clock within it consisting of a set of feedback loops that create oscillations in gene expression at mRNA and protein levels with a period of about 24 h (Ko and Takahashi 2006; Huang et al. 2011; for a review see Buhr and Takahashi 2013).

These clock genes control the rhythmic expression of up to 10 % of the transcriptome (Panda et al. 2002; Storch et al. 2002). Besides, some posttranslational rhythms appear to be independent from the transcriptional rhythms (O'Neill et al. 2011; for a review, see O'Neill et al. 2013). Additionally, nongenetic circadian clocks have recently been described in red blood cells (O'Neill and Reddy 2011). Neither the mechanistic links between these different circadian oscillators nor their respective relevance for cancer chronotherapy is currently known.

Clock genes participate in several physiological processes in cells, including the regulation of cell cycle (Fig. 1; see also Antoch and Kondratov 2013). For instance, the dimer CLOCK–BMAL1 activates the expression of cMyc and p21, whose product proteins play an important role on proliferation and apoptosis (Khapre et al. 2010). Furthermore, CLOCK:BMAL1 participates also on the activation of p53, a proapoptotic gene, and Wee1, whose protein prevents the transition from G2 to mitosis by the inactivating phosphorylation of the complex CDC2/CyclinB1 (Hunt et al. 2007). The clock machinery further regulates apoptosis through the rhythmic expression of proapoptotic (Bax) and antiapoptotic (Bcl2) genes (Granda et al. 2005). P53 protein plays an important role in tumor suppression, through promoting apoptosis in healthy cells exposed to DNA-damaging agent or initiating oncogenic transformation. In the absence of p53, p73 is able to substitute p53 as tumor suppressor. Thus, apoptosis was increased, as a result of the enhanced induction of p73 in cancer cells with both clock and P53 silencing ($Cry1^{A/A} Cry2^{A/A} p53^{A/A}$). This finding suggests a possible therapeutic role for cryptochrome silencing in those cancer cells with P53 mutation, which usually display a most aggressive malignant phenotype (Lee and Sancar 2011). The functional status of the CLOCK:BMAL1 heterodimer was shown to alter chronotolerance for chemotherapy in wild-type mice. Conversely, mice with circadian clock mutation $Clock^{\Delta 19/\Delta 19}$ or $Bmal1^{A/A}$ displayed severe toxicity of the alkylating agent cyclophosphamide irrespective of dosing time, while $Cry1^{A/A}$ and $Cry2^{A/A}$ mice displayed improved yet time-invariant tolerability for this drug as compared to wild-type mice (Gorbacheva et al. 2005).

Both DNA damage sensing and DNA repair are controlled in part by the rhythmic expression of XPA (Kang et al. 2010). Core circadian genes seem to respond directly to radiation, so that the disruption of *Per2* prevents the response of all core circadian genes to radiation (Fu and Lee 2003). Such clock effects of radiation are in line with the demonstration that ionizing radiation produces circadian phase shifts in dose- and time-dependent manner (Oklejewicz et al. 2008). Thus, genotoxic stress can modulate the molecular clock, a critically relevant finding for cancer chronotherapy involving DNA-damaging drugs (Miyamoto et al. 2008).

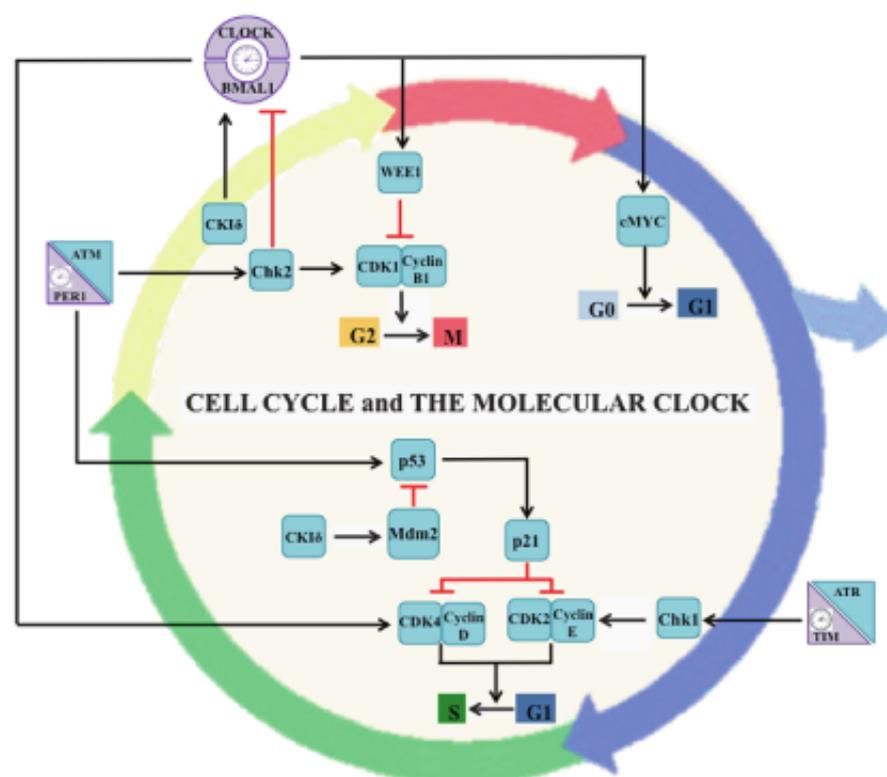


Fig. 1 Hypothetical scheme describing the interactions between the molecular clock and the cell cycle. The 24-h rhythmic oscillation generated by the molecular clock is produced by interwoven feedback loops involving at least 15 clock genes and proteins. PER and CRY proteins form heterodimers that interfere with the CLOCK::BMAL1 heterodimer which activates the mRNA transcription of Per, Cry, Rev-erb, and Dec genes. Subsequently, REV-ERB α protein blocks Bmal1 transcription, which is activated by ROR α protein (not shown). The CLOCK::BMAL1 heterodimer also directly controls the transcriptional activity of clock-controlled genes such as Wee1, cMyc, Ccn1, and P21 which regulate the cell division cycle. In addition, PER1 protein binds to ATM (ataxia telangiectasia mutated). Both PER1 and ATM can phosphorylate P53 and CHK2. P53 both regulates apoptosis and arrests the cell cycle in G1 phase through activating P21 transcription, among many other functions. P21 inhibits the complexes formed by CCNE and CCND thus preventing cell cycle progression from S to G2 phase. CHK2 (cell cycle checkpoint kinase 2) protein can both prevent the cell cycle control by the CLOCK::BMAL1 dimer and activate the CCNB1–CDK1 complex that is required for the cycling cell to enter mitosis (M-phase)

2.3 Clock Genes and Cancer

Both the expression of clock genes and their circadian pattern are usually disrupted in most experimental tumors growing in mice, especially following the initial latency phase (Filipski et al. 2005; Li et al. 2010). Cancer progression was reportedly counteracted by Per genes expression. Thus, the overexpression of Per1

inhibited growth in human cancer cell lines and increased apoptosis after ionizing radiation. In contrast, Per1 silencing prevented radiation-induced apoptosis (Gery et al. 2006). The downregulation of clock gene Per2 was also associated with increased cell proliferation, while its overexpression promoted apoptosis (Fu and Lee 2003; Gery et al. 2005; Wood et al. 2008). These and other experimental findings are in line with the mRNA or protein downregulation of Per1 or Per2 in several human cancers (Gery et al. 2006; Chen et al. 2005; Yeh et al. 2005; Innominato et al. 2010). Indeed clock genes alterations in tumors and/or in hosts have been reported to respectively affect patient survival and cancer risk (Table 1). Thus, polymorphisms in circadian genes have been associated with cancer risk and patient survival for non-Hodgkin's lymphoma (Hoffman et al. 2009; Zhu et al. 2007), prostate cancer (Chu et al. 2008), or breast cancer (Yi et al. 2010). For example, a single-nucleotide polymorphism (SNP) in NPAS2 confers a 49 % decrease in breast cancer risk (Zhu et al. 2008), while Cry2 polymorphisms are also associated with an increased risk of non-Hodgkin's lymphoma and prostate cancer (Chu et al. 2008; Hoffman et al. 2009).

3 Clinical Options in Cancer Chronotherapy

Conventional cancer therapies involve the timing of drugs according to hospital routine and staff working hours (Lévi et al. 2010). In contrast, chronotherapy consists in the administration of each drug according to a delivery pattern with precise circadian times in order to achieve best tolerability and best efficacy (Lévi and Okyar 2011). This has mostly involved chronomodulated delivery schedules. Dedicated multichannel programmable pumps have enabled the ambulatory intravenous or intra-arterial administration of multiple drugs according to precisely timed semi-sinusoidal infusion rates, so as to deliver chronotherapy with minimal interference with the daily life of the patient. Oral chemotherapy is also amenable to chronotherapeutic optimization, as suggested in clinical chronopharmacology studies for busulfan, 6-mercaptopurin, and oral fluoropyrimidines (Vassal et al. 1993; Rivard et al. 1993; Etienne-Grimaldi et al. 2008; Qvortrup et al. 2010). A future for oral cancer chronotherapy could stem from chronoprogrammed release formulations, since these drug delivery systems allow both chronomodulated drug exposure and nighttime drug uptake without requiring awakening during sleep whenever drug intake should be recommended at night (Spies et al. 2011).

4 Cross Talks Between Chronotolerance and Chronoefficacy

4.1 Experimental Studies

A striking coincidence characterizes the circadian time of best tolerability and that of best efficacy for most chemotherapy drugs in rodents (Fig. 2). Such observation

Table 1 Clock genes' features implicated in cancer survival

Cancer type	Number of subjects	Clock gene	Gene alteration	Clinical outcome	Reference
Colorectal cancer	411	Clock	Polymorphism in SNP rs3749474	" Survival HR: 0.55; CI 95 % (0.37–0.81); p ¼ 0.003	Zhou et al. (2011)
			Polymorphism in SNP rs1801260	" Survival HR: 0.31; CI 95 % (0.11–0.88); p ¼ 0.03	
Chronic lymphocytic leukemia	19	CSNK1E Per1 Per3 Per2	# mRNA	# Survival (p ¼ 0.024)	Mazzoccoli et al. (2011)
			# mRNA	# Survival (p ¼ 0.010)	
			# mRNA	# Survival (p ¼ 0.010)	
			* PER2 protein	" Survival HR: 0.58; CI 95 % (0.40–0.85) p ¼ 0.005	
Epithelial ovarian cancer	83	Per2 Per2 and Cry1	# mRNA	Better outcome	Oshima et al. (2011) Eisale et al. (2009)
			# Per2 mRNA + * Cry1 mRNA	# Treatment-free survival HR: 3.23; CI 95 % (1.13–9.18); p ¼ 0.028	
Breast Cancer	348	Cry1 and Bmal1 NPAS2	# Cry1 mRNA + #Bmal1 mRNA	# Survival HR: 5.34; CI 95 % (1.10–25.85); p ¼ 0.037	Tokunaga et al. (2008) Yi et al. (2010)
			* mRNA	" Survival HR: 0.38; CI 95 % (0.17–0.86); p ¼ 0.017	

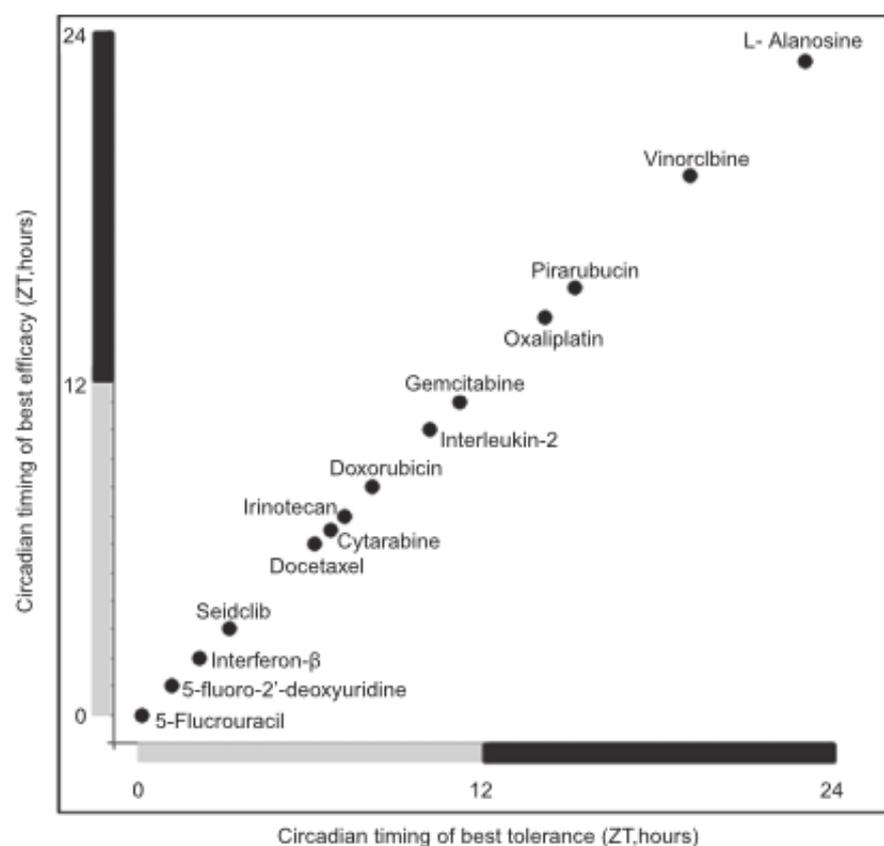


Fig. 2 Coincidence between the circadian time of best tolerance and that of best efficacy for 14 anticancer drugs in rodents

also applies to combination chemotherapy involving two or more anticancer drugs: indeed the best efficacy of the combination treatment is achieved when each drug is administered at its own circadian time of best tolerability, as shown for docetaxel–doxorubicin, for irinotecan–oxaliplatin, and for gemcitabine–cisplatin in tumor-bearing mice (Fig. 3). These results support tight mechanistic links between chronotolerance and chronoefficacy. Moreover, the poor tolerability of the current schedules of these combination chemotherapies and their extensive use in cancer patients further challenge the clinical applications of these experimental chronotherapeutic findings (reviewed in Lévi et al. 2010).

4.2 Clinical Studies

Few clinical studies have investigated the circadian timing concept for chemotherapy administration. A first trial showed that chemotherapy timing was an important

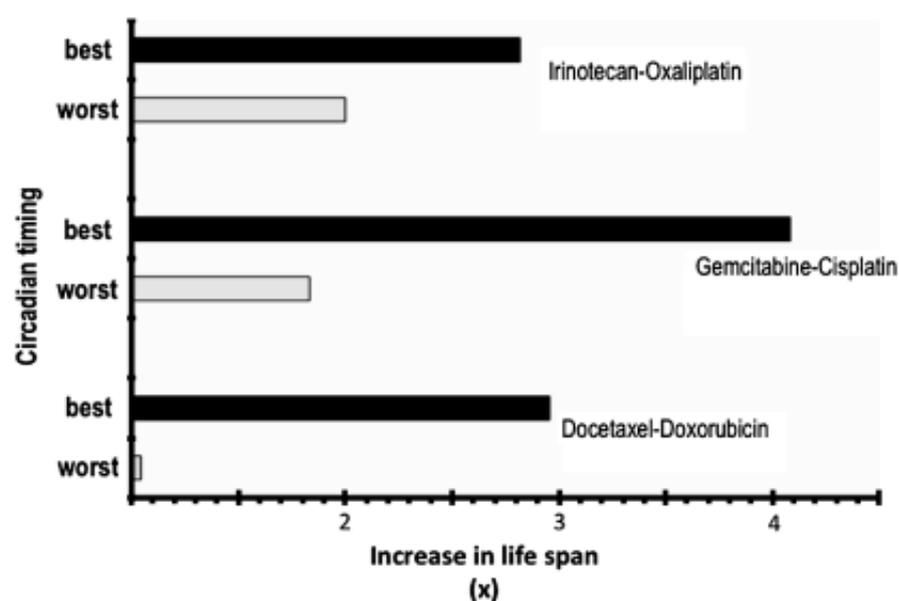


Fig. 3 Relations between chronotolerance and chronoefficacy of three widely used drug combinations in tumor-bearing mice. Increase in life span of male B6D2F1 mice with Glasgow osteosarcoma receiving irinotecan-oxaliplatin or gemcitabine-cisplatin and male C3H/He mice with MA13C mammary adenocarcinoma receiving docetaxel-doxorubicin. The figure illustrates the relevance of dosing time of each drug in the combination. Life span was increased several folds when each agent was delivered at the circadian time achieving best tolerability ("best") as compared to that associated with worst tolerability ("worst")

determinant of success in patients with non-small cell lung cancer (Focan et al. 1995). Two trials, each one involving less than 40 patients with advanced ovarian cancers, showed a better tolerability of morning doxorubicin or theprubicin, two DNA-intercalating agents, and late afternoon cisplatin, an alkylating-like drug, as compared to treatment administration 12 h apart (Hrushesky 1985; Lévi et al. 1990). However, the practical difficulties in specifying times of drug administration limited further developments of such approach until the advent of programmable in time drug delivery systems. This dedicated technology enabled intravenous chronomodulated delivery of up to four anticancer drugs without hospitalization of the patient.

Oxaliplatin is the first anticancer drug that has undergone chronotherapeutic development long before its approval for the treatment of colorectal cancer. Indeed this drug was considered as too toxic to pursue its development by the pharmaceutical industry following conventional Phase I clinical testing. Experimental chronotherapeutics studies revealed threefold changes in tolerability according to dosing time in mice (Boughattas et al. 1989). The translation of these findings led to a randomized Phase I study involving 23 patients, 12 of whom received chronomodulated infusion, with peak flow rate at 1600 hours, as compared to 11

treated with constant-rate infusion. Chronotherapy displayed the best safety profile with regard to peripheral sensory neuropathy, the major adverse event of this drug (Caussanel et al. 1990). Interestingly most antitumor activities were recorded among the patients on chronotherapy, a finding subsequently confirmed in patients with metastatic colorectal cancer (Lévi et al. 1993).

The chronomodulated oxaliplatin infusion was then combined with the chronomodulated infusion of 5-fluorouracil–leucovorin (5-FU–LV) with a peak flow rate at 4:00 at night. Five-FU–LV was the reference combination treatment of colorectal cancer. Thus, the first clinical trial that demonstrated the major efficacy of oxaliplatin–5-FU–LV against colorectal cancer involved the chronomodulated delivery of these three agents, the so-called chronoFLO regimen (Lévi et al. 1992). International clinical trials then showed that chronoFLO decreased the incidence of mucosal toxicities fivefold and halved that of peripheral sensory neuropathy as compared to the constant-rate infusion of the same three drugs or their chronomodulated administrations with peak times differing by 9 or 12 h from the initial schedule (Fig. 4) (Lévi et al. 1994, 1997, 2007b). Moreover, in each of these clinical trials, the best tolerated chronotherapy schedule also achieved best tumor shrinkage, based on objective response rate (Innominato et al. 2010). A subsequent international clinical trial involving 564 patients with metastatic colorectal cancer compared 4-day chronoFLO with another 2-day conventional delivery schedule of the same drugs (FOLFOX2 regimen) (de Gramont et al. 1997). Overall survival was similar in both treatment groups. However, chronoFLO significantly reduced the relative risk of an earlier death by 25 % in male patients as compared to FOLFOX2, while the opposite was found in women (Giacchetti et al. 2006). Median survival times differed by 6 months between men and women on chronoFLO, while no gender-related difference was found for the patients on FOLFOX. This strongly supported that the optimal timing of chronoFLO differed between male and female patients. The preclinical studies that were performed in male mice adequately predicted for the optimal timing of the drugs in male patients. In contrast no valid prediction was inferred from male mice to female patients! This clinical finding stressed the need for thorough investigations of sex-related differences in chronotherapeutics. Recent studies along these lines have shown major sex and genetic differences in the chronotolerance of mice for irinotecan, a topoisomerase I inhibitor active against colorectal cancer (Ahowesso et al. 2010; Okyar et al. 2011).

Regional infusions of chronotherapy can also take advantage of the differential circadian organizations of healthy versus cancer tissues in a given organ. Such approach is warranted for the medical treatment of liver metastases from colorectal cancer, since this organ is the main one where colorectal cancer cells metastasize. Hepatic arterial infusion (HAI) is performed following the insertion of a catheter into the hepatic artery in order to selectively deliver drugs into the liver and achieve local high drug concentrations (Bouchahda et al. 2011). Our group was first to concurrently administer irinotecan, 5-FU, and oxaliplatin, the three most active drugs against colorectal cancer, into the hepatic artery of patients with liver metastases from colorectal cancer after the failure of most conventional treatment

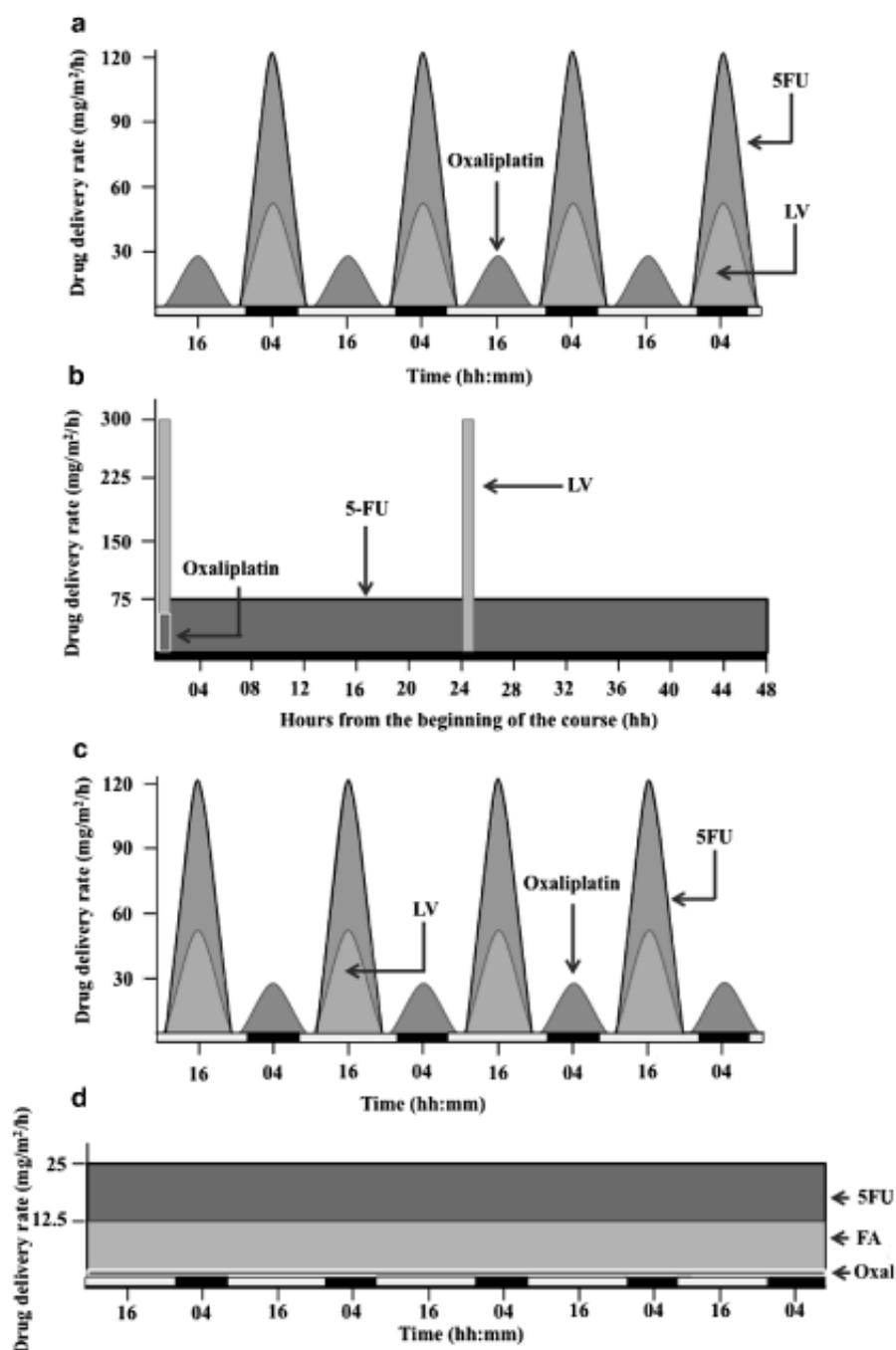


Fig. 4 Combination treatment schedules of metastatic colorectal cancer with 5-fluorouracil (5-FU), leucovorin (LV), and oxaliplatin (a) ChronoFL04. Chronomodulated combination of 5-FU, LV, and oxaliplatin over 4 days, with peak delivery rates programmed at expected times

options. The HAI sinusoidal chronotherapy schedule that we designed proved as safe and effective, with 32 % of the patients displaying an objective tumor shrinkage (Bouchahda et al. 2009). The first European clinical trial of this three-drug HAI regimen has just confirmed the relevance of this approach (OPTILIV, Eudract number 2007-004632-24).

Clinical trials further show that morning radiation therapy tended to cause fewer severe oral mucositis as compared to afternoon radiotherapy in patients with head and neck cancer (Bjarnason et al. 2009). Moreover, the timing of a single high-dose boost of radiations might also be critical for the eradication of brain tumors, as shown in a retrospective study in 58 patients. Thus, morning gamma knife radiosurgery both improved by ~50 % the rate of local tumor control and nearly doubled median survival as compared to afternoon gamma knife radiosurgery (Rahn et al. 2011).

Recent chronochemotherapy findings also challenge the current principle of conventional chemotherapy, where toxicity is considered as a good surrogate endpoint of antitumor efficacy. In other words, the more the toxicity, the better the efficacy! We confirmed this principle in 279 patients with metastatic colorectal cancer receiving conventional chemotherapy with 5-FU, leucovorin, and oxaliplatin (the so-called FOLFOX protocol). Overall survival was significantly predicted by severe neutropenia on FOLFOX. In contrast, severe neutropenia predicted for poor outcome in the 277 patients receiving chronotherapy with the same three drugs (Innominato et al. 2011) (Table 2). Taken together, the clinical chronotherapy data show the relevance of circadian timing of cancer treatments. They confirm the critical role of chronotolerance for chronoefficacy. They further pinpoint the need for tailoring chronomodulated drug delivery schedules according to sex, circadian physiology, and genetic background (Fig. 5).

5 Toward Personalized Cancer Chronotherapy

Chronotolerance and chronoefficacy have been thoroughly investigated in selected mouse strains, in order to minimize intersubject variability. Although two unrelated humans share about 99.99 % of their DNA sequences, the remaining 0.1 % varies and accounts for a large part of intersubject differences in disease risk and drug

Fig. 4 (continued) of least toxicity and best efficacy. The initial version of this reference schedule was administered over 5 days (chronoFLO5) (b) FOLFOX2. Conventional combination of these drugs administered without taking circadian timing into account. The only time specifications consist in the sequential timing of oxaliplatin, LV, and 5-FU infusion over the 2 days of the treatment course, while effective start of treatment course depends upon hospital routine organization (c) Shifted ChronoFLO4. The peaks in drug delivery rate of each drug are shifted by 12 h with respect to the reference schedule (ChronoFLO4 in panel a) (d) Constant-rate equidose infusional schedule of 5-FU-LV and oxaliplatin over 5 days. This schedule served as control in a randomized comparison with chronoFLO5

Table 2 Relationship between the incidence of neutropenia (CTC-AE v3) and its prognostic value

Neutropenia		FOLFOX2	ChronoFLO4
None (G0)	% of patients	39.4	67.4
	Median Overall Survival (months)	12.5	19.4
Severe (G3-4)	% of patients	24.7	6.5
	Median Overall Survival (months)	20.7	13.7

Conventional chemotherapy considers that the worse the toxicity experienced by the patient, the better the overall survival. However, this concept seems wrong for chronotherapy, where better survival rates are found among patients who do not experience toxicity. Shaded areas indicate the best survival for each protocol

response. This especially applies to the responses of host and cancer to a given treatment regimen.

The characteristics of the human circadian timing system can also differ according to the individual person. Thus, the timing of several circadian rhythms varied among individuals (Kerkhof and Van Dongen 1996). These changes were commonly related to gender, age, or chronotype (Roenneberg et al. 2007a). Chronotype is defined as the preference to develop our daily routines during the first half of the day (morning types or "larks") or during the second half of the day (evening types or "owls") (Vink et al. 2001). The Munich Chronotype Questionnaire has been used to assess the chronotype in ~55,000 people worldwide (Roenneberg et al. 2007a; for a review see Roenneberg et al. 2013). This epidemiologic study has revealed chronotype differences according to age, gender, and geographical locations, but not ethnicity (Adan and Natale 2002; Roenneberg et al. 2004, 2007a, b; Paine et al. 2006). The "larks" usually display phase-advanced circadian rhythms in rest-activity, body temperature, and melatonin and cortisol secretions as compared to the "owls" (Duffy et al. 1999; Kerkhof and Van Dongen 1996). These interindividual differences in circadian physiology phase seem to translate at the molecular clock level (Cermakian and Boivin 2003). In addition, the endogenous free running circadian period was reported to be shorter in females as compared to males (Duffy et al. 2011).

Indeed striking gender-related differences were found with regard to both tolerability and efficacy of a fixed chronotherapy delivery schedule of oxaliplatin-5-fluorouracil-leucovorin, which proved adequate in men but not in women with metastatic colorectal cancer (Giacchetti et al. 2006, 2012; Lévi et al. 2007b). Moreover, the rhythmic expression of nearly 2,000 genes in the oral mucosa differed between healthy male and female human subjects, with a different timing for many clock-controlled genes relevant for drug metabolism and cellular proliferation (Bjarnason et al. 2001). Besides, several drug metabolism pathways

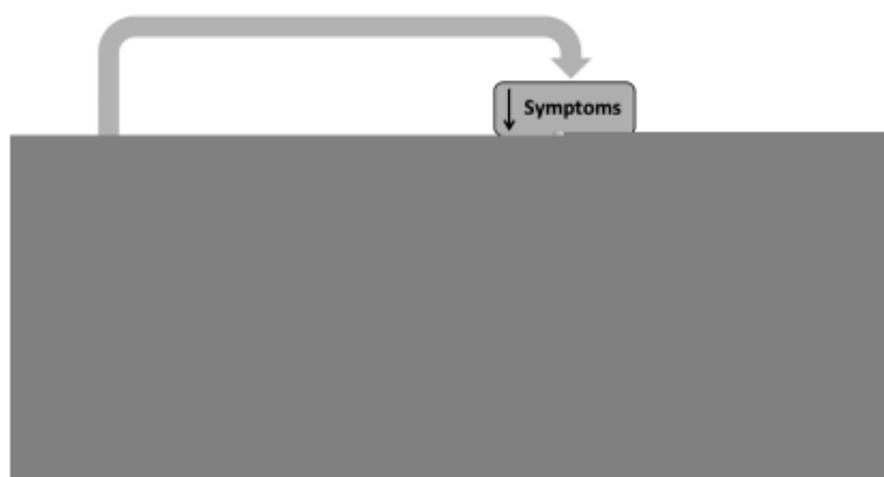


Fig. 5 Theoretical advantages of circadian-based chronotherapy for tolerability, quality of life, and survival The administration of anticancer agents at their adequate timing and safe dose contributes on the one hand to the shrinkage of the tumor burden and on the other hand to a decrease in the side effects of treatment. As a result, patients experience fewer symptoms and display less healthy tissue damage. Altogether, the quality of life of these patients is improved, and this can translate into a favorable impact on overall survival

display strong gender differences (Wang and Huang 2007). Thus, taking full advantage of cancer chronotherapy requires systematic data regarding cancer chronotherapeutics at a molecular level and relevant information regarding the circadian timing system of the individual cancer patient. A systems biology approach to cancer chronotherapeutics currently aims at the development of personalized cancer chronotherapeutics, through the integration of mathematical modeling within research regarding both *in vitro* and *in vivo* chronopharmacology and circadian biomarkers.

5.1 Mathematical Modeling of Chronotherapy Schedules

A combined experimental and mathematical approach has been undertaken in order to propose chronotherapy delivery schedules adapted to the patient genetic and circadian profile (for a review on mathematical modeling of circadian clocks, see Boryugov et al. 2013). A first step involves the design of a mathematical model of chronotherapeutics and its calibration to experimental data. Once the qualitative and quantitative accuracy of the mathematical models is established, optimization procedures are applied in order to define theoretically optimal chronotherapy schedules, which need to be experimentally validated (Fig. 6).

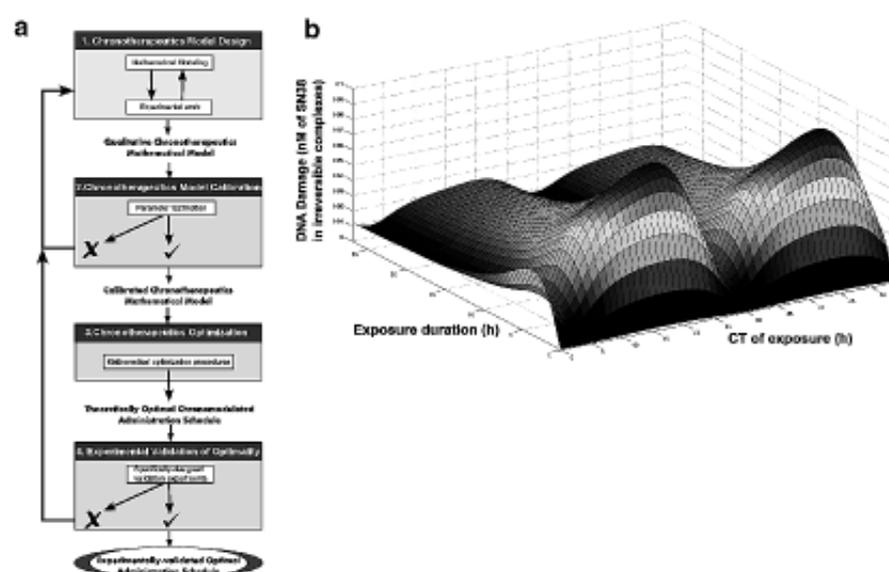


Fig. 6 A combined biological and mathematical approach for chronotherapeutics optimization. (a) Chronotherapeutics mathematical models are designed to qualitatively reproduce biological facts as a first step. Then model parameters are estimated by quantitatively confronting the model to experimental data. The calibrated mathematical model is then used in optimization procedures which aim at designing theoretically optimal chronomodulated administration schemes. The final step is the experimental validation of these schemes. (b) Simulated toxicity of irinotecan in synchronized Caco-2 cells as a function of drug exposure duration and Circadian Timing of exposure onset (CT). In this mathematical model, toxicity is evaluated by DNA damage on healthy cells. Theoretical exposure schemes consist of the exposure to a fixed cumulative dose of irinotecan, starting at the indicated CT, during the indicated exposure duration, at an initial concentration equal to the cumulative dose divided by the exposure duration. Here, the cumulative dose was set at 500 $\mu\text{M}/\text{h}$

5.1.1 Model Design and Calibration of Circadian Control of Cell Proliferation

In the perspective of modeling cancer chronotherapeutics, the first step is to design models of cell proliferation in the absence of anticancer drugs. Those models include the drug targets, which mainly consist in cell death and cell cycle phase transitions and involve the circadian control of these processes. Models can relate to different scales ranging from single-cell level, where molecular details are in focus, to tissue level, where the model describes the behavior of a cell population.

Molecular models of the cellular circadian clock have been developed since 1965 and have described the interactions between clock genes, which are interconnected in regulatory loops (Goodwin 1965; Mellow et al. 2003). More recent works have focused on the mammalian molecular circadian clock and have taken into account the interplay between clock gene transcription, regulatory effects

of clock proteins, and posttranslational regulations (Leloup and Goldbeter 2003; Leloup et al. 1999; Forger et al. 2003; Relógio et al. 2011). These models have allowed a better understanding of the clock molecular mechanisms especially through clock gene knockout modeling.

Molecular interactions between the circadian clock and the cell cycle through the circadian control of Wee1 and p21 have been mathematically studied using ordinary differential equations (ODEs)-based models (de Maria et al. 2009; Calzone and Soliman 2006; Gérard and Goldbeter 2009). The influence of circadian clock genes knockouts, such as those of Period, Cryptochrome, and Bmal1, on the cell cycle has been studied to further validate the models (de Maria et al. 2009). The converse influence, from cell cycle determinants toward the circadian clock, is still under study. This hypothesis, starting from the remark that transcription is uniformly inhibited during mitosis, has been mathematically explored in a recently published model (Kang et al. 2008).

Several approaches have been undertaken to model cell proliferation and its circadian control at a population scale (Billy et al. 2012). Firstly, physiologically based Partial Differential Equations (PDEs) have been designed in order to describe the fate of cell populations in each phase of the cell cycle (quiescent G₀, or proliferating G₁, S, G₂, M) taking into account the circadian control of death rates and cell cycle phase transitions. Those models enable a theoretical study of cell proliferation. Then, starting from these PDE-based models and with additional assumptions, delay differential equations can also be derived to model circadian-controlled cell proliferation (Foley and Mackey 2009; Bernard et al. 2010). An alternative approach involves agent-based models in which the fate of each cell is computed separately by assuming rules that govern cellular behavior (Altinok et al. 2007; Lévi et al. 2008). Such rules may also include stochastic effects to account for the variability between cells. Those models usually assume high computational cost and do not allow theoretical mathematical analyses.

5.1.2 Mode Design and Calibration: Adding Molecular Chronopharmacokinetics–Chronopharmacodynamics of Anticancer Drugs

A simple statement indicates that pharmacokinetics (PK) is the study of what the body does to the drug (e.g., metabolism, transport), whereas pharmacodynamics (PD) is the study of what the drug does to the body (drug toxicity/efficacy). Circadian rhythms in anticancer drug PK/PD infer from circadian variations of the expression of involved genes. Therefore, in the perspective of optimizing anticancer drug circadian delivery, mechanistic models at the molecular level are required.

Chrono-PK–PD models at the level of a single cell or cell population have been designed for three anticancer drugs in clinical use for colorectal cancer treatment: 5-fluorouracil (Lévi et al. 2010), oxaliplatin (Basdevant et al. 2005; Clairambault 2007), and irinotecan (Ballesta et al. 2011). Those ODE-based molecular models compute the fate of the drug in the intracellular compartment and involve kinetics

parameters that have to be fitted to experimental data measured in the studied biological system (Ballesta et al. 2011). The calibrated models can then be used to optimize the chronomodulated exposure of a cell population to a given anticancer drug. They also allow the integration of relevant polymorphisms in clock and/or drug metabolism genes through the modification of corresponding parameter value.

The subsequent step is the whole-body modeling in order to optimize chronomodulated drug administration and not only exposure. The whole-body models take into account the drug interaction with the entire organism (Tozer and Rowland 2006). They aim at modeling the drug fate from its infusion in the general circulation, to its possible hepatic detoxification, until its delivery to peripheral cells and their response to drug exposure. Hence, such models are generally composed of a blood compartment, a liver one, compartments for the main toxicity targets of the studied drug, and a tumor compartment when relevant. In the perspective of chronotherapeutics optimization, each compartment may contain a model of the intracellular drug chrono-PK–PD. Models of whole-body PK–PD have been proposed for irinotecan (Ballesta et al. 2011) and 5-fluorouracil (Tsukamoto et al. 2001).

The design and parameterization of such models can be done using data in preclinical models such as mouse or rats in which tissue drug concentrations are measured. Indeed, blood concentrations may not vary much with the administration circadian time, whereas tissue concentrations can be highly modified and can play a critical part in the drug chrono-PK–chrono-PD (Ahowesso et al. 2010). A rescaling for cancer patients is needed in which the structure of the model is kept but the parameter values are adapted. The clinical perspective includes the determination of a set of parameters for each patient or class of patients. Then the use of optimization algorithms on this specifically calibrated model allows the design of patient-tailored chronomodulated administration scheme.

In addition to help optimizing drug administration, those models also enable the study of circadian rhythms of proteins that are involved into chrono-PK–PD. This can be relevant in the search of molecular biomarkers that would discriminate between several chronotoxicity classes of mice or of patients (Lévi et al. 2010).

5.1.3 Chronotherapeutics Optimization

In order to efficiently optimize treatment, one should take into account both toxicity, which is here defined as the drug activity on healthy cells, and efficacy, which stands for the drug activity on cancer cells. Therefore, the model should consider at least two compartments, respectively, corresponding to healthy and cancer cells. We described each compartment with the same mathematical model, but with a different parameter set for its calibration. This actually mimics biology, as cancer cells derive from healthy cells and display genetic mutations and epigenetic alterations that speed up or slow down specific molecular pathways. These alterations are thus modeled by an increase or decrease in the corresponding parameter values. For chronotherapeutics optimization, a possible difference

between normal and cancer cells is the disruption of circadian rhythms in the tumor tissue (Ballesta et al. 2011).

Then the therapeutic strategy to be undertaken should be decided. A realistic and clinically relevant strategy consists in maximizing efficacy on cancer cells under the constraint of a maximal allowed toxicity on healthy tissues. The several possible therapeutics strategies can be implemented according to mathematical optimization procedures (Basdevant et al. 2005; Clairambault 2007; Ballesta et al. 2011).

5.2 Circadian Timing System Assessment in Cancer Patients

Minimally or noninvasive procedures represent a critical specification for the determination of the circadian timing system in cancer patients. Nonetheless, the techniques and methods must be safe, reliable, and provide high-quality and informative data about the patient's clocks and their coordination. Whenever circadian physiology is concerned, frequent sampling over several days has been advocated and used in order to provide an insight into the circadian timing system of a patient. These methods include the following:

5.2.1 Rest–Activity Monitoring Through Actimetry

Actimetry was first proposed as the method of choice for reliably, comfortably, and continuously recording the rest–activity rhythm of cancer patients, through a wristwatch accelerometer (Mormont et al. 2000). An adequate definition of its rhythmic characteristics requires two or three 24-h span (Mormont et al. 2000; Ancoli-Israel et al. 2003; Berger et al. 2007), yet our group is currently emphasizing the need for a 1 week monitoring span in order to provide a more reliable assessment of the circadian period and its related parameters. The rest–activity pattern can differ largely among cancer patients with metastatic colorectal, breast, or lung cancer (Mormont et al. 2000; Grutsch et al. 2011; Ancoli-Israel et al. 2001; Innominato et al. 2009). Clinically relevant interpatient differences are best recapitulated in the dichotomy index $I < O$, a relative measure of the activity in bed versus out of bed (Mormont et al. 2000). Indeed $I < O$ identified circadian disruption and was an independent robust predictor of long-term survival outcome in three cohorts of 436 patients with metastatic colorectal cancer (Mormont et al. 2000; Innominato et al. 2009; Levi 2012). Moreover, $I < O$ also identified circadian disruption in patients receiving chemotherapy, and it was also an independent prognostic factor of survival in such condition (Lévi et al. 2010; Innominato et al. 2012).

5.2.2 Body Temperature Monitoring

Body temperature is both a biomarker of the circadian timing system whose pattern is generated by the suprachiasmatic nuclei and an effector of the circadian coordination of peripheral clocks, through the involvement of heat shock and cold-induced proteins (Buhr et al. 2010; see also Buhr and Takahashi 2013). In mice, the circadian amplification of the core body temperature rhythm through meal timing was associated with halving experimental cancer growth (Li et al. 2010). The peak time in core body temperature can further serve as an internal circadian reference for the delivery of chronomodulated cancer therapy (Lévi et al. 2010). Finally, the circadian rhythm in core body temperature can be maintained or disrupted according to both dose and circadian timing of anticancer drugs in mice (Li et al. 2002; Ahowesso et al. 2011).

The core body temperature rhythm has been first determined using a rectal probe eventually connected to an external recorder (Waterhouse et al. 2005; Kräuchi 2002). High values usually occur in the late afternoon while the nadir is reached at late night (Waterhouse et al. 2005). However, this system is neither safe nor convenient for assessing the rhythms in ambulatory cancer patients. In contrast, skin surface temperature can be assessed noninvasively using a radial temperature sensor or skin surface temperature patches (Sarabia et al. 2008; Ortiz-Tudela et al. 2010; Scully et al. 2011). Skin surface temperature patterns are usually opposite to that in core body temperature: the highest point occurs at early night and the lowest point in the early morning, near awakening (Sarabia et al. 2008). Circadian patterns in skin surface temperature, as measured with a thermosensor localized above the radial artery, were determined, together with rest–activity and position patterns, over 7 days in fully ambulatory healthy subjects. The combination of these three biomarkers enabled the computation of an integrated variable called TAP for Temperature–Activity–Position. TAP displayed enhanced stability as compared to each of the three parameters taken separately, thus could best estimate the circadian timing system in real-life conditions and in cancer patients (Ortiz-Tudela et al. 2010). The use of multiple dermal patches on the upper thorax together with rest–activity monitoring also provides relevant information regarding circadian robustness and timing both at baseline and during chemotherapy delivery (Scully et al. 2011; Costa et al. 2013). Finally, a new technology development aims at embedding a telemetry temperature sensor into an implanted vascular access port that is currently used to administer chemotherapy (Beau et al. 2009).

5.2.3 Hormonal Patterns

Cortisol and melatonin rhythms have long been considered as the most robust circadian biomarkers (Veldhuis et al. 1990; Van Someren and Nagtegaal 2007; for a review see Kalsbeek and Fliers 2013). Melatonin secretion usually peaks at early night and it is strongly inhibited by light in humans (Hardeland et al. 2011).

In contrast, cortisol secretion peaks around the waking hours, with lowest values at early night (Clow et al. 2010). Free cortisol can be determined in saliva, so that the 24-h pattern in cortisol secretion can be estimated using salivary samples (Touitou et al. 2009; Mormont et al. 1998). The disruption of the salivary cortisol pattern was found to be an independent prognostic factor for the survival of patients with metastatic breast cancer as well as ovarian and lung cancer (Sephton et al. 2000; Abercrombie et al. 2004). However, no such relation was found for patients with metastatic colorectal cancer (Mormont et al. 2002), indicating a possible cancer specificity of the most relevant circadian biomarkers.

6 Conclusions and Perspectives

Until recently, most efforts in the development of anticancer treatments and strategies have focused on the eradication of cancer cells without paying much attention to the host. The main therapeutic objectives have involved attempts to prevent or impair cell division and/or angiogenesis and/or to induce apoptosis in cancer cells. However, our recent understanding of cancer processes is highlighting a critical role for the tumor microenvironment, thus putting important emphasis on the host cells that infiltrate tumors and surround cancer cells (Hanahan and Weinberg 2011).

Indeed, cancer chronotherapeutics has revealed the major role of circadian timing for both chronotolerance and chronoefficacy. A striking principle is the usual coincidence of chronotolerance and chronoefficacy, which is contrary to the principles that rule conventional cancer treatments. Chronotherapeutics thus allow the design of a new strategy aiming at jointly enhancing host tolerability and antitumor efficacy, through the proper dosing and timing of anticancer medications. Such objective requires thorough consideration to gender, since male and female mice as well as cancer patients can respond differently to the same chronotherapy schedule (Giacchetti et al. 2006, 2012; Lévi et al. 2007b; Ahowesso et al. 2011; Okyar et al. 2011).

Both experimental and clinical data support the relevance of a robust circadian timing system in order to enhance both host control of cancer progression and treatment tolerability. Thus, circadian disruption was shown to accelerate cancer progression in experimental models, and it was an independent prognostic factor of survival in patients with different cancer types and stages (Mormont et al. 2000; Sephton et al. 2000; Innominato et al. 2009). However, treatment itself is able to alter the circadian timing system and this may also convey independent prognostic information regarding the survival of the patient (Ortiz-Tudela et al. 2011; Berger et al. 2010; Savard et al. 2009; Innominato et al. 2012). These data indicate the need to minimize circadian disruption in order to improve chronotherapy efficacy.

Thus, reliable and noninvasive circadian biomarkers, such as those provided with rest-activity and temperature monitoring, are required in the perspective of taking full advantage of the circadian timing system for optimizing cancer treatments.

Biomarkers should provide the quantitative circadian and metabolism data required for adjusting theoretical drug delivery schedules to the individual patient. Large progress has been made in the development of mathematical modeling approaches and their applications to cancer chronotherapeutics. Thus, theoretical models integrate the circadian control of drug metabolism and transport, DNA damage, DNA repair, cell cycle and apoptosis, as well as drug effects on them, based on tight interactions between *in vitro*, *in silico*, and *in vivo* studies, according to systems biology methodology. Recent chronotherapy delivery models can further address issues related to combination chronochemotherapy and treatment strategies. Chronobiotics such as bright light, melatonin, hydrocortisone, meal timing, sleep hygiene, and physical and social activity could further strengthen and/or re-synchronize the circadian timing system (Ancoli-Israel et al. 2011; Seely et al. 2011).

Safety was emphasized as being the major issue that prevents more productive drug development to fight cancer. This chapter shows that chronotherapeutics is critical for jointly improving the safety and the efficacy of anticancer drugs. Indeed, *in vitro*, *in silico*, and *in vivo* models allow a coordinated chronotherapeutic development. Recent technologies now enable the noninvasive recording of circadian biomarkers and the multidimensional assessment of the circadian timing system in an individual patient, while dedicated drug delivery devices or systems can accommodate model-based personalized chronotherapy schedules.

References

- Abercrombie HC, Giese-Davis J, Sephton S et al (2004) Flattened cortisol rhythms in metastatic breast cancer patients. *Psychoneuroendocrinology* 29(8):1082–92
- Adan A, Natale V (2002) Gender differences in morningness–eveningness preference. *Chronobiol Int* 19(4):709–20
- Ahowesso C, Piccolo E, Li XM et al (2010) Relations between strain and gender dependencies of irinotecan toxicity and UGT1A1, CES2 and TOP1 expressions in mice. *Toxicol Lett* 192(3):395–401
- Ahowesso C, Li XM, Zampera S et al (2011) Sex and dosing-time dependencies in irinotecan-induced circadian disruption. *Chronobiol Int* 28(5):458–70
- Altinok A, Levi F, Goldbeter A (2007) A cell cycle automaton model for probing circadian patterns of anticancer drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 59:1036–53
- Ancoli-Israel S, Moore PJ, Jones V (2001) The relationship between fatigue and sleep in cancer patients: a review. *Eur J Cancer Care* 10(4):245–55
- Ancoli-Israel S, Cole R, Alessi C (2003) The role of actigraphy in the study of sleep and circadian rhythms. *Sleep* 26(3):342–92
- Ancoli-Israel S, Rissling M, Neikrug A et al (2011) Light treatment prevents fatigue in women undergoing chemotherapy for breast cancer. *Support Care Cancer* 20(6):1211–9
- Antoch MP, Kondratov RV (2013) Pharmacological modulators of the circadian clock as potential therapeutic drugs: Focus on genotoxic/anticancer therapy. In: Kramer A, Meroz M (eds) *Circadian clocks*, vol 217, *Handbook of experimental pharmacology*. Springer, Heidelberg

- Ballesta A, Dulong S, Abbara C et al (2011) A combined experimental and mathematical approach for molecular-based optimization of irinotecan circadian delivery. *PLoS Comput Biol* 7(9): e1002143
- Barsevick A, Frost M, Zwiderman A et al (2010) I'm so tired: biological and genetic mechanisms of cancer-related fatigue. *Qual Life Res* 19(10):1419–27
- Basdevant C, Clairambault J, Lévi F (2005) Optimisation of time-scheduled regimen for anti-cancer drug infusion. *ESAIM Math Model Numer Anal* 39(6):1069–1086
- Beau J, Innominate PF, Carnino S, Lévi F (2009) An implanted device for the adjustment of cancer chronotherapeutics to the patient's circadian timing system. In: XI Congress of the European Biological Rhythms Society, Strasbourg, France, 22–28 Aug 2009
- Berger AM, Farr LA, Kuhn BR et al (2007) Values of sleep/wake, activity/rest, circadian rhythms, and fatigue prior to adjuvant breast cancer chemotherapy. *J Pain Symptom Manage* 33(4):398–409
- Berger AM, Grem JL, Visovsky C et al (2010) Fatigue and other variables during adjuvant chemotherapy for colon and rectal cancer. *Oncol Nurs Forum* 37(6):E359–69
- Bernard S, Cajavec Bernard B et al (2010) Tumour growth rate determines the timing of optimal chronomodulated treatment schedules. *PLoS Comput Biol* 3:1000712
- Billy F, Clairambault J, Fercoq O (2012) Optimisation of cancer drug treatments using cell population dynamics. In: Friedman A, Kashdan E, Ledzewicz U, Schättler H (eds) *Mathematical methods and models in biomedicine*. Springer, New York, pp 257–299
- Bjarnason GA, Jordan RC, Wood PA et al (2001) Circadian expression of clock genes in human oral mucosa and skin: association with specific cell-cycle phases. *Am J Pathol* 158(5):1793–801
- Bjarnason GA, Mackenzie RG, Nabid A et al (2009) Comparison of toxicity associated with early morning versus late afternoon radiotherapy in patients with head-and-neck cancer: a prospective randomized trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (HN3). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 73(1):166–72
- Bordyugov G, Westermark PO, Korencic A, Bernard S, Herzel H (2013) Mathematical modeling in chronobiology. In: Kramer A, Mrosovsky M (eds) *Circadian clocks*, vol 217, *Handbook of experimental pharmacology*. Springer, Heidelberg
- Bouchahda M, Adam R, Giacchetti S et al (2009) Rescue chemotherapy using multidrug chronomodulated hepatic arterial infusion for patients with heavily pretreated metastatic colorectal cancer. *Cancer* 115(21):4990–9
- Bouchahda M, Lévi F, Adam R et al (2011) Modern insights into hepatic arterial infusion for liver metastases from colorectal cancer. *Eur J Cancer* 47(18):2681–90
- Boughattas NA, Lévi F, Fournier C et al (1989) Circadian rhythm in toxicities and tissue uptake of 1,2-diamminocyclohexane(trans-1)oxalatoplatinum(II) in mice. *Cancer Res* 49(12):3362–8
- Buhr ED, Takahashi JS (2013) Molecular components of the mammalian circadian clock. In: Kramer A, Mrosovsky M (eds) *Circadian clocks*, vol 217, *Handbook of experimental pharmacology*. Springer, Heidelberg
- Buhr ED, Yoo SH, Takahashi JS (2010) Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. *Science* 330(6002):379–85
- Calogiuri G, Weydahl A, Carandente F (2011) Methodological issues for studying the rest-activity cycle and sleep disturbances: a chronobiological approach using actigraphy data. *Biol Res Nurs* 15(1):5–12
- Calzone L, Soliman S (2006) Coupling the cell cycle and the circadian cycle. INRIA internal research report #5835. INRIA, Rocquencourt
- Caussanel JP, Lévi F, Brienza S et al (1990) Phase I trial of 5-day continuous venous infusion of oxaliplatin at circadian rhythm-modulated rate compared with constant rate. *J Natl Cancer Inst* 82(12):1046–50
- Cermakian N, Boivin DB (2003) A molecular perspective of human circadian rhythm disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 42:204–20

- Chen ST, Choo KB, Hou MF et al (2005) Deregulated expression of the PER1, PER2 and PER3 genes in breast cancers. *Carcinogenesis* 26(7):1241–6
- Chu LW, Zhu Y, Yu K et al (2008) Variants in circadian genes and prostate cancer risk: a population-based study in China. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 4:342–8
- Clairambault J (2007) Modeling oxaliplatin drug delivery to circadian rhythms in drug metabolism and host tolerance. *Adv Drug Deliv Rev* 59(9–10):1054–68
- Clow A, Hucklebridge F, Thorn L (2010) The cortisol awakening response in context. *Int Rev Neurobiol* 93:153–75
- Costa MJ, Finkenstädt BF, Gould PD et al (2013) Inference on periodicity of circadian time series. *Biostatistics* (in press)
- de Gramont A, Vignoud J, Tournigand C et al (1997) Oxaliplatin with high-dose leucovorin and 5-fluorouracil 48-hour continuous infusion in pretreated metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer* 33(2):214–9
- de Maria E, Fages F, Soliman S (2009) INRIA research report, 7064. INRIA, Rocquencourt
- Duffy JF, Dijk DJ, Hall EF et al (1999) Relationship of endogenous circadian melatonin and temperature rhythms to self-reported preference for morning or evening activity in young and older people. *J Invest Med* 47:141–50
- Duffy JF, Cain SW, Chang AM et al (2011) Sex difference in the near-24-hour intrinsic period of the human circadian timing system. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(Suppl 3):15602–8
- Eisele L, Prinz R, Klein-Hitpass L et al (2009) Combined PER2 and CRY1 expression predicts outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol* 83(4):320–7
- Etienne-Grimaldi MC, Cardot JM, François E et al (2008) Chronopharmacokinetics of oral tegafur and uracil in colorectal cancer patients. *Clin Pharmacol Ther* 83(3):413–5
- Filipski E, King VM, Li X et al (2002) Host circadian clock as a control point in tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 94(9):690–7
- Filipski E, Delaunay F, King VM et al (2004) Effects of chronic jet lag on tumor progression in mice. *Cancer Res* 64(21):7879–85
- Filipski E, Innominato PF, Wu M et al (2005) Effects of light and food schedules on liver and tumor molecular clocks in mice. *J Natl Cancer Inst* 97(7):507–17
- Filipski E, Li XM, Lévi F (2006) Disruption of circadian coordination and malignant growth. *Cancer Causes Control* 17(4):509–14
- Focan C, Denis B, Kreutz F et al (1995) Ambulatory chronotherapy with 5-fluorouracil, folinic acid, and carboplatin for advanced non-small cell lung cancer. A phase II feasibility trial. *J Infus Chemother* 5(3 Suppl 1):148–52
- Foley C, Mackey MC (2009) Dynamic hematological disease: a review. *J Math Biol* 58(1–2):285–322
- Forger DB, Dean DA 2nd, Gurdziel K et al (2003) Development and validation of computational models for mammalian circadian oscillators. *OMICS* 4:387–400
- Fu L, Lee CC (2003) The circadian clock: pacemaker and tumour suppressor. *Nat Rev Cancer* 3(5):350–61
- Fu L, Pelicano H, Liu J et al (2002) The circadian gene *Period2* plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *Cell* 111(1):41–50
- Gérard C, Goldbeter A (2009) Temporal self-organization of the cyclin/Cdk network driving the mammalian cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(51):21643–8
- Gery S, Gombart AF, Yi WS et al (2005) Transcription profiling of C/EBP targets identifies *Per2* as a gene implicated in myeloid leukemia. *Blood* 106(8):2827–36
- Gery S, Komatsu N, Baldjyan L et al (2006) The circadian gene *per1* plays an important role in cell growth and DNA damage control in human cancer cells. *Mol Cell* 22(3):375–82
- Giacchetti S, Bjarnason G, Garufi C et al (2006) European Organisation for Research and Treatment of Cancer Chronotherapy Group. Phase III trial comparing 4-day chronomodulated therapy versus 2-day conventional delivery of fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin as first-line chemotherapy of metastatic colorectal cancer: the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Chronotherapy Group. *J Clin Oncol* 24(22):3562–9

- Giacchetti S, Dugué PA, Innominato PF et al (2012) Sex moderates circadian chemotherapy effects on survival of patients with metastatic colorectal cancer: a meta-analysis. *Ann Oncol* 23(12):3110–3116
- Goodwin BC (1965) Oscillatory behavior in enzymatic control processes. In: Weber G (ed) *Advances in enzyme regulation*, vol 3. Pergamon, Oxford, pp 425–438
- Gorbacheva VY, Kondratov RV, Zhang R et al (2005) Circadian sensitivity to the chemotherapeutic agent cyclophosphamide depends on the functional status of the CLOCK/BMAL1 transactivation complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(9):3407–12
- Granda TG, Liu XH, Smaaland R et al (2005) Circadian regulation of cell cycle and apoptosis proteins in mouse bone marrow and tumor. *FASEB J* 19(2):304–6
- Grutsch JF, Wood PA, Du-Quito J et al (2011) Validation of actigraphy to assess circadian organization and sleep quality in patients with advanced lung cancer. *J Circadian Rhythms* 9:4
- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5):646–74
- Hardeland R, Madrid JA, Tan DX et al (2011) Melatonin, the circadian multioscillator system and health: the need for detailed analyses of peripheral melatonin signaling. *J Pineal Res*. doi:10.1111/j.1600-079X.2011.00934.x
- Hastings MH, Reddy AB, Maywood ES (2003) A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 4(8):649–61
- Haus E (2002) Chronobiology of the mammalian response to ionizing radiation. Potential applications in oncology. *Chronobiol Int* 19(1):77–100
- Hoffman AE, Zheng T, Stevens RG et al (2009) Clock-cancer connection in non-Hodgkin's lymphoma: a genetic association study and pathway analysis of the circadian gene cryptochrome 2. *Cancer Res* 69(8):3605–13
- Hrushesky WJ (1985) Circadian timing of cancer chemotherapy. *Science* 228(4695):73–5
- Huang W, Ramsey KM, Marcheva B et al (2011) Circadian rhythms, sleep, and metabolism. *J Clin Invest* 121(6):2133–41
- Hunt T, Sassone-Corsi P et al (2007) Riding tandem: circadian clocks and the cell cycle. *Cell* 129(3):461–4
- Iacobelli S, Innominato PF, Piantelli M et al (2008) Tumor clock protein PER2 as a determinant of survival in patients receiving oxaliplatin-5-FU-leucovorin as first-line chemotherapy for metastatic colorectal cancer. In: 44th Annual meeting of the American Society of Clinical Oncology, Chicago, IL, USA
- Innominato PF, Focan C, Gorlia T et al (2009) Chronotherapy Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. Circadian rhythm in rest and activity: a biological correlate of quality of life and a predictor of survival in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Res* 69(11):4700–7
- Innominato PF, Lévi FA, Bjarnason GA (2010) Chronotherapy and the molecular clock: clinical implications in oncology. *Adv Drug Deliv Rev* 62(9–10):979–1001
- Innominato PF, Giacchetti S, Moreau T et al (2011) Prediction of survival by neutropenia according to delivery schedule of oxaliplatin-5-Fluorouracil-leucovorin for metastatic colorectal cancer in a randomized international trial (EORTC 05963). *Chronobiol Int* 7:586–600
- Innominato PF, Giacchetti S, Bjarnason GA et al (2012) Prediction of overall survival through circadian rest-activity monitoring during chemotherapy for metastatic colorectal cancer. *Int J Cancer* Apr 5. doi:10.1002/ijc.27574
- Kalsbeek A, Fliers E (2013) Daily regulation of hormone profiles. In: Kramer A, Meroz M (eds) *Circadian clocks*, vol 217, *Handbook of experimental pharmacology*. Springer, Heidelberg
- Kang B, Li YY, Chang X et al (2008) Modeling the effects of cell cycle M-phase transcriptional inhibition on circadian oscillation. *PLoS Comput Biol*. doi:10.1371/journal.pcbi.1000019
- Kang TH, Lindsey-Boltz LA, Reardon JT et al (2010) Circadian control of XPA and excision repair of cisplatin-DNA damage by cryptochrome and HERC2 ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(11):4890–5
- Kerkhof GA, Van Dongen HP (1996) Morning-type and evening-type individuals differ in the phase position of their endogenous circadian oscillator. *Neurosci Lett* 218:153–6

- Khapre RV, Samsa WE, Kondratov RV (2010) Circadian regulation of cell cycle: molecular connections between aging and the circadian clock. *Ann Med* 42(6):404–15
- Ko CH, Takahashi JS (2006) Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum Mol Genet* 15(suppl 2):R271–7
- Koyanagi S, Kuramoto Y, Nakagawa H (2003) A molecular mechanism regulating circadian expression of vascular endothelial growth factor in tumor cells. *Cancer Res* 63(21):7277–83
- Kräuchi K (2002) How is the circadian rhythm of core body temperature regulated? *Clin Auton Res* 12(3):147–9
- Lee JH, Sancar A (2011) Circadian clock disruption improves the efficacy of chemotherapy through p73-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(26):10668–72
- Leloup JC, Goldbeter A (2003) Toward a detailed computational model for the mammalian circadian clock. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(12):7051–6
- Leloup JC, Gonze D, Goldbeter A (1999) Limit cycle models for circadian rhythms based on transcriptional regulation in *Drosophila* and *Neurospora*. *J Biol Rhythms* 6:433–448
- Lévi F (2012) Circadian robustness as an independent predictor of prolonged progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) in 436 patients with metastatic colorectal cancer (mCRC). In: Abstract 2012 Gastrointestinal cancers symposium – Category: Cancers of the colon and rectum – Translational research, San Francisco, CA, USA, 19–21 Jan 2012
- Lévi F, Okyar A (2011) Circadian clocks and drug delivery systems: impact and opportunities in chronotherapeutics. *Expert Opin Drug Deliv* 8(12):1535–41
- Lévi F, Schibler U (2007) Circadian rhythms: mechanisms and therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47:593–628
- Lévi F, Altinok A, Clairambault J et al (2008) Implications of circadian clocks for the rhythmic delivery of cancer therapeutics. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* 366:3575–98
- Lévi F, Benavides M, Chevèle C et al (1990) Chemotherapy of advanced ovarian cancer with 4^β-O-tetrahydropyranil doxorubicin and cisplatin: a randomized phase II trial with an evaluation of circadian timing and dose-intensity. *J Clin Oncol* 8(4):705–14
- Lévi F, Misset JL, Brienza S et al (1992) A chronopharmacologic phase II clinical trial with 5-fluorouracil, folinic acid, and oxaliplatin using an ambulatory multichannel programmable pump. High antitumor effectiveness against metastatic colorectal cancer. *Cancer* 69(4):893–900
- Lévi F, Perpoint B, Garufi C et al (1993) Oxaliplatin activity against metastatic colorectal cancer. A phase II study of 5-day continuous venous infusion at circadian rhythm modulated rate. *Eur J Cancer* 29A(9):1280–4
- Lévi FA, Zidani R, Vannetzel JM et al (1994) Chronomodulated versus fixed-infusion-rate delivery of ambulatory chemotherapy with oxaliplatin, fluorouracil, and folinic acid (leucovorin) in patients with colorectal cancer metastases: a randomized multi-institutional trial. *J Natl Cancer Inst* 86(21):1608–17
- Lévi F, Zidani R, Misset JL (1997) Randomised multicentre trial of chronotherapy with oxaliplatin, fluorouracil, and folinic acid in metastatic colorectal cancer. International Organization for Cancer Chronotherapy. *Lancet* 350(9079):681–6
- Lévi F, Filipski E, Iurisci I et al (2007a) Cross-talks between circadian timing system and cell division cycle determine cancer biology and therapeutics. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 72:465–75
- Lévi F, Focan C, Karaboué A et al (2007b) Implications of circadian clocks for the rhythmic delivery of cancer therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 59(9–10):1015–35
- Lévi F, Okyar A, Dulong S et al (2010) Circadian timing in cancer treatments. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50:377–421
- Li XM, Vincenti M, Lévi F (2002) Pharmacological effects of vinorelbine on body temperature and locomotor activity circadian rhythms in mice. *Chronobiol Int* 19(1):43–55
- Li XM, Delaunay F, Dulong S et al (2010) Cancer inhibition through circadian reprogramming of tumor transcriptome with meal timing. *Cancer Res* 70(8):3351–60

- Martin C, Dutertré-Catella H, Radionoff M et al (2003) Effect of age and photoperiodic conditions on metabolism and oxidative stress related markers at different circadian stages in rat liver and kidney. *Life Sci* 73(3):327–35
- Mazzoccoli G, Panza A, Valvano MR et al (2011) Clock gene expression levels and relationship with clinical and pathological features in colorectal cancer patients. *Chronobiol Int* 28(10):841–51
- Morrow M, Dragovic Z, Tan Y et al (2003) Combining theoretical and experimental approaches to understand the circadian clock. *Chronobiol Int* 20(4):559–575
- Miyamoto N, Izumi H, Noguchi T et al (2008) Tip60 is regulated by circadian transcription factor clock and is involved in cisplatin resistance. *J Biol Chem* 283(26):18218–26
- Mormont MC, Lévi F (1997) Circadian-system alterations during cancer processes: a review. *Int J Cancer* 70(2):241–7
- Mormont MC, Hecquet B, Bogdan A et al (1998) Non-invasive estimation of the circadian rhythm in serum cortisol in patients with ovarian or colorectal cancer. *Int J Cancer* 78(4):421–4
- Mormont MC, Waterhouse J, Bleuzen P et al (2000) Marked 24-h rest/activity rhythms are associated with better quality of life, better response, and longer survival in patients with metastatic colorectal cancer and good performance status. *Clin Cancer Res* 6(8):3038–45
- Mormont MC, Langouët AM, Claustrat B et al (2002) Marker rhythms of circadian system function: a study of patients with metastatic colorectal cancer and good performance status. *Chronobiol Int* 19(1):141–55
- Murakami Y, Higashi Y, Matsunaga N (2008) Circadian clock - controlled intestinal expression of the multidrug-resistance gene *mdr1a* in mice. *Gastroenterology* 135:1636–1644
- O'Neill JS, Reddy AB (2011) Circadian clocks in human red blood cells. *Nature* 469(7331):498–503
- O'Neill JS, van Ooijen G, Dixon LE et al (2011) Circadian rhythms persist without transcription in a eukaryote. *Nature* 469(7331):554–8
- O'Neill JS, Maywood ES, Hastings MH (2013) Cellular mechanisms of circadian pacemaking: beyond transcriptional loops. In: Kramer A, Morrow M (eds) *Circadian clocks*, vol 217, *Handbook of experimental pharmacology*. Springer, Heidelberg
- Oklejewicz M, Destici E, Tamanini F et al (2008) Phase resetting of the mammalian circadian clock by DNA damage. *Curr Biol* 18(4):286–91
- Okyar A, Piccolo E, Ahowesso C et al (2011) Strain- and sex-dependent circadian changes in *abcc2* transporter expression: implications for irinotecan chronotolerance in mouse ileum. *PLoS One* 6(6):e20393
- Ortiz-Tudela E, Martínez-Nicolas A, Campos M (2010) A new integrated variable based on thermometry, actimetry and body position (TAP) to evaluate circadian system status in humans. *PLoS Comput Biol* 6(11):e1000996
- Ortiz-Tudela E, Innominato PF, Iurisci I et al (2011) Chemotherapy-induced disruption of circadian system in cancer patients. In: XII Congress of the European Biological Rhythms Society, Oxford, UK, 20–26 Aug 2011
- Oshima T, Takenoshita S, Akaike M et al (2011) Expression of circadian genes correlates with liver metastasis and outcomes in colorectal cancer. *Oncol Rep* 25(5):1439–46. doi:10.3892/or.2011.1207
- Otálora BB, Madrid JA, Alvarez N et al (2008) Effects of exogenous melatonin and circadian synchronization on tumor progression in melanoma-bearing C57BL6 mice. *J Pineal Res* 44(3):307–15
- Paine SJ, Gander PH, Travier (2006) The epidemiology of morningness/eveningness: influence of age, gender, ethnicity, and socioeconomic factors in adults (30–49 years). *J Biol Rhythms* 21(1):68–76
- Panda S, Hogenesch JB, Kay SA (2002) Circadian rhythms from flies to human. *Nature* 417(6886):329–35

- Qvortrup C, Jensen BV, Fokstuen T et al (2010) A randomized study comparing short-time infusion of oxaliplatin in combination with capecitabine XELOX(30) and chronomodulated XELOX(30) as first-line therapy in patients with advanced colorectal cancer. *Ann Oncol* 21(1):87–91
- Rahn DA 3rd, Ray DK, Schlesinger DJ et al (2011) Gamma knife radiosurgery for brain metastasis of nonsmall cell lung cancer: is there a difference in outcome between morning and afternoon treatment? *Cancer* 117(2):414–20
- Relógio A, Westermark PO, Wallach T et al (2011) Tuning the mammalian circadian clock: robust synergy of two loops. *PLoS Comput Biol* 7(12):e1002309
- Rivard GE, Infante-Rivard C, Dresse MF et al (1993) Circadian time-dependent response of childhood lymphoblastic leukemia to chemotherapy: a long-term follow-up study of survival. *Chronobiol Int* 10(3):201–4
- Roenneberg T, Kuehne T, Pramstaller PP et al (2004) A marker for the end of adolescence. *Curr Biol* 14(24):R1038–9
- Roenneberg T, Kuehne T, Juda M et al (2007a) Epidemiology of the human circadian clock. *Sleep Med Rev* 11(6):429–38
- Roenneberg T, Kumar CJ, Mrosovsky M (2007b) The human circadian clock entrains to sun time. *Curr Biol* 17(2):R44–5
- Roenneberg T, Kantermann T, Juda M, Vetter C, Allebrandt KV (2013) Light and the human circadian clock. In: Kramer A, Mrosovsky M (eds) *Circadian clocks*, vol 217, *Handbook of experimental pharmacology*. Springer, Heidelberg
- Sarabia JA, Rol MA, Mendiola P et al (2008) Circadian rhythm of wrist temperature in normal-living subjects. A candidate of new index of the circadian system. *Physiol Behav* 95(4):570–80
- Savard J, Liu L, Natarajan L et al (2009) Breast cancer patients have progressively impaired sleep-wake activity rhythms during chemotherapy. *Sleep* 32(9):1155–60
- Scully CG, Karaboué A, Liu WM et al (2011) Skin surface temperature rhythms as potential circadian biomarkers for personalized chronotherapeutics in cancer patients. *Interface Focus* 1:48–60
- Seely D, Wu P, Fritz H et al (2011) Melatonin as adjuvant cancer care with and without chemotherapy: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Integr Cancer Ther* 11(4):293–303
- Sephton SE, Sapolsky RM, Kraemer HC et al (2000) Diurnal cortisol rhythm as a predictor of breast cancer survival. *J Natl Cancer Inst* 92(12):994–1000
- Smaaland R, Sothorn RB, Laerum OD et al (2002) Rhythms in human bone marrow and blood cells. *Chronobiol Int* 19(1):101–27
- Spies CM, Cutolo M, Straub RH et al (2011) Prednisone chronotherapy. *Clin Exp Rheumatol* 29(5 Suppl 68):S42–5
- Storch KF, Lipan O, Leykin I et al (2002) Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature* 417(6884):78–83
- Tampellini M, Filipinski E, Liu XH et al (1998) Docetaxel chronopharmacology in mice. *Cancer Res* 58(17):3896–904
- Tokunaga H, Takebayashi Y, Utsunomiya H et al (2008) Clinicopathological significance of circadian rhythm-related gene expression levels in patients with epithelial ovarian cancer. *Acta Obstet Gynecol Scand* 87(10):1060–70
- Touitou Y, Auzéby A, Camus F et al (2009) Daily profiles of salivary and urinary melatonin and steroids in healthy prepubertal boys. *J Pediatr Endocrinol Metab* 22(11):1009–15
- Tozer TN, Rowland M (2006) *Introduction to pharmacokinetics and pharmacodynamics: the quantitative basis of drug therapy*. Lippincott, Baltimore, MD
- Tsukamoto Y, Kato Y, Ura M et al (2001) A physiologically based pharmacokinetic analysis of capecitabine, a triple prodrug of 5-FU, in humans: the mechanism for tumor-selective accumulation of 5-FU. *Pharm Res* 18(8):1190–202
- Van Ryckeeghem F, Van Belle S (2010) Management of chemotherapy-induced nausea and vomiting. *Acta Clin Belg* 65(5):305–10

- Van Someren EJ, Nagtegaal E (2007) Improving melatonin circadian phase estimates. *Sleep Med* 8:590–601
- Vassal G, Challine D, Koscielny S et al (1993) Chronopharmacology of high-dose busulfan in children. *Cancer Res* 53(7):1534–7
- Veldhuis JD, Iranmanesh A, Johnson ML et al (1990) Amplitude, but not frequency, modulation of adrenocorticotropin secretory bursts gives rise to the nyctohemeral rhythm of the corticotropic axis in man. *J Clin Endocrinol Metab* 71:452–63
- Vink JM, Groot AS, Kerkhof GA et al (2001) Genetic analysis of morningness and eveningness. *Chronobiol Int* 18:809–22
- Wang J, Huang Y (2007) Pharmacogenomics of sex difference in chemotherapeutic toxicity. *Curr Drug Discov Technol* 4(1):59–68
- Waterhouse J, Drust B, Weinert D et al (2005) The circadian rhythm of core temperature: origin and some implications for exercise performance. *Chronobiol Int* 22(2):207–25
- Weis J (2011) Cancer-related fatigue: prevalence, assessment and treatment strategies. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res* 11(4):441–6
- Wood PA, Yang X, Taber A et al (2008) Period 2 mutation accelerates *ApcMin*⁺ tumorigenesis. *Mol Cancer Res* 6(11):1786–93
- Yeh KT, Yang MY, Liu TC et al (2005) Abnormal expression of period 1 (PER1) in endometrial carcinoma. *J Pathol* 206(1):111–20
- Yi C, Mu L, de la Longrais IA et al (2010) The circadian gene NPAS2 is a novel prognostic biomarker for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 120(3):663–9
- Zhou F, He X, Liu H et al (2011) Functional polymorphisms of circadian positive feedback regulation genes and clinical outcome of Chinese patients with resected colorectal cancer. *Cancer*. doi:10.1002/cncr.26348
- Zhu Y, Leaderer D, Guss C et al (2007) Ala394Thr polymorphism in the clock gene NPAS2: a circadian modifier for the risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer* 120(2):432–5
- Zhu Y, Stevens RG, Leaderer D et al (2008) Non-synonymous polymorphisms in the circadian gene NPAS2 and breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 107(3):421–5

V.2. Rôle du gène *Per2* dans la cancérogénèse hépatique

V.2.1. Résumé

Ali Mteyrek¹, Elisabeth Filipski¹, Catherine Guettier², Francis Lévi¹

La perturbation des horloges moléculaires de l'hôte provoquée par l'altération des cycles de l'environnement a accéléré la progression tumorale et la cancérogénèse hépatique chez les rongeurs. La présente étude a évalué le rôle du gène de l'horloge *Per2* dans la cancérisation hépatique et ses mécanismes moléculaires secondaires à la dérégulation du cycle cellulaire, de l'apoptose, et de l'inflammation. Le foie des souris *Per2^{m/m}* présentait une dépression de gène *c-Myc*, une avance de phase du rythme transcriptionnel de *Wee1*, une absence de rythme des gènes *Ccnb1* et *K-ras*, ainsi qu'une perte du rythme circadien de la concentration protéique d'IL-6. L'hypothèse que ces altérations pourraient sensibiliser les souris *Per2^{m/m}* à développer des cancers hépatiques a été testée. L'administration chronique de diéthylnitrosamine (402 mg/kg, pendant 7 semaines) a induit 4 fois plus de cancers hépatiques primaires chez les souris *Per2^{m/m}* en comparaison des souris sauvages, 4 mois après la fin des injections. L'horloge circadienne hépatique était sévèrement altérée durant la phase d'initiation de la cancérisation hépatique, observée après 17 jours d'exposition à la DEN. Les souris *Per2^{m/m}* sous DEN présentaient une surexpression de *c-Myc* et de *Ccnb1*, une absence de réponse de *P53*, et une absence de rythme circadien des ARNm d'*ATM*, *Wee1*, et *Ccnb1*. Ces souris ont aussi montré une augmentation des concentrations protéiques d'IL-6 et de TNF- α hépatiques. La mutation *Per2* a occasionné une dérégulation sévère des gènes ou des protéines associés aux marqueurs de cancer, dont la prolifération cellulaire non contrôlée, l'instabilité génomique, et l'inflammation tumorale. Ainsi, le gène *Per2* s'est-il comporté comme un gène suppresseur de tumeur hépatique.

Clock gene *Per2* as a controller of liver carcinogenesis pathways

Ali Mteyrek¹, Elisabeth Filipinski¹, Catherine Guettier², Francis Lévi¹

¹ INSERM, UMRS 776 « Rythmes Biologiques et Cancers » & Université Paris 11, CAMPUS CNRS, Villejuif F-94807, France

² Laboratory of Anatomy and Pathologic Cytology, Hôpital Paul Brousse, Villejuif F-94800, France

Running title: Clock gene *Per2* mutation accelerates liver carcinogenesis

Keywords: Circadian rhythm-*Per2* gene-Hepatocellular carcinoma-Molecular clock-Cell cycle genes

Financial support: This work was supported by grant ANR 2009-SYSB-002-01-04 (ERASySBio+ and FP7) to the C5Sys project, and by the Association pour la Recherche sur le Temps Biologique et la Chronothérapie (ARTBC International, hospital Paul Brousse, Villejuif, France).

Corresponding author: Dr. Francis Lévi

Tel. : (33) 1 49 58 34 81 / 34 83

Fax : (33) 1 49 58 34 59

E-mail : francis.levi@inserm.fr

Word count: 4579

Total number of figures and tables: 7 figures

Total number of supplementary figures and tables: 2 tables

ABSTRACT

Environmental disruption of host molecular clocks both accelerated cancer progression and promoted liver carcinogenesis in rodents. Here, we investigated the role of clock gene *Per2* for liver carcinogenesis and its molecular mechanisms related to cell cycle, apoptosis, and inflammation. We first found that the liver of *Per2^{m/m}* mice displayed *c-Myc* derepression, phase-advanced *Wee1*, and arrhythmic *Ccnb1* and *K-ras* mRNA expressions as well as arrhythmic liver IL6 protein concentration. We thus hypothesized that these alterations could make *Per2^{m/m}* mice more prone to develop liver cancers. Indeed, chronic diethylnitrosamine (DEN) exposure (402 mg/kg over 7 weeks) induced primary liver cancers in nearly fourfold as many *Per2^{m/m}* mice as compared to WT, 4 months after exposure completion. The liver molecular clock was severely disrupted during liver carcinogenesis initiation, after DEN exposure for 17 days. *Per2^{m/m}* on DEN further exhibited increased *c-Myc* and *Ccnb1* mean 24-h expressions, lack of *P53* response, and arrhythmic *ATM*, *Wee1*, and *Ccnb1* expressions. DEN-induced tumor related inflammation was further promoted through increased protein concentrations of liver IL-6 and TNF- α as compared to WT. *Per2* mutation resulted in a severe deregulation of gene or protein expressions related to cancer hallmarks, including uncontrolled proliferation, genomic instability, and tumor promoting inflammation. Thus, clock gene *Per2* acted as a liver tumor suppressor.

INTRODUCTION

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the sixth most frequent cancer and the third most common cause of cancer mortality worldwide (Mancuso, 2013). Chronic exposure of rats or mice to diethylnitrosamine (DEN) induces HCC with histology and genetic signature similar to that of poor prognosis HCC in humans (Lee *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005). The deregulation of at least six of ten critical cellular functions has been proposed as mandatory for a cancer to develop. These ten hallmarks of cancer include uncontrolled proliferation, genomic instability, resistance to apoptosis, and replicative immortality, as well as tumor promoting inflammation, an initial event for both human and DEN-induced liver carcinogenesis (Hanahan *et al.*, 2011; Luedde *et al.*, 2011b; Sun *et al.*, 2013).

Here, we investigated the relevance of molecular clock alterations for liver carcinogenesis, and focused our approach on clock gene *Per2*. Prior reports showed that endogenous rhythms with an about 24-h period characterized the liver expression patterns of up to 15% of mouse liver transcripts (Akhtar *et al.*, 2002; Hughes *et al.*, 2009; Schmutz *et al.*, 2012; Vollmers *et al.*, 2012). These molecular rhythms were critically controlled by a genetic molecular clock, also called the circadian Transcription/Translational Feedback Loops (TTFL) oscillator (Partch *et al.*, 2013). The TTFL oscillator involves an activation loop, where *Clock* or *Npas2* and *Bmal1* activate the transcription of *Period (Per)* genes 1, 2 and 3, *Cryptochrome (Cry)* genes 1 and 2, *Rev-erba/β* and *Dec 1/2*. The *Per*, *Cry*, *Rev-erb* and *Dec* genes inhibited their own transcription and/or that of other clock genes through the interaction of their protein heterodimers with the CLOCK::BMAL1 protein heterodimer or with clock gene promoters (Mohawk *et al.*, 2012). Circadian regulation involved all domains of cellular function, including those relevant for cancer such as nutrient and xenobiotic metabolism, immune response, cell division cycle, and cell death and survival (Akhtar *et al.*, 2002; Johnson, 2010; Schmutz *et al.*, 2012; Vollmers *et al.*, 2012; Maier *et al.*, 2013). Messenger RNA and protein expression rhythms were identified in tissues, in cell population and even in single cells (Goldbeter *et al.*, 2012; Mohawk *et al.*, 2012). These molecular rhythms appeared to be under the redundant control of both the molecular circadian clocks and the physiological rhythms which build up the mammalian Circadian Timing System (CTS) (Kornmann *et al.*, 2007a; Partch *et al.*, 2013). CTS coordination and adjustment to environmental cycles is insured by the suprachiasmatic nuclei (SCN), a circadian neuronal pacemaker located in the anterior hypothalamus (Mohawk *et al.*, 2012).

Previous studies showed that liver carcinogenesis was indeed promoted in rats and mice submitted to chronic circadian disruption through altered environmental light-dark cycles after DEN exposure (van den Heiligenberg *et al.*, 1999; Filipski *et al.*, 2009). Prolonged exposure of rats to constant light or mice to chronic jet lag suppressed or profoundly altered the circadian rhythms in rest-activity, body temperature, immune cell trafficking, and/or liver clock gene expressions, resulting in host CTS disruption (Deprés-Brummer *et al.*, 1997; Filipski *et al.*, 2005). Moreover, chronic jet lag up-regulated *c-Myc* and down regulated *P53* in mouse liver, two major events for carcinogenesis, that were previously reported in mice with *Per2* mutation (*Per2^{m/m}*) (Fu *et al.*, 2002; Filipski *et al.*, 2005).

Per2 is localized on chromosome 2 in human and on chromosome 1 in mouse. It is robustly and rhythmically expressed in liver and almost mammalian tissues (Albrecht *et al.*, 2007). *Per2* mRNA or protein expressions were significantly reduced in several human cancers including liver, breast, lung, pancreas, colon, kidney, ovary, brain, lymphoma, head and neck, and myeloid leukemia (Yang *et al.*, 2006; Winter *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2008; Tokunaga *et al.*, 2008; Xia *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011; Hsu *et al.*, 2012; Mazzoccoli *et al.*, 2012; Thoennissen *et al.*, 2012; Chi *et al.*, 2013; Relles *et al.*, 2013). Interestingly, *in vitro* studies showed that *Per2* overexpression in malignant cells was associated with decreased cell proliferation and increased apoptosis resulting from *P53* up-regulation and the down-regulation of *Cyclin B1*, *Bcl2* and *c-Myc* (Hua *et al.*, 2006; Miyazaki *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2010). However the role of molecular clock disruption for liver carcinogenesis was still lacking direct demonstration. Here we show that *Per2* mutation accelerated nearly fourfold the development of DEN-induced hepatocarcinomas through an early fostering of critical cancer hallmarks in mice kept under usual photoperiodic synchronization.

MATERIALS AND METHODS

Mice

All animal experiments were performed under the guidelines approved for animal experimental procedures by the French Ethical Committee (decree 87-848). Male 129SvEv^{Brd} / C57BL/6-Tyrc-Brd mice with or without constitutive *Per2* mutation were used for all experiments (Zheng *et al.*, 1999). The *Per2*^{m/m} mice and their WT counterpart were a generous gift from Urs Albrecht (Freiburg, Switzerland). They were kept at 21°C to 23°C in chronobiologic facilities, with light intensity at cage level ranging from 240 to 580 lux according to cage location and experiment. Mice were aged 8 to 14 weeks upon inclusion in each experiment. They were synchronized with an alternation of 12 h of light (L) and 12 h of darkness (D) (LD 12:12) for at least 3 weeks before starting and during each experiment, and had free access to food and water. Zeitgeber Time (ZT) 0 corresponded to light onset, while ZT12 corresponded to dark onset.

Experimental design

The study involved three Experiments (Exp). Exp I aimed at jointly studying the regulatory role of *Per2* gene on circadian clock, proliferation, genomic instability, and inflammation. Thirty WT and 30 *Per2*^{m/m} mice were euthanized at 6 time points, located 4 hours apart, i.e. ZT3, 7, 11, 15, 19, and 23. Blood (200 µL) was sampled on heparin in order to determine plasma corticosterone concentration. Total RNA and proteins were extracted from each mouse liver for the determination of selected gene mRNA expressions, as well as selected cytokine concentrations.

Exp II involved mouse exposure to a cumulative dose of 402 mg/kg of DEN (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) over an overall exposure duration of 50 days. DEN was injected intraperitoneally (i.p.) at ZT11 from day 1 to 12 at a daily dose of 15 mg/kg, and from day 22 to 50 at a daily dose of 12 mg/kg for a cumulative dose equal to 402 mg/kg. The relevance of *Per2* mutation for DEN-induced liver carcinogenesis involved the use of 15 WT and 15 *Per2*^{m/m}, with 13 mice receiving DEN and two mice receiving vehicle solution (Controls) for each genotype. Body weight was recorded daily at ZT11 before each DEN injection for the initial 50 days, and every 3 days for 128 days thereafter. Mortality was

checked daily during and after DEN administration. Blood was sampled from the retro-orbital sinus on days 79, 102, 130, 150, and 178 for the determinations of serum aspartate aminotransferase (ASAT) and alanine aminotransferase (ALAT) concentrations, with a Synchron LX20 Clinical System (Beckman Coulter, Villepinte, France). All the mice underwent monitoring of rest-activity and core body temperature for 5 days before and during DEN exposure. All the mice were euthanized 178 days after DEN administration onset for pathology and histology studies.

Exp III investigated the role of *Per2* on several main molecular mechanisms of early liver carcinogenesis. Thirty WT and 42 *Per2*^{m/m} mice received a cumulative dose of 195mg/kg DEN (15 mg/kg/d i.p. at ZT11) over a 17-day span. Ten mice including 5 WT and 5 *Per2*^{m/m} underwent circadian monitoring of rest-activity and core body temperature for 5 days before and during DEN exposure. Plasma corticosterone concentration and selected liver gene mRNA expressions, as well as liver IL-6 and TNF- α concentrations were determined in 5 WT and 7 *Per2*^{m/m} every 4 h for 24 h.

Circadian rest-activity and core body temperature rhythm monitoring

Mice underwent intraperitoneal implantation of a telemetry sensor and radiotransmitter under isoflurane anesthesia 2 weeks before starting effective recording of locomotor activity and body temperature every 10 min (Physio Tel, TA 10 TA-F20, Data Sciences, St. Paul, Minnesota). Body temperature and rest-activity were recorded for 5 days before DEN administration and throughout experiments.

Pathology and histological analyses

Gross pathology examination was performed on all the mice in Exp II, in order to identify any macroscopic abnormality either after intercurrent death or following sacrifice 178 days after DEN exposure onset. Whole liver, both lungs, and both kidneys were removed immediately, then fixed in 4% formaldehyde for 24 h, then dehydrated and embedded into paraffin. Three 4 μ m thick serial histological sections were at 1 mm in each liver and stained with hematoxylin-eosin-saffron. A senior pathologist (C.G.) carefully examined each slide under a light microscopic for counting all detectable tumor nodules, for measuring their diameter, and for identifying their histological characteristics, without any information on genotype or experimental conditions.

RNA extraction, cDNA synthesis, and Q-PCR

Total liver RNA was isolated from the frozen tissue specimens with an acidic solution containing acid guanidinium thiocyanate, phenol, and chloroform. cDNA were synthesized using SuperScript Reverse Transcriptase kit (Invitrogen). QPCR was performed in a light cycler System instrument using Light Cycler 480 SYBR Green I Master kit (Roche, France).

Plasma corticosterone and liver cytokines determinations

Blood (200 μ L) was sampled on heparin from the retro-orbital sinus prior to mouse euthanizing. Blood was centrifuged at 5000 rpm, plasma extracted and frozen at -80°C . Plasma corticosterone concentration was determined with ELISA (Enzo Life Sciences). Data were expressed as ng/mL of plasma.

Liver proteins were extracted with an established buffer (Tris 20 mM, EDTA 2 mM, EGTA 5 mM, DTT 0.5 mM, NaCl 100 mM, and Triton 0.1%). The liver concentrations were determined with “BioPhotometer” for total proteins, and with commercially available ELISA kits (Invitrogen) for IL-6 and TNF- α . Cytokine concentrations in liver were expressed as pg/mg of proteins.

Statistical analyses

Mean \pm standard error of the mean (SEM) were computed for all quantitative data according to sampling time (ZT), genotype (WT vs *Per2^{m/m}*), experimental condition (DEN exposure vs no DEN). Group comparisons involved multiple way analyses of variance (ANOVA) with Scheffé’s contrast tests. Incidence data were compared with Chi-Square or Exact Fischer test. Survival curves were compared with log-rank. Time series were first examined with chronogram inspection. Rest-activity and temperature time series were analyzed with spectral analysis through Fast Fourier Transform in order to determine the occurrence of a dominant period τ in the circadian domain. Cosinor analyses with $\tau = 24$ h were performed for all the 24-h time series in order to determine mesor (24-h mean), amplitude (half the difference between maximum and minimum value of fitted cosine function) and acrophase (timing of maximum, referred to ZT0). All parameters were computed with their 95% Confidence Limits. Statistical significance required a P-value < 0.05 .

All statistical analyses were performed using SPSS statistical analysis software version 18 (Statistical Package for Social Sciences, Chicago, IL, USA).

RESULTS

***Per2* control of selected liver carcinogenesis pathways**

The mRNA expression of clock genes *Bmal1*, *Rev-erba*, *Clock*, *Cry1*, and *Cry2* displayed marked 24-hour changes both in Wild-Type (WT) and *Per2^{m/m}* mice (time effect in two-way ANOVA, $p < 0.011$ to $p < 0.001$ for each gene). The 24-h patterns however differed between both groups (time*genotype interaction, $p < 0.05$ to $p < 0.001$), except for *Cry2* ($p = 0.17$). Circadian rhythms with $\tau = 24$ h were validated for each clock gene expression in each genotype ($p = 0.04$ to $p < 0.001$), except for *Clock* in *Per2^{m/m}*. A 2- to 5-h phase advance was found for *Bmal1*, *Rev-erba*, *Cry1*, and *Cry2* as well as a dampening of circadian amplitude by 19% to 59% for *Bmal1*, *Rev-erba*, and *Cry1* in *Per2^{m/m}* as compared to WT mice (Hotelling t-tests for phase and amplitude comparisons, $p < 0.001$ for each gene) (**Fig. 1A; Supplementary Table S1**).

The phase advance and amplitude dampening in the liver molecular clock of *Per2^{m/m}* translated into a 2-3 h phase advance of *c-Myc* and *Wee1* circadian rhythms (Hotelling t-test, $p < 0.05$), and the suppression of the *Ccnb1* and *K-ras* 24-h rhythms that were found in WT mice (Cosinor in WT, $p < 0.01$). Surprisingly, *ATM* mRNA expression displayed a similar circadian rhythm with a maximum at ZT9 and a trough at ZT19 in both genotypes (Cosinor, $p < 0.03$). In addition, the 24-hour mean mRNA expression was significantly decreased for *P53*, increased for *Bcl-2* and doubled for *c-Myc* in *Per2^{m/m}* as compared to WT mice (ANOVA, $p \leq 0.001$) (**Fig. 1B; Supplementary Table S1**).

Liver IL-6 protein concentration displayed a circadian pattern in WT with a maximum at ZT11 (Cosinor analysis, $p = 0.04$), but no such rhythm was found in *Per2^{m/m}* mice ($p = 0.17$). The 24-h mean concentration of liver IL6 was increased in *Per2^{m/m}*, although not significantly so ($p = 0.09$). No circadian change was found for liver TNF- α concentration in either genotype, yet the 24-h mean level was decreased in *Per2^{m/m}* as compared to WT mice (7.45 ± 0.93 vs. 9.3 ± 1.2 pg/mg, $p = 0.017$) (**Fig. 1C; Supplementary Table S1**).

Increased DEN toxicity in *Per2^{m/m}* mice

The DEN daily dose was reduced from 15 to 12 mg/kg, as a result of rapid body weight loss over the initial 12 days of DEN exposure in both genotypes, without any statistically significant difference (8.9 ± 1.3 % in WT vs 10 ± 1.4 % in *Per2^{m/m}*, $p = 0.55$). Subsequently,

mean body weight loss reached a second nadir 57 days after DEN treatment onset, which was ~twice as large in *Per2^{m/m}* mice as compared to WT ($12.3 \pm 2.2\%$ vs $6.5 \pm 1.3\%$, p from ANOVA < 0.001). Complete recovery of body weight loss was also slower in the *Per2^{m/m}* as compared to WT (38 days vs 26 days) (**Fig. 2A**). The serum levels of both ALAT and ASAT were increased by up to six- and four-fold respectively ~30 days after completion of DEN exposure as compared to untreated controls. However, no difference was found according to *Per2* mutation on this day, nor over the 3 subsequent months (**Fig. 2B**). No toxic death was encountered in the WT mice on DEN. In contrast, four *Per2^{m/m}* mice died with severe liver alterations before study completion (p from log Rank = 0.009) (**Fig. 2C**). Two mice displayed histological evidence of liver inflammation, oval cell types, with major dysplasia and enlarged nuclei, associated with severe body weight loss (37.4%) or ascites on days 59 and 79 respectively. The liver histology of both other mice revealed inflammatory foci. In addition precancerous dysplasia was found for that mouse dead on day 136, while 4 liver cancer nodules were identified in the mouse that died on day 137. This latter animal was counted among those that developed liver cancer.

Accelerated liver carcinogenesis in *Per2^{m/m}* mice

Macroscopic tumor nodules, associated with minor or severe liver dysplasia, were observed in all the remaining mice ~6 months after DEN exposure onset (day 178) (**Fig. 3A**). Histological analysis revealed the occurrence of both hepatocellular carcinoma (HCC) and cholangiocarcinoma (CCA) as well as that of pre-neoplastic nodules, inflammatory infiltrations and apoptotic hepatocytes (**Fig. 3A**). DEN further induced primary lung tubulopapillary tumor in 5 WT and 3 *Per2^{m/m}* with associated inflammatory foci. A single HCC metastasis was found in the kidney of a WT mouse.

Liver tumor nodules, with diameters ranging from 1 to 11 mm, were found in all the *Per2^{m/m}* and in 77% of the WT mice. Histology revealed ~six times as many HCC as compared to CCA (69 vs 11), without any apparent influence of *Per2* mutation on histological type. The average number of tumors per animal, including HCC and CCA, was 3.6-fold as high in *Per2^{m/m}* as compared to WT (Kruskal-Wallis ANOVA, $p = 0.01$) (**Fig. 3B**). The number of tumor nodules ranged from 0 to 4 in WT mice, and from 1 to 10 in *Per2^{m/m}* mice. As a result, the proportion of mice with more than 2 tumor nodules was ~five-fold as high in *Per2^{m/m}* as

compared to WT (80% vs 15 %, Fisher exact test, $p=0.003$). The average number of HCC per mouse was 3.7-fold as high in *Per2^{m/m}* mice as compared to WT (Kruskal-Wallis ANOVA, 5.2 vs 1.4, $p<0.001$) (**Fig. 3C**).

Severe circadian disruption and internal desynchronization in *Per2^{m/m}* on DEN

Both rest-activity and temperature patterns displayed periodic 24-h changes in *Per2^{m/m}* and WT mice for the 5 days preceding DEN exposure. A 1-h phase advance was statistically validated in *Per2^{m/m}* for both rest-activity (ϕ , ZT16:07 vs ZT17:07, Hotelling t-test, $p=0.016$) and body temperature (ZT16:39 vs ZT17:45, $p=0.001$) (**Fig. 4A**). Although the baseline rest-activity amplitude was similar in both genotypes, that of body temperature was significantly lower in *Per2^{m/m}* (0.7 vs 0.88°C, Hotelling T test, $p<0.001$) (**Fig. 4B**).

DEN suppressed the circadian rhythm in rest-activity for 2/13 WT (15%) and 8/13 *Per2^{m/m}* (62%), and that in body temperature for 2/13 *Per2^{m/m}* (15%). In the WT mice with circadian rhythms, DEN reduced ~three-fold the circadian amplitude of rest-activity and halved that of body temperature as compared to baseline. Such effect was achieved after the initial 3 treatment weeks for both genotypes and persisted over the subsequent 4 treatment weeks for WT only (**Fig. 4B**). In contrast, the amplitudes in rest-activity and body temperature deteriorated down to 1/9 and 1/4 of their respective baseline values in *Per2^{m/m}* mice ($p<0.001$) (**Fig. 4B**). Over this 4-week span, the circadian phase was delayed by ~2 h for rest-activity and by 1 h for body temperature as compared to baseline in WT (Paired T-tests, $p=0.01$ and $p=0.003$, respectively). In contrast both of these rhythms were phase-advanced by 3 h and 2 h respectively in *Per2^{m/m}* (T appaired test, $p=0.04$) (**Fig. 4A**).

Double-plot representations of both biomarkers in individual mice further revealed that the circadian disruption produced by DEN was transient for WT, and sustained for *Per2^{m/m}* mice (**Fig. 5A and 5B**). Moreover, a significant correlation was found between the circadian acrophases of both rhythms for individual WT ($r=0.571$, $p=0.042$) but not for individual *Per2^{m/m}* ($r=0.197$, $p=0.518$). This finding supports the coupling of both physiological rhythms in WT and the occurrence of internal desynchronization in *Per2^{m/m}* as a result of DEN exposure (**Fig. 5C**).

Relevance of clock gene *Per2* for early liver carcinogenesis processes

The mRNA expression of clock genes *Bmal1*, *Rev-erba*, *Clock*, *Cry1*, and *Cry2* exhibited statistically significant circadian variations for both WT and *Per2^{m/m}* mice after DEN exposure for 17 days (2-way ANOVA: ZT effect, $p<0.001$; Cosinor, $p<0.03$ to $p<0.001$).

However a significant ZT*genotype interaction was found for these clock genes except for *Cry2* (2-way ANOVA, $p < 0.005$ to $p < 0.001$). This resulted from a phase advance by 4 h for *Clock*, *Cry1* and *Cry2*, 5 h for *Bmal1* and 7 h for *Rev-erba* in *Per2^{m/m}* as compared to WT ($p < 0.001$ for each gene). The circadian amplitude was also reduced in *Per2^{m/m}* by 34 to 74% for the studied clock genes except *Cry2* compared to WT ($p < 0.001$) (**Fig. 6A; Supplementary Table S2**).

Twenty four-hour changes were also statistically validated for the proliferation genes *c-Myc*, *Wee1*, *Ccnb1*, and *K-ras*, as well as for the genomic instability genes *ATM*, *P53* and *Bcl2* (2-way ANOVA: ZT effect, $p < 0.01$ for each gene). However, a ZT*genotype interaction was validated for *Wee1* and *P53* (2-way ANOVA, $p = 0.005$ and $p < 0.001$, respectively). Cosinor validated a 24-h rhythm for *Wee1*, *Ccnb1*, *K-ras*, *ATM*, and *P53* in WT mice ($p < 0.05$ to $p < 0.001$), but only for *K-ras* in *Per2^{m/m}* ($p = 0.006$). In addition a 12-h rhythmic patterns were found for *c-Myc* both for WT and *Per2^{m/m}* ($p = 0.02$ and $p = 0.005$, respectively), as well as for *Wee1*, *Ccnb1*, *ATM*, *Bcl-2* for *Per2^{m/m}* ($p \leq 0.03$ for each gene). *Per2* mutation was also associated with increased daily average mRNA expression of *c-Myc* by 66%, *Ccnb1* by 55%, and *Bcl-2* by 20% ($p < 0.04$ to $p < 0.001$) (**Fig. 6B; Supplementary Table S2**).

Liver IL-6 and TNF- α concentrations displayed marked 24-h changes in both genotypes (2-way ANOVA: ZT effect, $p < 0.001$; Cosinor with $\tau = 24h$, $p = 0.02$ to < 0.001). Both mean IL-6 and mean TNF- α concentrations were significantly increased in *Per2^{m/m}* as compared to WT ([IL-6], 9.6 ± 0.6 vs 7.9 ± 0.8 pg/mg, $p = 0.003$; [TNF- α], 15.6 ± 0.8 vs 10 ± 1.4 pg/mg, $p < 0.001$) (**Fig. 6C; Supplementary Table S2**).

DEN-induced changes according to *Per2* mutation

In WT mice, DEN exposure phase-advanced the mRNA expression patterns of the five clock genes and that of *K-ras* by 1 to 4 h, and nearly inverted the *ATM* rhythm, as compared to untreated controls (Hotelling t-test for phases: $p = 0.01$ to $p < 0.001$). DEN dampened the circadian amplitude of *Bmal1*, *Rev-erba*, *Clock*, *Cry2* and *Wee1* by 15 to 59% and amplified the 24-h rhythms of *Ccnb1*, *K-ras* and *ATM* by 28 to 63% (Hotelling t-test for amplitude: $p = 0.04$ to $p < 0.001$) (**Fig. 1 vs Fig. 6, left panel**).

In *Per2^{m/m}*, DEN treatment phase-advanced the 24-h rhythms in *Bmal1*, *Rev-erba* and *Cry2* by 4 to 6 hours (Hotelling t-test for phases, $p < 0.001$), shortened the rhythm period from 24 h

to 12 h for *c-Myc*, *Wee1* and *Ccnb1*, and induced a 24-h rhythm for *K-ras* ($p= 0.03$ to $p= 0.005$). The 24-h amplitude was reduced by 43% for *Bmall*, 61% for *Rev-erba* and 39% for *Cry1* as compared to untreated controls (Hotelling t-test for amplitudes: $p < 0.001$ for each gene) (**Fig. 1 vs Fig. 6, right panel**).

DEN exposure significantly reduced the 24-h mean expression of *Bmall*, *Rev-erba*, *Cry1* and *Cry2* by 20 to 40% in *Per2^{m/m}* and only that of *Cry1* by 20% in WT. In contrast, DEN exposure nearly doubled the 24-h mean expression of *c-Myc* and that of *Ccnb1* both in WT and *Per2^{m/m}* with regard to their respective controls ($p < 0.05$ to $p < 0.001$) (**Fig. 1 vs Fig. 6**).

Circadian biomarkers and plasma corticosterone concentration in *Per2^{m/m}*

In the third experiment, both rest-activity and body temperature patterns were markedly dampened during DEN exposure with more severe apparent alteration in *Per2^{m/m}* as compared to WT (**Fig. 7A**).

Cosinor analysis documented a phase advance by nearly 2 h and 30 min in *Per2^{m/m}* for both rest-activity (ZT17:00 vs ZT19:20, $p= 0.014$) and body temperature (ZT16:50 vs ZT19:30, $p= 0.015$) as compared to WT mice, before DEN administration (**Fig. 7B**). The circadian amplitude was nearly halved for rest-activity ($p= 0.03$) and reduced by 40% for body temperature ($p= 0.009$) in *Per2^{m/m}* as compared to WT mice (**Fig. 7C**). DEN exposure did not modify the circadian temperature acrophases, yet it induced 1-h phase advance for rest-activity in WT and a 2-h phase advance in *Per2^{m/m}* (Hotelling t-test for phase comparisons, $p= 0.004$) (**Fig. 7B**).

DEN reduced the circadian amplitude of rest-activity by nearly 5.3-fold and 4.6-fold in WT and *Per2^{m/m}* respectively (Hotelling t-test, $p= 0.03$) and halved that of temperature in both groups (Hotelling t-test for amplitudes: 0.55°C vs 0.33°C , $p= 0.02$) (**Fig. 7C**).

Plasma corticosterone was rhythmic in WT mice (Cosinor, $p < 0.001$), but not in *Per2^{m/m}* both in untreated controls and in mice exposed to DEN, with 4.3-fold lower 24-h mean corticosterone levels in treated *Per2^{m/m}* as compared to WT ($p < 0.001$) (**Fig. 7D**).

DISCUSSION

To our knowledge, this study is the first one that reveals the crucial role of clock gene *Per2* in liver carcinogenesis. DEN was used here as a carcinogen for both initiation and promotion of primary liver cancers in mice, since this experimental model displayed histologic and dynamic features similar to those of human hepatocarcinomas (Verna *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005).

Per2 mutation increased nearly fivefold the rate of mice with two or more primary liver cancers as compared to WT exposed to the same DEN dose. Previous studies demonstrated that mutation or knock out of clock genes *Per2*, *Cry1/Cry2* or *Bmal1* accelerated the development of lymphomas following whole body exposure to γ radiations (Fu *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2010). Circadian disruption resulting from an altered light-dark environment was identified as a promoter of liver carcinogenesis in rats and mice (van den Heiligenberg *et al.*, 1999; Filipski *et al.*, 2009). In contrast, the current study showed that both initiation and promotion of liver carcinogenesis were strongly regulated by clock gene *Per2*. Before any carcinogenic exposure, *Per2* mutation induced profound molecular circadian disruption in liver even despite regular light-dark exposure. Thus, both 24-h expressions and circadian amplitudes of *Bmal1* and *Cry1* were markedly reduced. *Bmal1* represses proto-oncogene *c-Myc* through binding to its P1 promoter (Fu *et al.*, 2002). Accordingly, the 24-h mean mRNA expression of *c-Myc* was doubled in the liver of untreated *Per2^{m/m}* as compared to WT mice in the current study.

Indeed, the detection of the higher rate of liver cancers in *Per2^{m/m}* mice at ~6 months was preceded by the up-regulation of several critical liver carcinogenesis pathways already at 3 weeks. Thus, molecular markers of proliferation, genomic instability, apoptosis, and inflammation were significantly deregulated in *Per2^{m/m}*, as compared to WT, despite apparently similar histological liver inflammation (data not shown). DEN exposure further significantly dampened the circadian transcription amplitude of *Bmal1*, *Rev-erba*, *Cry1*, and *Clock* in *Per2^{m/m}* as compared to WT. This severe alteration of the liver clock translated into the up regulation and/or the circadian deregulation of molecular markers of cellular proliferation (*c-Myc*, *Ccnb1*, *Wee1*, *K-Ras*), genomic instability (*ATM*, *P53*). *Bmal1*-controlled gene *Wee1* inhibits the activity of CCNB1-CDK1 complex which gates cell cycle transition from G2 to M (Matsuo *et al.*, 2003). In contrast *ATM* is controlled by *Per1* and *Per3* clock genes (Gery *et al.*, 2006; Im *et al.*, 2010).

The initiation stage of liver carcinogenesis involving the elicitation of apoptosis and necrosis in hepatocytes by DEN, the subsequent release of free nucleosides, purine metabolites and heat shock proteins by dead hepatocytes, is followed by the consequent activation of NF- κ B pathway in liver macrophages, which triggers liver inflammation (Zeh *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2013). Thus both DEN-induced rodent liver cancers and human hepatocarcinomas usually develop on a background of chronic liver inflammation. During this promotion stage, NF- κ B activation accelerates cellular proliferation and inhibits apoptosis as a result of the transcriptional activation of cytokine genes IL-6 and TNF α (Pikarsky *et al.*, 2004; Prasad *et al.*, 2010). Indeed IL-6 and TNF- α proteins were significantly increased in the liver of *Per2^{m/m}* as compared to WT, with dampened circadian rhythms. A circadian rhythm was earlier shown for both cytokines in mouse spleen macrophages following lipopolysaccharides stimulation (Keller *et al.*, 2009). *Per2^{-/-}* mice also displayed increased TNF- α mRNA expression as a result of liver cholestasis or fibrosis in response to physical liver injury (Chen *et al.*, 2013).

A circadian control was also reported for pathways involved in DEN metabolism, an aspect that was not explored here. Thus DEN is mainly bioactivated by Cyp2E1 in liver (Verna *et al.*, 1996). The related Cyp2E2 displayed mRNA and protein circadian variations in mice, with its activation being inhibited by *Per2* (Matsunaga *et al.*, 2008). DEN detoxification is ensured by clock-controlled Glutathione S-Transferase (Xu *et al.*, 2012). We rather focused our approach on the relevance of *Per2* for critical carcinogenesis pathways. Thus, the overexpression of *Per2* gene in cancer cell lines *in vitro* inhibited proliferation and arrested cell cycling, a finding which supported the negative growth-regulatory properties of *Per2* (Hua *et al.*, 2006; Miyazaki *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2010). Decreased *Per2* expression was also reported in human HCC as well as in other human cancers, as compared to the corresponding healthy tissues (Yang *et al.*, 2006; Winter *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2008; Tokunaga *et al.*, 2008; Xia *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011; Hsu *et al.*, 2012; Mazzoccoli *et al.*, 2012; Thoennissen *et al.*, 2012; Chi *et al.*, 2013; Relles *et al.*, 2013). Furthermore, the down regulation of *Per2* expression in human cancers was usually associated with poor patient outcomes (Ortiz-Tudela *et al.*, 2013)

In summary, our study showed that the loss of function of clock gene *Per2* dramatically enhanced DEN-induced HCC formation and played a critical role in the dysregulation of molecular mechanisms that leads to liver cancers. Clock gene *Per2* may thus represent a promising target for liver cancer prevention and therapy.

REFERENCES

- Akhtar RA, Reddy AB, Maywood ES, Clayton JD, King VM, Smith AG, *et al.* (2002). Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Current biology : CB* **12**(7): 540-550.
- Albrecht U, Bordon A, Schmutz I, Ripperger J (2007). The multiple facets of Per2. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **72**: 95-104.
- Chen P, Kakan X, Wang S, Dong W, Jia A, Cai C, *et al.* (2013). Deletion of clock gene Per2 exacerbates cholestatic liver injury and fibrosis in mice. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie* **65**(4): 427-432.
- Chi C, He ZF, Liu Y, Lin XM, Sun CC (2013). [Expression and clinical significance of circadian gene Per2 in non-small cell lung cancer]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* **35**(2): 129-131.
- Deprés-Brummer P, Bourin P, Pages N, Metzger G, Lévi F (1997). Persistent T lymphocyte rhythms despite suppressed circadian clock outputs in rats. *Am J Physiol* **273**(6 Pt 2): R1891-1899.
- Filipski E, Innominato PF, Wu M, Li XM, Iacobelli S, Xian LJ, *et al.* (2005). Effects of light and food schedules on liver and tumor molecular clocks in mice. *Journal of the National Cancer Institute* **97**(7): 507-517.
- Filipski E, Subramanian P, Carriere J, Guettier C, Barbason H, Levi F (2009). Circadian disruption accelerates liver carcinogenesis in mice. *Mutation research* **680**(1-2): 95-105.
- Fu L, Pelicano H, Liu J, Huang P, Lee C (2002). The circadian gene Period2 plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *Cell* **111**(1): 41-50.
- Gery S, Komatsu N, Baldjyan L, Yu A, Koo D, Koeffler HP (2006). The circadian gene per1 plays an important role in cell growth and DNA damage control in human cancer cells. *Mol Cell* **22**(3): 375-382.
- Goldbeter A, Gérard C, Gonze D, Leloup JC, Dupont G (2012). Systems biology of cellular rhythms. *FEBS Lett* **586**(18): 2955-2965.
- Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**(5): 646-674.
- Hsu CM, Lin SF, Lu CT, Lin PM, Yang MY (2012). Altered expression of circadian clock genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Tumour Biol* **33**(1): 149-155.

- Hua H, Wang Y, Wan C, Liu Y, Zhu B, Yang C, *et al.* (2006). Circadian gene mPer2 overexpression induces cancer cell apoptosis. *Cancer science* **97**(7): 589-596.
- Hughes ME, DiTacchio L, Hayes KR, Vollmers C, Pulivarthy S, Baggs JE, *et al.* (2009). Harmonics of circadian gene transcription in mammals. *PLoS Genet* **5**(4): e1000442.
- Im JS, Jung BH, Kim SE, Lee KH, Lee JK (2010). Per3, a circadian gene, is required for Chk2 activation in human cells. *FEBS Lett* **584**(23): 4731-4734.
- Johnson CH (2010). Circadian clocks and cell division: what's the pacemaker? *Cell Cycle* **9**(19): 3864-3873.
- Keller M, Mazuch J, Abraham U, Eom GD, Herzog ED, Volk HD, *et al.* (2009). A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(50): 21407-21412.
- Kornmann B, Schaad O, Bujard H, Takahashi JS, Schibler U (2007). System-driven and oscillator-dependent circadian transcription in mice with a conditionally active liver clock. *PLoS biology* **5**(2): e34.
- Lee JS, Chu IS, Mikaelyan A, Calvisi DF, Heo J, Reddy JK, *et al.* (2004). Application of comparative functional genomics to identify best-fit mouse models to study human cancer. *Nature genetics* **36**(12): 1306-1311.
- Lee JS, Grisham JW, Thorgeirsson SS (2005). Comparative functional genomics for identifying models of human cancer. *Carcinogenesis* **26**(6): 1013-1020.
- Lee S, Donehower LA, Herron AJ, Moore DD, Fu L (2010). Disrupting circadian homeostasis of sympathetic signaling promotes tumor development in mice. *PloS one* **5**(6): e10995.
- Lin YM, Chang JH, Yeh KT, Yang MY, Liu TC, Lin SF, *et al.* (2008). Disturbance of circadian gene expression in hepatocellular carcinoma. *Molecular carcinogenesis* **47**(12): 925-933.
- Luedde T, Schwabe RF (2011). NF- κ B in the liver--linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **8**(2): 108-118.
- Maier B, Kramer A (2013). A NONO-gate times the cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**(5): 1565-1566.

- Mancuso A (2013). Management of hepatocellular carcinoma: Enlightening the gray zones. *World J Hepatol* **5**(6): 302-310.
- Matsunaga N, Ikeda M, Takiguchi T, Koyanagi S, Ohdo S (2008). The molecular mechanism regulating 24-hour rhythm of CYP2E1 expression in the mouse liver. *Hepatology* **48**(1): 240-251.
- Matsuo T, Yamaguchi S, Mitsui S, Emi A, Shimoda F, Okamura H (2003). Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. *Science* **302**(5643): 255-259.
- Mazzoccoli G, Piepoli A, Carella M, Panza A, Pazienza V, Benegiamo G, *et al.* (2012). Altered expression of the clock gene machinery in kidney cancer patients. *Biomed Pharmacother* **66**(3): 175-179.
- Miyazaki K, Wakabayashi M, Hara Y, Ishida N (2010). Tumor growth suppression in vivo by overexpression of the circadian component, PER2. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **15**(4): 351-358.
- Mohawk JA, Green CB, Takahashi JS (2012). Central and peripheral circadian clocks in mammals. *Annual review of neuroscience* **35**: 445-462.
- Ortiz-Tudela E, Mteyrek A, Ballesta A, Innominato PF, Lévi F (2013). Cancer chronotherapeutics: experimental, theoretical, and clinical aspects. *Handb Exp Pharmacol*(217): 261-288.
- Partch CL, Green CB, Takahashi JS (2013). Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends in cell biology*.
- Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, *et al.* (2004). NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* **431**(7007): 461-466.
- Prasad S, Ravindran J, Aggarwal BB (2010). NF-kappaB and cancer: how intimate is this relationship. *Mol Cell Biochem* **336**(1-2): 25-37.
- Relles D, Sendecki J, Chipitsyna G, Hyslop T, Yeo CJ, Arafat HA (2013). Circadian gene expression and clinicopathologic correlates in pancreatic cancer. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* **17**(3): 443-450.
- Schmutz I, Albrecht U, Ripperger JA (2012). The role of clock genes and rhythmicity in the liver. *Molecular and cellular endocrinology* **349**(1): 38-44.
- Sun B, Karin M (2013). Inflammation and liver tumorigenesis. *Front Med* **7**(2): 242-254.

Sun CM, Huang SF, Zeng JM, Liu DB, Xiao Q, Tian WJ, *et al.* (2010). Per2 inhibits k562 leukemia cell growth in vitro and in vivo through cell cycle arrest and apoptosis induction. *Pathol Oncol Res* **16**(3): 403-411.

Thoennissen NH, Thoennissen GB, Abbassi S, Nabavi-Nouis S, Sauer T, Doan NB, *et al.* (2012). Transcription factor CCAAT/enhancer-binding protein alpha and critical circadian clock downstream target gene PER2 are highly deregulated in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* **53**(8): 1577-1585.

Tokunaga H, Takebayashi Y, Utsunomiya H, Akahira J, Higashimoto M, Mashiko M, *et al.* (2008). Clinicopathological significance of circadian rhythm-related gene expression levels in patients with epithelial ovarian cancer. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica* **87**(10): 1060-1070.

van den Heiligenberg S, Depres-Brummer P, Barbason H, Claustrat B, Reynes M, Levi F (1999). The tumor promoting effect of constant light exposure on diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Life sciences* **64**(26): 2523-2534.

Verna L, Whysner J, Williams GM (1996). N-nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. *Pharmacology & therapeutics* **71**(1-2): 57-81.

Vollmers C, Schmitz RJ, Nathanson J, Yeo G, Ecker JR, Panda S (2012). Circadian oscillations of protein-coding and regulatory RNAs in a highly dynamic mammalian liver epigenome. *Cell Metab* **16**(6): 833-845.

Wang Y, Hua L, Lu C, Chen Z (2011). Expression of circadian clock gene human Period2 (hPer2) in human colorectal carcinoma. *World J Surg Oncol* **9**: 166.

Winter SL, Bosnoyan-Collins L, Pinnaduwege D, Andrulis IL (2007). Expression of the circadian clock genes Per1 and Per2 in sporadic and familial breast tumors. *Neoplasia* **9**(10): 797-800.

Xia HC, Niu ZF, Ma H, Cao SZ, Hao SC, Liu ZT, *et al.* (2010). Deregulated expression of the Per1 and Per2 in human gliomas. *The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques* **37**(3): 365-370.

Xu YQ, Zhang D, Jin T, Cai DJ, Wu Q, Lu Y, *et al.* (2012). Diurnal variation of hepatic antioxidant gene expression in mice. *PLoS One* **7**(8): e44237.

Yang MY, Chang JG, Lin PM, Tang KP, Chen YH, Lin HY, *et al.* (2006). Downregulation of circadian clock genes in chronic myeloid leukemia: alternative methylation pattern of hPER3. *Cancer science* **97**(12): 1298-1307.

Zeh HJ, Lotze MT (2005). Addicted to death: invasive cancer and the immune response to unscheduled cell death. *J Immunother* **28**(1): 1-9.

Zheng B, Larkin DW, Albrecht U, Sun ZS, Sage M, Eichele G, *et al.* (1999). The mPer2 gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock. *Nature* **400**(6740): 169-173.

Figure legends

Figure 1. Moderation of liver clock, proliferation, genomic instability and pro-inflammatory cytokine patterns by *Per2* loss-of-function. Each data point is mean of 5 mice at each of 6 Zeitgeber Times (ZT) for WT (left panels) or *Per2*^{m/m} mice (right panels). Circadian mRNA expression of (A) clock genes *Clock*, *Bmal1*, *Rev-erba*, *Cry1*, and *Cry2*; (B) proliferation and genomic instability genes *Ccnb1*, *K-ras*, *c-Myc*, *Wee1*, *Bcl2*, *P53*, and *ATM*. (C), Circadian pattern of liver cytokines IL-6 and TNF- α liver concentrations. * denotes statistical validation of 24-h rhythm with Cosinor ($p < 0.05$).

Figure 2. Systemic toxicity of DEN according to *Per2* loss-of-function. (A), Relative body weight changes (mean \pm SEM) in WT and *Per2*^{m/m} mice during and after DEN exposure. Body weight loss was largest in *Per2*^{m/m} mice (open circle) as compared to their WT (dark circle). The daily DEN doses (mg/kg) are shown in italic, for corresponding exposure spans. (B), Histogram of serum levels of ALAT and ASAT (mean \pm SEM) after DEN exposure in WT (dark box) and *Per2*^{m/m} (open box) mice. Mean \pm SEM ALAT and ASAT in untreated control mice is represented by the gray horizontal bar. Note obvious increase in both markers for liver DEN toxicity, without any statistically significant difference according to *Per2* mutation. (C), Survival rate in WT (dark circle) and *Per2*^{m/m} (open circle) mice exposed to DEN at ZT11. The survival rate was largest in WT as compared to *Per2*^{m/m} mice (Log-rank, $p = 0.009$).

Figure 3. DEN-induced liver tumors according to *Per2* loss-of-function. **(A)**, Typical macroscopic (a), Small and large liver cell dysplasia (b), hepatocarcinoma (c), and cholangiocarcinoma (d), found 4 months after DEN exposure completion. **(B)**, Number of hepatic tumor nodules per mouse liver in WT (black boxes) and *Per2^{m/m}* mice (open boxes) (Log-rank test, $p= 0.01$). **(C)**, Number of hepatocarcinomas (open box) or cholangiocarcinomas (dark box) in WT and *Per2^{m/m}* mice. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$.

Figure 4. Circadian dynamics of rest-activity and body temperature parameters according to *Per2* loss-of-function and DEN exposure. **(A)**, Acrophase charts for rest-activity (left panel) and body temperature (right panel). Each acrophase is displayed with its 95% C.L. for WT (dark circles) and *Per2^{m/m}* (open circles) before, during the initial 3 weeks (weeks 1-3) and the subsequent 4 weeks on DEN (weeks 4-7), and after exposure (weeks 8-25). **(B)**, Corresponding histograms of 24-h mean amplitudes with 95% C.L. for rest-activity (left panel) and body temperature (right panel) in WT (dark boxes) and *Per2^{m/m}* (open boxes). * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$.

Figure 5. Examples of circadian physiology records in mice according to *Per2* loss-of-function and DEN exposure. Representative double-plots of temperature **(A)** and activity **(B)** rhythms according to *Per2* loss-of-function and DEN exposure. The vertical black lines indicate exposure to DEN or vehicle (control) for 7 weeks. **(C)** Relation between acrophases of rest-activity and body temperature rhythms 7 weeks after DEN exposure onset in individual WT mice (left) and *Per2^{m/m}* mice (right). Note robust coordination in WT and internal desynchronization in *Per2^{m/m}*.

Figure 6. DEN-induced alterations of liver circadian patterns of clock, proliferation, genomic instability and inflammation markers according to *Per2* loss-of-function. Each data point is mean of 5 to 7 mice at each of 6 Zeitgeber Times (ZT) for WT (left panels) or *Per2^{m/m}* mice (right panels). Circadian mRNA expression of **(A)** clock genes *Clock*, *Bmal1*, *Rev-erba*, *Cry1*, and *Cry2*; **(B)** proliferation and genomic instability genes *Ccnb1*, *K-ras*, *c-Myc*, *Wee1*, *Bcl2*,

P53, and *ATM*. (C), Circadian pattern of liver cytokines IL-6 and TNF- α concentrations. * denotes statistical validation of 24-h rhythm with Cosinor ($p < 0.05$).

Figure 7. Dynamics of rest-activity, temperature and plasma corticosterone rhythms during early stage liver carcinogenesis according to *Per2* loss-of-function. (A), Chronograms of telemetered rest-activity (left) and body temperature (right) in WT and *Per2*^{m/m} before and during daily DEN exposure for 17 days. (B), Corresponding mean circadian acrophases with 95% C.L. in WT (dark circles) and *Per2*^{m/m} (open circles). (C), Corresponding mean circadian amplitudes with 95% C.L. in WT (dark boxes) and *Per2*^{m/m} (open boxes). (D), Twenty-four hour changes in mean plasma corticosterone concentration (\pm SEM) in untreated WT and *Per2*^{m/m} mice (Control, left panel) and in WT and *Per2*^{m/m} mice after a 17-day DEN exposure (right panel). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Figure 1

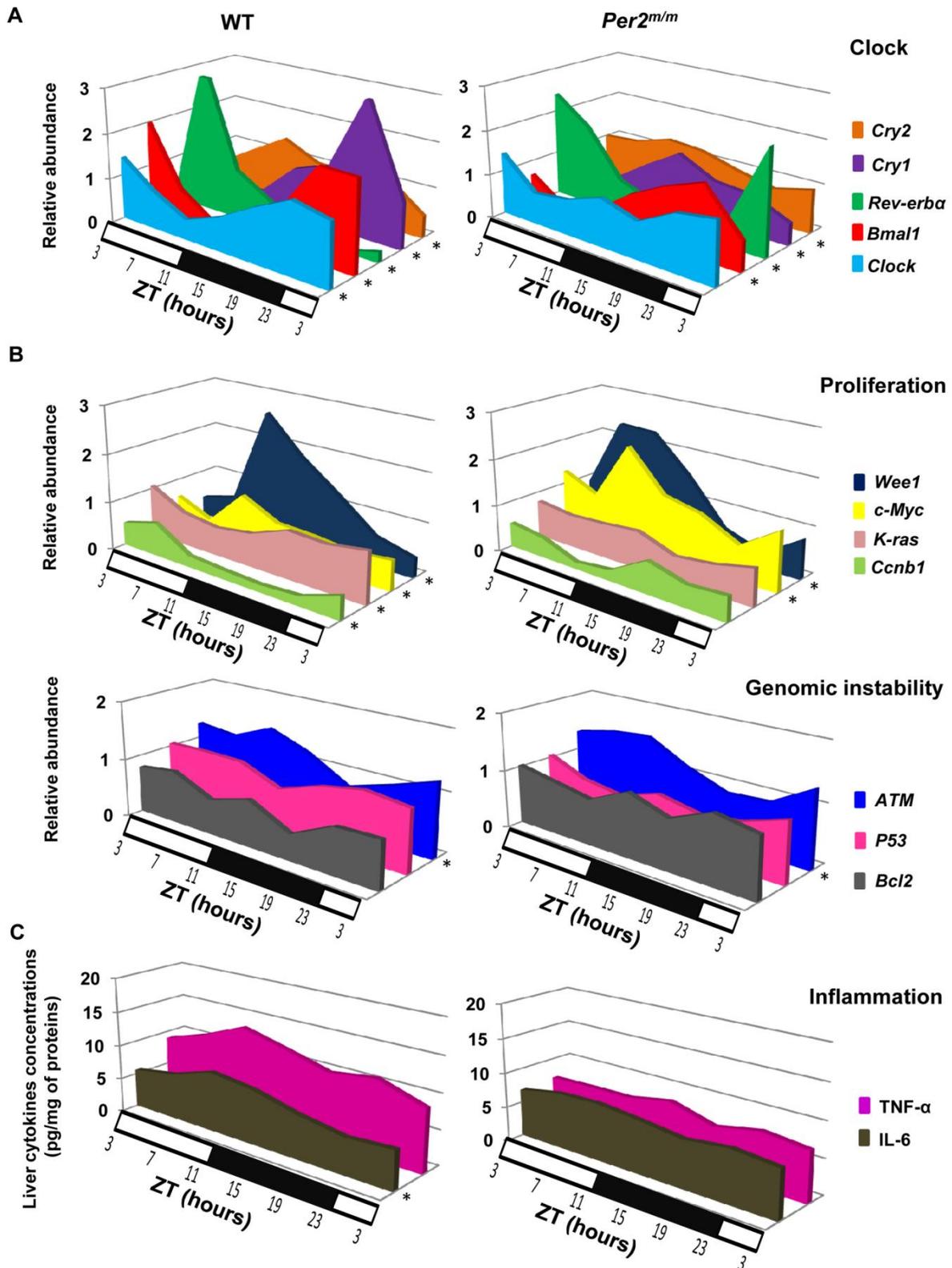


Figure 2

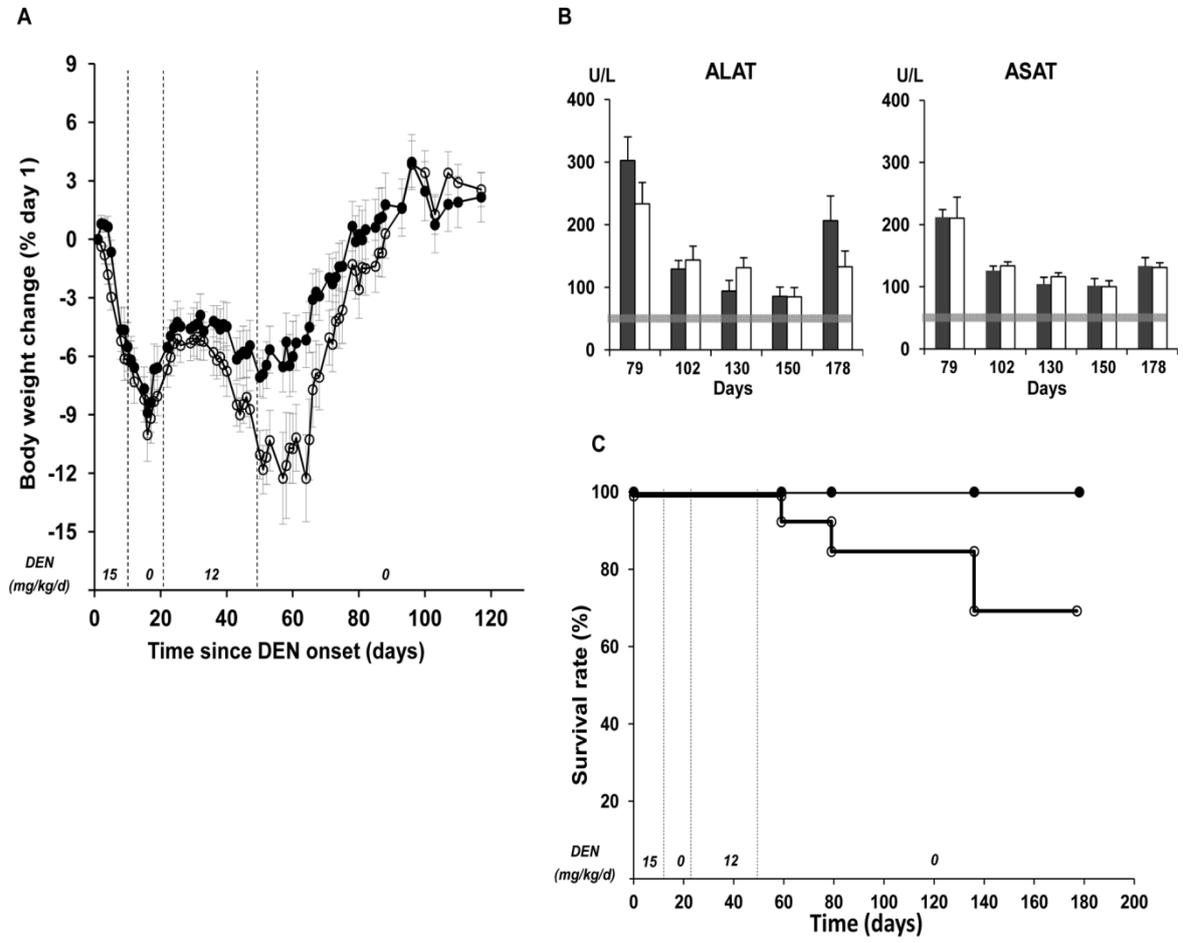


Figure 3

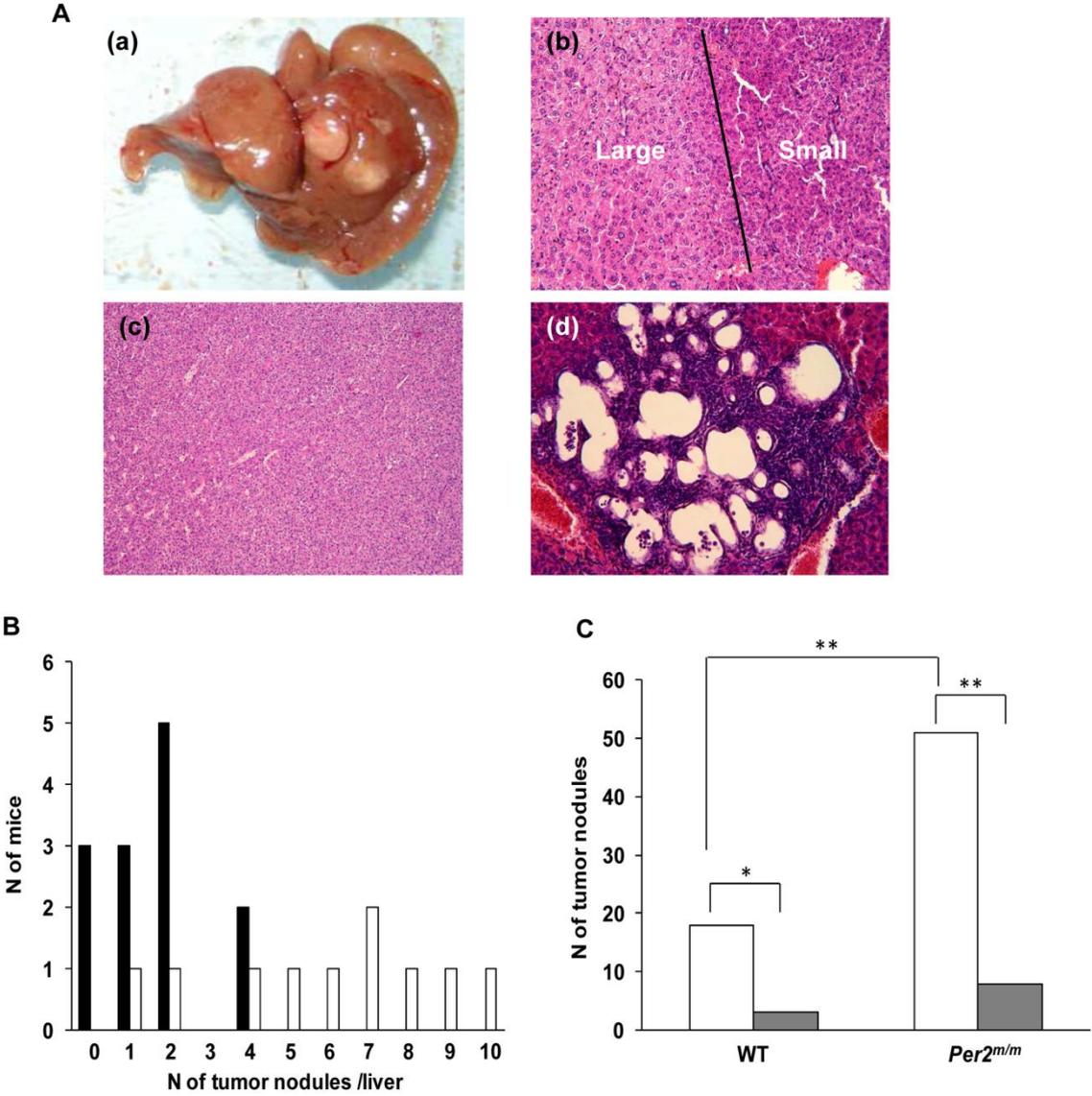


Figure 4

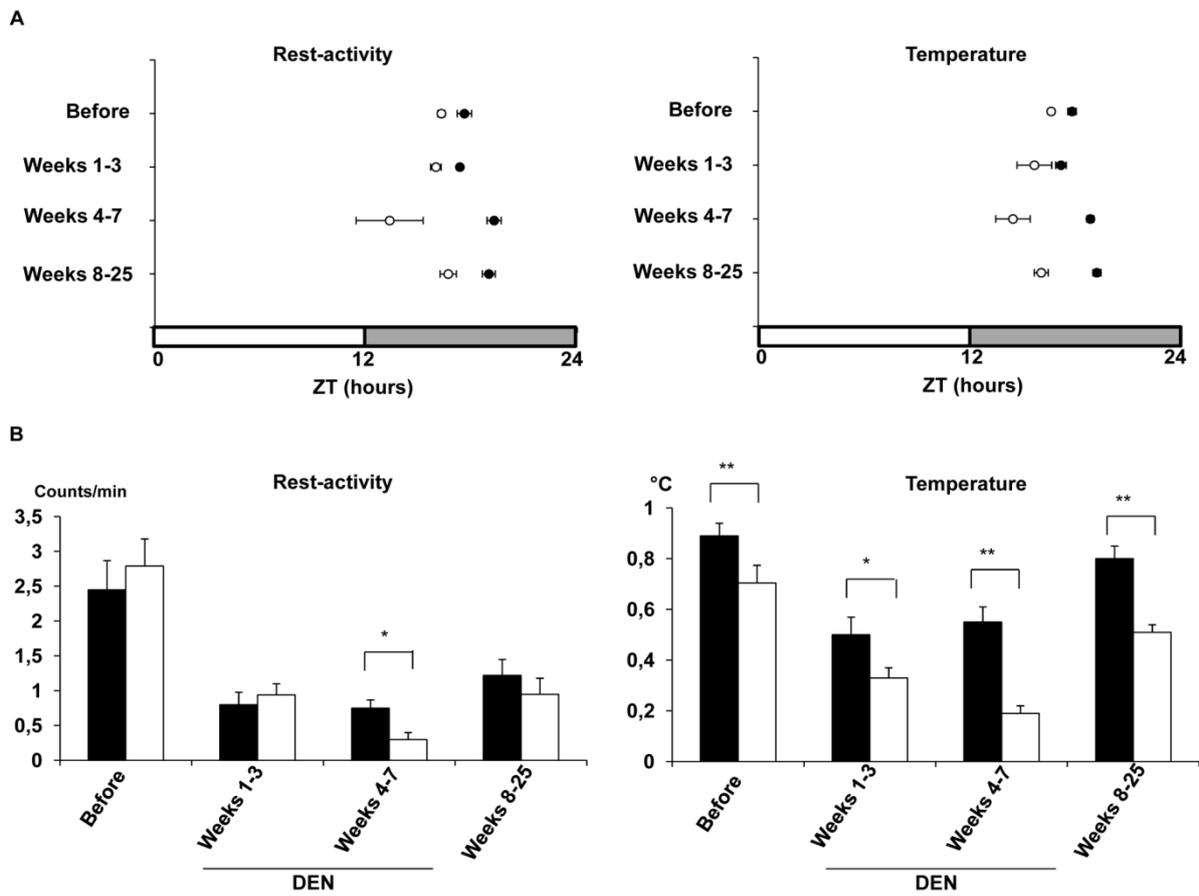


Figure 5

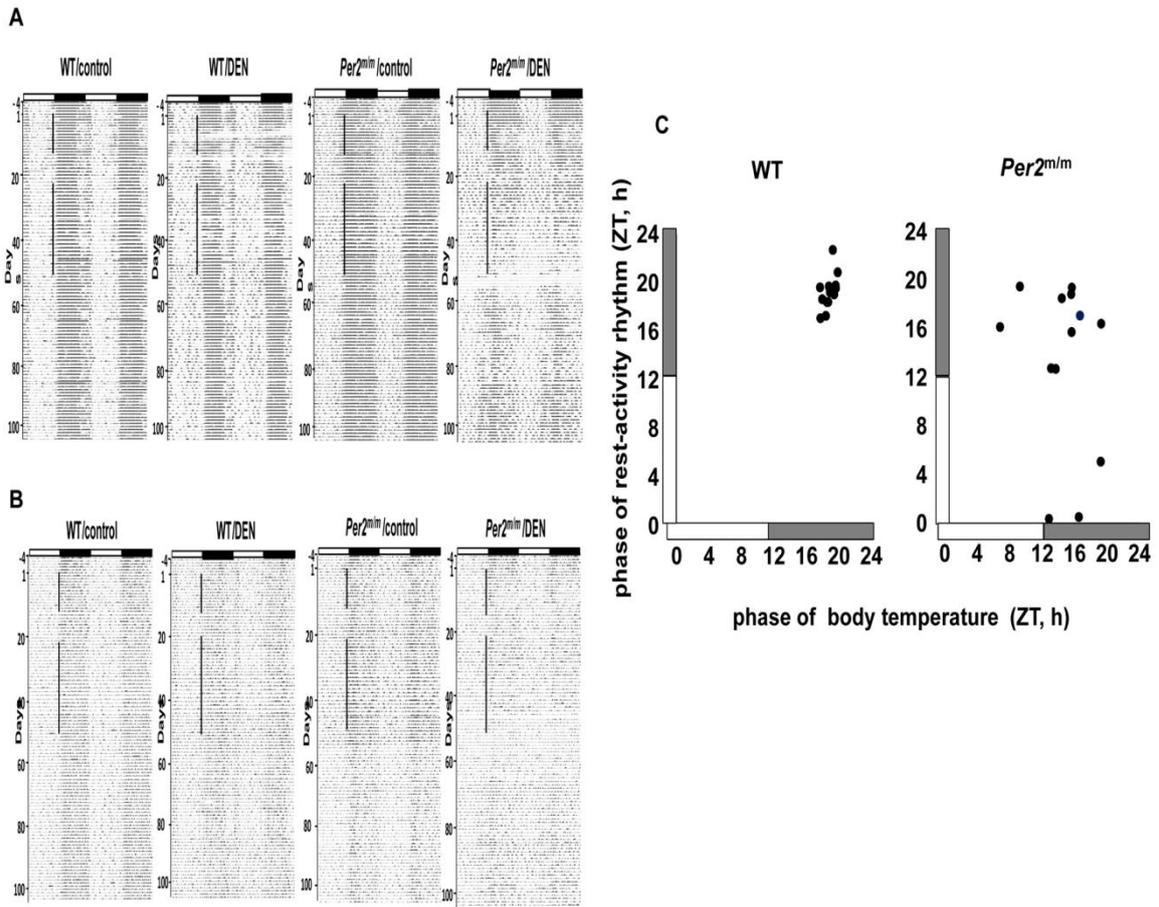


Figure 6

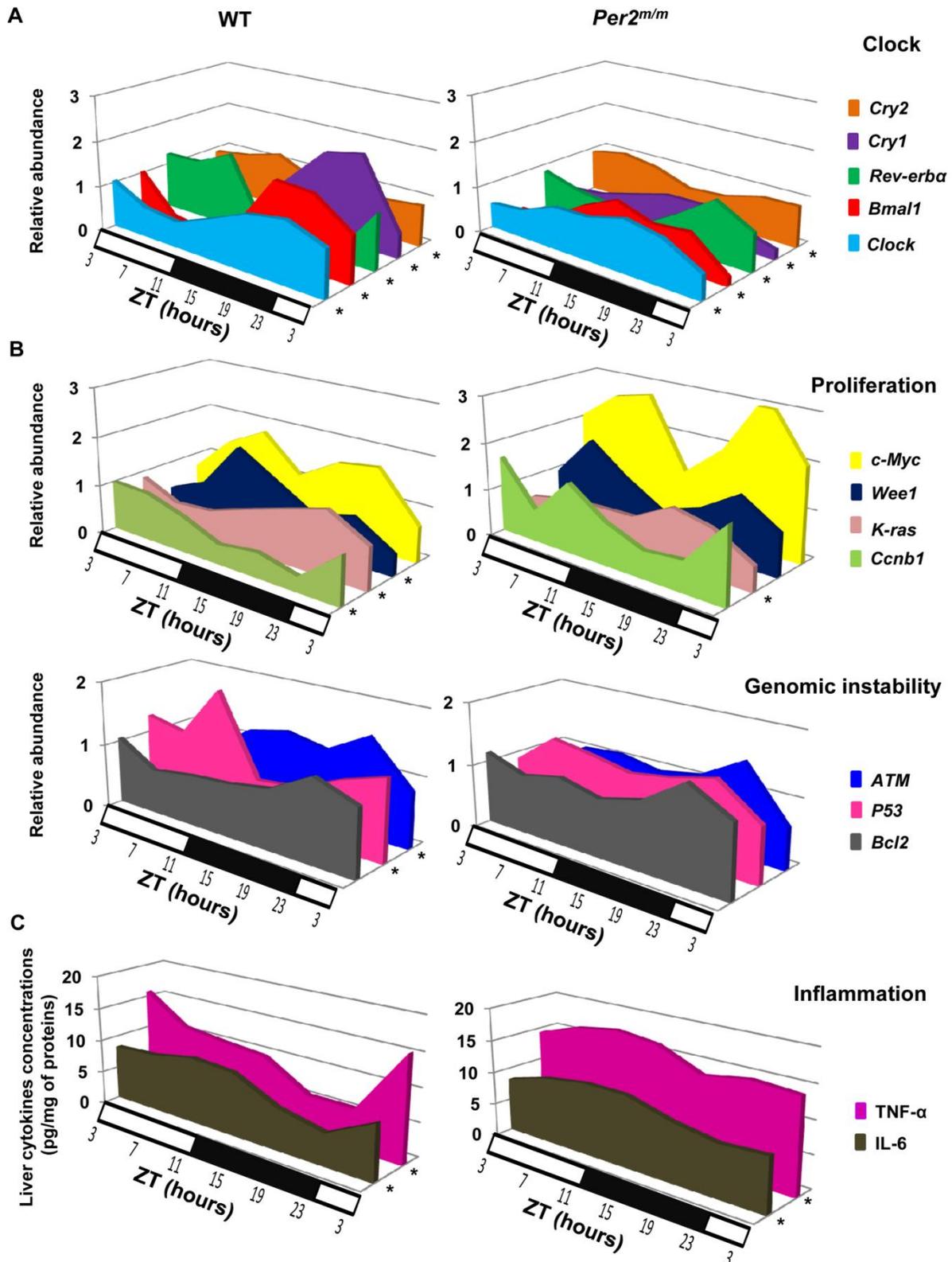


Figure 7

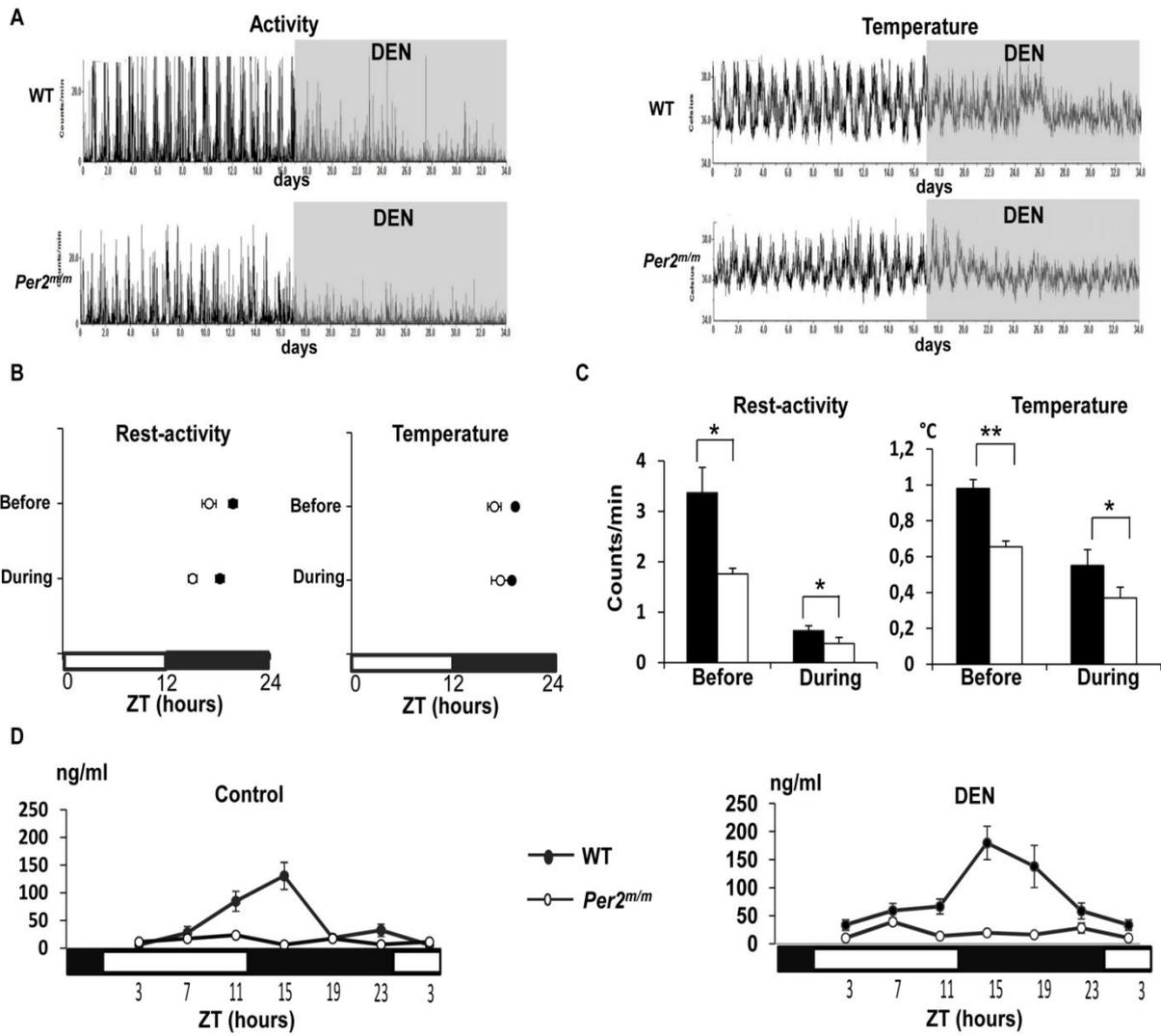


Table S1: Circadian rhythms of selected gene mRNA expressions and cytokine concentrations in the liver of control WT and *Per2^{mv/m}* mice (Results from cosinor analysis with $\tau=24h$)

Function	Gene	Genotype	<i>p</i>	Mesor [95% CL]	Amplitude [95% CL]	Acrophase, ZT : min [95% CL]	
Clock	Clock	WT	<0.001	1.03 [0.91 to 1.15]	0.56 [0.38 to 0.73]	23:35 [22:20 to 00:45]	
		<i>Per2^{mv/m}</i>	0.13	0.97 [0.83 to 1.1]	0.19	22:25	
	Bmal1	WT	<0.001	1.02 [0.84 to 1.19]	1.04 [0.8 to 1.28]	00:30 [23:30 to 1:30]	
		<i>Per2^{mv/m}</i>	<0.001	0.82 [0.69 to 0.96]	0.74 [0.55 to 0.94]	20:45 [19:45 to 21:45]	
	Rev-erba	WT	<0.001	0.86 [0.46 to 1.25]	1.24 [0.79 to 1.72]	8:05 [6:20 to 9:55]	
		<i>Per2^{mv/m}</i>	<0.001	1.04 [0.82 to 1.25]	1.01 [0.7 to 1.31]	5:00 [3:50 to 6:10]	
	Cry1	WT	<0.001	1.25 [0.99 to 1.51]	1.07 [0.71 to 1.43]	21:50 [20:30 to 23:10]	
		<i>Per2^{mv/m}</i>	<0.001	0.82 [0.7 to 0.94]	0.44 [0.27 to 0.61]	16:40 [15:10 to 18:10]	
	Cry2	WT	0.04	1 [0.85 to 1.15]	0.25 [0.02 to 0.48]	13:35 [9:20 to 17:40]	
		<i>Per2^{mv/m}</i>	0.04	1.05 [0.93 to 1.17]	0.22 [0.05 to 0.39]	11:40 [8:25 to 15:00]	
	Genome instability	P53	WT	0.23	1.01 [0.91 to 1.11]	0.12	3:00
			<i>Per2^{mv/m}</i>	0.15	0.81 [0.74 to 0.88]	0.09	1:30
Bcl2		WT	0.19	0.71 [0.62 to 0.81]	0.12	5:10	
		<i>Per2^{mv/m}</i>	0.63	0.98 [0.82 to 1.14]	0.1	22:40	
ATM		WT	0.02	1.16 [1.04 to 1.29]	0.25 [0.08 to 0.42]	9:00 [6:00 to 12:00]	
		<i>Per2^{mv/m}</i>	<0.001	1.22 [1.12 to 1.32]	0.34 [0.19 to 0.49]	8:20 [6:30 to 10:10]	
Proliferation	Wee1	WT	<0.001	1.24 [0.98 to 1.50]	1.02 [0.65 to 1.38]	13:20 [12:00 to 14:40]	
		<i>Per2^{mv/m}</i>	<0.001	1.34 [1.15 to 1.52]	1.12 [0.86 to 1.38]	10:00 [9:00 to 11:00]	
	Ccnb1	WT	0.004	0.32 [0.23 to 0.41]	0.24 [0.11 to 0.37]	5:40 [3:25 to 7:40]	
		<i>Per2^{mv/m}</i>	0.25	0.41 [0.24 to 0.58]	0.19	23:20	
	c-Myc	WT	0.046	0.64 [0.54 to 0.74]	0.17 [0.04 to 0.3]	13:40 [10:20 to 17:00]	
		<i>Per2^{mv/m}</i>	0.038	1.27 [1.02 to 1.52]	0.46 [0.11 to 0.81]	11:40 [8:25 to 15:00]	
	K-ras	WT	0.009	0.82 [0.72 to 0.92]	0.24 [0.09 to 0.38]	23:20 [20:50 to 25:50]	
		<i>Per2^{mv/m}</i>	0.31	0.69 [0.6 to 0.78]	0.09	8:40	
Inflammation	IL-6	WT	0.04	6.72 [5.8 to 7.64]	1.7 [0.4 to 3]	12:15 [8:50 to 15:40]	
		<i>Per2^{mv/m}</i>	0.17	7.55 [7.14 to 7.96]	0.55	10:00	
	TNF- α	WT	0.29	9.3 [8.1 to 10.5]	1.3	12:45	
		<i>Per2^{mv/m}</i>	0.93	7.45 6.52 to 8.38	0.25	14:20	

Table S2: Circadian rhythms of selected gene mRNA expressions and cytokine concentrations in the liver of WT and *Per2^{m/m}* mice exposed to DEN (Results from cosinor analysis with $\tau=24h$)

Function	Gene	Genotype	<i>p</i>	Mesor [95% CL]	Amplitude [95% CL]	Acrophase, ZT : min [95% CL]
Clock	Clock	WT	<0.001	0.96 [0.89 to 1.03]	0.41 [0.29 to 0.53]	21:50 [20:40 to 23:00]
		<i>Per2^{m/m}</i>	<0.001	0.85 [0.77 to 0.93]	0.27 [0.15 to 0.39]	17:40 [15:55 to 19:25]
	Bmal1	WT	<0.001	0.87 [0.76 to 0.98]	0.89 [0.73 to 1.05]	21:45 [21:00 to 22:30]
		<i>Per2^{m/m}</i>	<0.001	0.64 [0.55 to 0.73]	0.42 [0.3 to 0.54]	17:00 [15:50 to 18:10]
	Rev-erba	WT	<0.001	0.74 [0.57 to 0.91]	0.85 [0.61 to 1.09]	7:20 [6:20 to 8:20]
		<i>Per2^{m/m}</i>	<0.001	0.71 [0.63 to 0.79]	0.39 [0.28 to 0.5]	00:10 [23:10 to 1:10]
	Cry1	WT	<0.001	1 [0.88 to 1.12]	1.03 [0.86 to 1.2]	20:30 [19:50 to 21:10]
		<i>Per2^{m/m}</i>	<0.001	0.49 [0.43 to 0.55]	0.27 [0.19 to 0.35]	16:40 [15:30 to 17:50]
	Cry2	WT	0.03	0.93 [0.84 to 1.02]	0.17 [0.05 to 0.29]	9:10 [6:00 to 12:20]
		<i>Per2^{m/m}</i>	<0.001	0.84 [0.78 to 0.90]	0.18 [0.1 to 0.26]	5:35 [3:45 to 7:35]
Genome instability	P53	WT	0.04	1.14 [0.94 to 1.34]	0.38 [0.1 to 0.66]	7:40 [4:20 to 11:00]
		<i>Per2^{m/m}</i>	0.91	1.02 [1.06 to 1.34]	0.04	14:45
	Bcl2	WT	0.08	0.93 [0.78 to 1.08]	0.26	22:50
		<i>Per2^{m/m}</i>	0.06	1.11 [1 to 1.22]	0.2	23:30
	ATM	WT	0.007	1.12 [0.99 to 1.25]	0.32 [0.14 to 0.5]	18:50 [16:30 to 21:10]
		<i>Per2^{m/m}</i>	0.32	1.06 [0.94 to 1.18]	0.12	18:50
Proliferation	Wee1	WT	0.009	0.97 [0.78 to 1.17]	0.42 [0.14 to 0.70]	13:10 [10:40 to 15:40]
		<i>Per2^{m/m}</i>	0.09	1.15 [0.95 to 1.35]	0.31	5:10
	Ccnb1	WT	0.02	0.64 [0.48 to 0.8]	0.33 [0.11 to 0.55]	6:40 [3:40 to 9:40]
		<i>Per2^{m/m}</i>	0.19	0.99 [0.77 to 1.21]	0.28	7:00
	C-myc	WT	0.79	1.4 [1.12 to 1.68]	0.13	15:30
		<i>Per2^{m/m}</i>	0.43	2.33 [1.95 to 2.71]	0.34	3:20
	K-ras	WT	<0.001	0.88 [0.78 to 0.97]	0.39 [0.25 to 0.52]	21:20 [19:50 to 22:40]
		<i>Per2^{m/m}</i>	0.006	0.84 [0.73 to 0.94]	0.26 [0.11 to 0.41]	19:00 [16:30 to 21:30]
Inflammation	IL-6	WT	0.001	7.9 [7.1 to 8.7]	2.36 [1.18 to 3.54]	10:25 [8:30 to 12:20]
		<i>Per2^{m/m}</i>	<0.001	9.5 [8.9 to 10.1]	1.7 [0.9 to 2.5]	12:00 [10:00 to 14:00]
	TNF- α	WT	0.004	10 [8.6 to 11.4]	3.5 [1.5 to 5.5]	6:40 [4:30 to 8:50]
		<i>Per2^{m/m}</i>	0.023	15.57 [14.73 to 16.41]	1.7 [0.5 to 2.9]	10:45 [7:50 to 13:40]

V.3. Rôle des gènes *Cry1* et *Cry2* dans la cancérogénèse hépatique

V.3.1 Résumé

Ali Mteyrek¹, Elisabeth Filipinski¹, Catherine Guettier², Malgorzata Oklejewicz³, Gijsbertus T.J. van der Horst³, Francis Lévi¹

Contexte/objectifs: Un réseau d'horloges biologiques génère des rythmes de 24 heures du métabolisme et de la prolifération hépatique. La disruption circadienne provoquée par un décalage horaire chronique ou par la mutation du gène de l'horloge *Per2* a quadruplé le développement d'hépatocarcinomes chez les souris. Ici, le rôle des gènes *Cry1* et *Cry2* a été examiné dans la cancérogénèse hépatique, compte tenu d'effets divergents rapportés entre les gènes *Per* et *Cry* vis à vis de la toxicité des xénobiotiques.

Méthodes: Des souris males sauvages et *Cry1*^{-/-}*Cry2*^{-/-} de fonds génétique C57Bl/6 synchronisées en LD12 : 12, ont reçu de la diéthylnitrosamine (DEN) par voie péritonéale en fin de phase de repos diurne (Zeitgeber Time 11 ; 406 mg/kg). Les rythmes de l'activité-repos et de la température corporelle ont été enregistrés à l'aide d'un capteur implanté. Les transaminases sériques (ALAT, ASAT) ont été déterminées 4 fois de 4 à 7 mois après le début de l'exposition à la DEN. La concentration sérique de phosphatases alcalines (PAL) a été déterminée à 7 mois. Les foies ont été prélevés à 7 mois pour quantifier le nombre de nodules tumoraux.

Résultats: Cinq mois après le début du traitement par DEN, les souris *Cry1*^{-/-}*Cry2*^{-/-} ont développé des dysplasies hépatiques associées à une augmentation des taux d'ALAT et ASAT. L'amplitude circadienne des rythmes d'activité-repos et de température corporelle était réduite de moitié chez les souris *Cry1*^{-/-}*Cry2*^{-/-}. L'exposition à la DEN a induit 5 fois plus de cancers hépatiques primaires chez les souris *Cry1*^{-/-}*Cry2*^{-/-} par rapport aux souris sauvages ($p= 0.01$). L'étude microscopique a montré une réduction de 2 fois de nombre d'hépatocarcinomes, et une augmentation de 6 fois de nombre de cholangiocarcinomes chez les souris *Cry1*^{-/-}*Cry2*^{-/-} en comparaison des souris sauvages.

Conclusions: Cette étude a révélé un rôle essentiel des gènes *Cry1* et *Cry2* dans la cancérogénèse des voies biliaires, et indique que la disruption circadienne moléculaire accélère la cancérogénèse hépatique.

Critical cholangiocarcinogenesis control by cryptochrome clock genes

Ali Mteyrek¹, Elisabeth Filipski¹, Catherine Guettier², Gijsbertus T.J. van der Horst³, Francis Lévi¹

¹ INSERM, UMRS 776 « Rythmes Biologiques et Cancers » & Université Paris 11, CAMPUS CNRS, Villejuif F-94807, France

² Laboratory of Anatomy and Pathologic Cytology, Hôpital Paul Brousse, Villejuif F-94800, France

³ Department of Genetics, Center for Biomedical Genetics, Erasmus University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands

Word count: 4901

Number of figures and tables: 4 figures

List of abbreviations: HCC: Hepatocarcinoma; CCA: Cholangiocarcinoma; DEN: diethylnitrosamine; CTS: Circadian Timing System; TTFL: Transcription–Translation Feedback Loop; Per: Period; Cry: Cryptochrome; *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}*: Cry1 and Cry2 double deficiency WT: Wild Type; ZT: Zeitgeber Time; AST: Aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; ALP: Alkaline phosphatases.

Conflict of interests: The authors declare no conflict of interest.

Financial support: This work was supported by grant ANR 2009-SYSB-002-01-04 (ERASySBio+ and FP7) to the C5Sys project, and by the Association pour la Recherche sur le Temps Biologique et la Chronothérapie (ARTBC International, hospital Paul Brousse, Villejuif, France).

Abstract

Background/Aims: A network of molecular circadian clocks generates 24-hour rhythms in liver metabolism and proliferation. Circadian disruption through chronic jet lag or *Per2* clock gene mutation was shown to accelerate hepatocarcinoma formation up to fourfold in mice. Since divergent effects were reported for clock genes *Per* and *Cry* regarding xenobiotic toxicity, we questioned the role of *Cry1* and *Cry2* in liver carcinogenesis.

Methods: Male WT and *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* mice (C57Bl/6 background) were chronically treated with diethylnitrosamine (DEN) at ZT11. Rest-activity and body temperature rhythms were monitored using an implanted radio transmitter. Serum transaminases (ALT, AST) were determined on four occasions 4 to 7 months after DEN exposure onset. After 7 months, serum ALP was determined and livers were isolated for microscopic tumor nodule counting.

Results: Five months after initiation of DEN treatment, *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* mice developed liver dysplasia, as evident from the increased AST, ALT and ALP levels, as compared to WT mice. Circadian amplitudes in rest-activity and body temperature were halved in *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* mice. DEN exposure induced primary liver cancers in nearly fivefold as many *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* mice as compared to WT mice ($p= 0.01$). Microscopic study revealed a 2-fold reduction in the number of hepatocarcinomas and a 6-fold increase in the number of cholangiocarcinomas in *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* mice, as compared to WT mice.

Conclusions: The pronounced shift towards cholangiocarcinoma in DEN exposed *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* mice revealed a critical role of the *Cry* clock genes in bile duct carcinogenesis, and supports the concept that molecular clock disruption conveys a strong liver carcinogenesis potential.

Word count: 249

Key words: Circadian rhythm; Liver carcinogenesis; Cholangiocarcinoma; *Cry1* gene; *Cry2* gene; Molecular circadian clock; Mouse; Diethylnitrosamine

Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) and cholangiocarcinoma (CCA) constitute the vast majority of primary liver cancers, the third cause of cancer-related mortality worldwide. These liver cancers are derived from the respective malignant transformation of hepatocytes and bile duct epithelial cells (Mancuso, 2013; Zabron *et al.*, 2013). Diethylnitrosamine (DEN) is a hepatic carcinogen that usually induces HCC in rodents and has been considered as a relevant experimental model of poor prognosis human HCC (Lee *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005; Heindryckx *et al.*, 2009). DEN also induces CCA in mice with bile duct ligation (Yang *et al.*, 2011; De Minicis *et al.*, 2013).

The mammalian Circadian Timing System (CTS) regulates behavioral and physiological processes over the 24 hours. Endogenous circadian rhythms are mainly synchronized to the regular day-night cycle by light. The liver is one of the most rhythmic organs in the body. Prior studies show that approximately 15% of liver transcriptome and proteome display circadian variations (Vollmers *et al.*, 2009; Schmutz *et al.*, 2012; Vollmers *et al.*, 2012). In addition, a wide range of critical liver metabolic pathways is controlled by the circadian clock, involving amino acid, carbohydrate, lipid, nucleotide, and xenobiotic metabolism (Eckel-Mahan *et al.*, 2012; Fustin *et al.*, 2012). The CTS is coordinated by the suprachiasmatic nucleus (SCN) in the hypothalamus, which acts as a central pacemaker. The SCN generates rhythmic physiology and coordinates molecular circadian clocks in peripheral organs, including the liver (Kornmann *et al.*, 2007b; Bass *et al.*, 2010; Mohawk *et al.*, 2012). The molecular clock, which resides within almost all cells, consists of at least three interconnected transcription–translation feedback loops (TTFL) that control rhythmic gene expression patterns with a near 24 h period (Partch *et al.*, 2013). The core TTFL is driven by activator elements BMAL1 and CLOCK or NPAS2, which activate the transcription of target genes containing E-box cis-regulatory enhancer sequences, including *Period (Per)* 1, 2, and 3 genes and *Cryptochrome (Cry)* 1 and 2 genes. In turn, PER::CRY heterodimers accumulate in the nucleus and suppress transcription of their own genes by acting on the CLOCK:BMAL1 complex, and as such form the main inhibitory loop of the TTFL (Mohawk *et al.*, 2012).

Several epidemiologic studies, as well as an international expertise by the World Health Organisation have concluded that “shift-work that involves circadian disruption is probably carcinogenic to humans” (Straif *et al.*, 2007; Knutsson *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013). Indeed, circadian disruption accelerates experimental cancer progression in mice with SCN ablation or experiencing chronic jet lag, while oppositely CTS reinforcement with meal

timing inhibits cancer growth (Filipski *et al.*, 2002; Filipski *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2010). Host circadian disruption was further associated with fast tumor progression and poor survival in cancer patients (Innominato *et al.*, 2012; Ortiz-Tudela *et al.*, 2013).

Constant light or chronic jet lag exposure has been shown to promote diethylnitrosamine-induced (DEN) liver carcinogenesis, resulting in increased formation of a majority of hepatocarcinomas and few cholangiocarcinomas in rats and mice (van den Heiligenberg *et al.*, 1999; Filipski *et al.*, 2009). Constitutive *Per2* mutation, such as that in *Per2^{m/m}* mice, was shown to increase HCC incidence 4-fold, but only few cholangiocarcinomas were observed. Mechanisms included the up-regulation of *c-Myc* and *Ccnb1* transcription, an increased inflammatory response, and the suppression of the circadian control of genomic instability and proliferation genes in liver during the cancer initiation stage (Mteyrek *et al.*, Submitted). *Per2^{m/m}* mice displayed severely deregulated *Cry1* transcription in the liver. DEN exposure further deteriorated *Cry1* mRNA expression patterns in *Per2^{m/m}*, while no alteration was found in WT mice (Mteyrek *et al.*, Submitted 2013). These findings suggest a potential role for *Cry* genes in liver carcinogenesis. *Cry1* and *Cry2* are involved in the negative loop of the circadian molecular clock. Thus the combined inactivation of *Cry1* and *Cry2* in mice reportedly suppressed rest-activity, core body temperature and corticosterone secretion following constant darkness exposure (van der Horst *et al.*, 1999; Lamia *et al.*, 2011).

Here, we investigate the effect of *Cry1/Cry2* deficiency in liver carcinogenesis in mice chronically exposed to diethylnitrosamine (DEN). We show that *Cry1/Cry2* deficiency increased liver carcinogenesis nearly 5-fold and caused a very pronounced shift in tumor spectrum from HCC to CCA.

Methods and materials

Mice and Study design

This study was conducted in accordance with the guidelines approved for animal experimental procedures by the French Ethical Committee (decree 87-848).

We investigated the effect of *Cry1/Cry2* deficiency in diethylnitrosamine (DEN)-induced liver cancer in male C57Bl/6 mice. Eighteen Wild-Type (WT) and 17 *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* aged from 8 to 16 weeks were used. Mice were kept under a regular 12 hr light/12 hr dark schedule at ambient temperature (21°C-23°C) for at least 3 weeks before starting DEN

administration and throughout experiment, with food and water ad libitum. Light intensity in the cage ranged from 240 to 580 lux according to cage location. The lights were on from 4:00 (Zeitgeber time, ZT0) to 16:00 (ZT12). Rest-activity/body temperature transmitters (Physio Tel, TA 10 TA-F20, Data Sciences, St. Paul, Minnesota) were implanted into the peritoneal cavity of mice under isoflurane anesthesia two weeks before the onset of DEN exposure.

DEN (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) was administered intraperitoneally (i.p.) at ZT11 (1h before darkness onset) to 16 WT and 15 *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* mice, while 2 mice received NaCl 0.9% and served as control animals for each genotype. Treated mice received daily DEN doses of 12 mg/kg from day 1 to 17 and from day 29 to 33, followed by 10 mg/kg from day 43 to 68, resulting in a cumulative dose of 406 mg/kg. Body weight was recorded daily before each DEN injection and three times a week thereafter. Mortality was checked daily throughout the experiment. Blood was sampled from the retro-orbital sinus on days 142, 164, 186, and 211. Aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) activities were determined in the sera using a Synchron LX20 Clinical System (Beckman Coulter, Villepinte, France). Alkaline phosphatases (ALP) serum levels were measured at the last sampling time point. All mice underwent telemetric circadian monitoring of rest-activity and body temperature rhythms for 5 days before DEN exposure and for 150 days thereafter. All the mice were euthanized 211 days after DEN exposure onset. Livers, kidneys, and lungs were removed for pathology and histological studies.

Histological studies

Immediately after sacrifice, mice were autopsied and macroscopic liver nodules were counted. Liver, lungs, and kidneys were collected from each mouse for serial histological slides (3 slices per mouse). All tissues were fixed with 4% formaldehyde for 24 hours, dehydrated, embedded in paraffin, then cut in 4 μ m sections and stained with hematoxylin-eosin-saffron. Slides were examined blindly for the presence and the type of microscopic tumor nodules by a senior pathologist (C.G).

Data analyses

Quantitative data were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Intergroup differences were compared using multiple-way analyses of variance (ANOVA), Chi-square,

T-student and log-rank tests, according to data characteristics. Body temperature and activity data were obtained using Dataquest software. The statistical significance of sinusoidal rhythmicity was documented by cosinor analysis. This method estimates the rhythm characteristics: mesor (24-h mean), amplitude (half the difference between maximum and minimum value of fitted cosine function) and acrophase (time of maximum in fitted cosine function, with light onset as phase reference). A rhythm period $\tau = 24$ hours was considered a priori. A P-value < 0.05 was considered statistically significant. All statistical analyses were performed using SPSS statistical analysis software version 18 (Statistical Package for Social Sciences, Chicago, IL).

Results

Systemic toxicity of DEN in WT and *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* mice

After the start of DEN treatment, we observed a marked loss of body weight in WT and *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* mice. As a result, the daily DEN dose was reduced from 12 to 10 mg/kg. Body weight loss was largest in WT mice as compared to *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* mice (ANOVA, $p < 0.001$). Maximum mean body weight loss was 13.9 ± 1.8 % in WT mice, while it was 7.6 ± 1.5 % in *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* mice (Figure 1A). Complete body weight recovery was nearly twice as fast in *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* as compared to WT mice (42 vs 92 days).

DEN induced mortality in 2/16 WT mice (13%) as compared to 6/15 *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* (40%) over the 7-months study span (Log-rank test, $p = 0.1$) (Figure 1B). The two dead WT mice displayed histological evidence of liver inflammation and dysplasia, in association with severe body weight loss on days 41(-40%) and 161(-15%) respectively. These alterations were most pronounced in *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* mice which displayed (a) severe liver inflammation and dysplasia including apoptotic and necrotic hepatocytes, in association with body weight loss (two mice dead on day 33 and 131), (b) precancerous liver dysplasia (two mice dead on day 189 and 194), and (c) liver tumor nodules (two mice dead on day 204 and 205). Tumor counts for these WT and *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* mice combined with those obtained from animals sacrificed at day 211.

Serum ALT activity was significantly increased in mice of both genotypes on days 186 and 211 only, with levels that were nearly doubled in *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* mice as compared to WT animals ($p < 0.05$) (Figure 1C). From days 142 to 211, AST serum activities increased in

DEN-treated WT and *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* mice, as compared to untreated control animals. AST activity was 1.6-fold as high on days 142 and 164, and twice as high on days 186 and 211 for *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* as compared to WT ($p < 0.01$ to $p < 0.05$) (Figure 1D). ALP levels remained unaltered in DEN treated WT mice, while they were doubled in *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* mice as compared to untreated control animals. Indeed, on DEN exposure, serum ALP concentration was three-fold increased in *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* mice as compared to WT mice on day 211 ($p < 0.001$) (Figure 1E).

DEN induced liver carcinogenesis in WT and *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* mice

Macroscopic nodules together with small and large liver cell dysplasia, inflammatory infiltration and apoptotic hepatocytes were observed in all remaining mice at 7 months. *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* animals displayed more primary biliary lesions as compared to WT mice (Figure 2A and B). Histological analyses revealed the occurrence of cholangiocarcinomas (CCA) and hepatocarcinomas (HCC) in animals from both genotypes (Figure 2C and D). DEN also induced lung tubulopapillary tumors in 5 WT and 3 *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* mice. A single primary tumor was found in the kidney of one *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* mouse.

Liver tumors were found in 43 % of WT and in all *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* mice. The average number of tumors per animal including CCA and HCC was 5.4 higher in *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* mice as compared to WT animals (Kruskal-Wallis, $p = 0.01$) (Figure 3A). The number of tumor nodules per liver ranged from 0 to 7 in WT and from 1 to 25 in *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* mice (Fisher's exact test, $p = 0.003$). In addition, the proportion of mice with more than 2 tumors was ~six-fold higher in *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* mice as compared to WT animals (80% vs 14%, Fisher's exact test, $p = 0.01$).

Microscopic study revealed a 2-fold reduction in the number of hepatocarcinomas and a 6-fold increase in the number of cholangiocarcinomas in *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* mice, as compared to WT mice.

Rest-activity and body temperature patterns in WT and *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* mice

Regular 24-h changes were found for rest-activity and body temperature in WT mice. The 24-h patterns in both variables were severely altered in *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* mice (Figure 4A). As a result, cosinor analysis validated statistically significant rhythms, with different characteristics according to genotype. Thus, a phase advance was found for both rest-activity ($p < 0.001$) and body temperature ($p = 0.025$) in *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* mice before DEN exposure (Figure 4B). The circadian amplitude was reduced by ~30% for rest-activity (Hotelling t-test for amplitude comparisons, 1.46 ± 0.26 vs 2.08 ± 0.21 arb units, $p < 0.001$), and nearly halved for body temperature (0.53 ± 0.07 vs $0.96 \pm 0.02^\circ\text{C}$, $p < 0.001$) in *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* animals as compared to WT mice (Figure 4C). DEN exposure further advanced the rest-activity circadian phase by 2 hours in WT (paired t-test, $p = 0.02$), without any alteration in *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* mice. In contrast, the temperature circadian phase was advanced by ~1 hour in WT and ~2 hours in *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* mice (Hotelling t-test for phase comparisons, $p = 0.001$) (Figure 4B). In WT animals, DEN further damped circadian amplitude by ~35% for rest-activity and by 15% for body temperature as compared to their respective baseline values (paired t-test, $p = 0.002$ and $p < 0.001$). The circadian amplitudes of both rhythms were halved in DEN treated *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* mice ($p = 0.013$ for rest-activity and $p < 0.001$ for body temperature) (Figure 4C). After DEN exposure, the circadian acrophases and amplitudes of both rhythms recovered back to baseline values in the mice from both genotypes.

Discussion

To our knowledge, this is the first study that revealed a direct role of *Cry1* and *Cry2* genes in cholangiocarcinogenesis. Notably, the deficiency of *Cry1* and *Cry2* caused a nearly 5-fold increase in the number of CCA induced by the hepatic carcinogen diethylnitrosamine (DEN) in mice. Previous studies demonstrated that prolonged exposure to constant light or to chronic jet lag disrupted the Circadian Timing System of rats and mice respectively. Such environmental circadian disruption accelerated liver carcinogenesis and induced a majority of HCC and few CCA. *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* mice displayed genetically-related severe circadian disruption, as indicated by arrhythmic body temperature, rest-activity, and corticosterone secretion while in constant darkness (van der Horst *et al.*, 1999; Lamia *et al.*, 2011). However, a 24-h rhythm in rest-activity and body temperature was found here in *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* mice exposed to LD12:12. These apparent rhythms in clock-deficient *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* mice

likely originate from light masking and displayed markedly altered characteristics (van der Horst *et al.*, 1999).

Human malignancies display decreased mRNA or protein expressions of *Cry1* and/or *Cry2*, as shown for breast, prostate, colorectal, endometrial, ovarian, and pancreatic cancers, leukemia, glioma, melanoma, hepatocellular carcinoma, and head and neck squamous cell carcinoma (Shih *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2008; Tokunaga *et al.*, 2008; Eisele *et al.*, 2009; Lewintre *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2009; Dai *et al.*, 2011; Hsu *et al.*, 2012; Luo *et al.*, 2012; Mazzoccoli *et al.*, 2012; Grundy *et al.*, 2013; Lengyel *et al.*, 2013; Relles *et al.*, 2013). Yet, the relevance of *Cry1/Cry2* deficiency for carcinogenesis remains debated. A prior report showed that *Cry1/Cry2* deficiency promotes γ -radiation-induced lymphomas in mice (Lee *et al.*, 2010). This could result from increased cell cycling, since *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* fibroblasts were shown to proliferate faster than WT fibroblasts (Destici *et al.*, 2011). However, these findings however contrast with another report showing that *Cry1/Cry2* deficiency has no effect on γ radiation-induced carcinogenesis and mortality in mice (Gauger *et al.*, 2005). This finding is also in line with the lack of any up-regulation of the proto-oncogen *c-Myc* in *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* mouse liver and fibroblasts following radiation exposure, as well as the lack of modifications of cell cycle checkpoints, DNA repair, or apoptosis in *Cry* deficient fibroblasts (Gauger *et al.*, 2005). Moreover, the combination of *Cry1/Cry2* deficiency with *p53* deletion protected mice from the early onset of γ radiation-induced cancers and increased their median lifespan (Ozturk *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2011).

No obvious relation was found in our study between DEN toxicity and cholangiocarcinogenesis. Thus, body weight loss, a marker of systemic toxicity, was least in *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* mice, a finding consistent with increased tolerability of *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* mice to the alkylating drug cyclophosphamide (Gorbacheva *et al.*, 2005).

Here, *Cry1/Cry2* deficiency increased DEN cholangiocarcinogenesis. DEN is known to induce liver carcinogenesis through initial triggering of chronic inflammation (Maeda *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2013). CCA risk factors currently involve chronic biliary inflammation. Indeed, pro-inflammatory cytokine IL-6 was up-regulated in cultured CCA cells. IL-6 up-regulation activated JAK-STAT and NF- κ B signaling pathways. IL-6 increased *Mcl-1* through STAT-3 activation, and prevented apoptosis in CCA cells (Kobayashi *et al.*, 2005; Isomoto *et al.*, 2007). In addition, IL-6 upregulation in CCA dysregulated the cell cycle through activation of P38 MAPK (Tadlock *et al.*, 2001). Indeed, the silencing of *Cry1* and *Cry2* enhanced lipopolysaccharide-induced inflammatory response through increased NF- κ B

and IL-6 activation in mouse hypothalamus, bone marrow macrophages, and fibroblasts (Lamia *et al.*, 2011; Narasimamurthy *et al.*, 2012). Thus the increased biliary carcinogenesis found in *Cry1^{-/-} Cry2^{-/-}* mice could result from an enhanced susceptibility to DEN-induced chronic biliary inflammation.

In summary, our findings are the first demonstration of the role of a circadian clock gene in cholangiocarcinogenesis. *Cry1/Cry2* deficiency sensitizes bile duct epithelium to DEN, and enhances cholangiocarcinoma formation. *Cry1* and/or *Cry2* genes may thus represent a promising target for CCA prevention.

References

Bass J, Takahashi JS (2010). Circadian integration of metabolism and energetics. *Science* **330**(6009): 1349-1354.

Dai H, Zhang L, Cao M, Song F, Zheng H, Zhu X, *et al.* (2011). The role of polymorphisms in circadian pathway genes in breast tumorigenesis. *Breast cancer research and treatment* **127**(2): 531-540.

De Minicis S, Kisseleva T, Francis H, Baroni GS, Benedetti A, Brenner D, *et al.* (2013). Liver carcinogenesis: rodent models of hepatocarcinoma and cholangiocarcinoma. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* **45**(6): 450-459.

Destici E, Oklejewicz M, Saito S, van der Horst GT (2011). Mammalian cryptochromes impinge on cell cycle progression in a circadian clock-independent manner. *Cell cycle* **10**(21): 3788-3797.

Eckel-Mahan KL, Patel VR, Mohney RP, Vignola KS, Baldi P, Sassone-Corsi P (2012). Coordination of the transcriptome and metabolome by the circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**(14): 5541-5546.

Eisele L, Prinz R, Klein-Hitpass L, Nuckel H, Lowinski K, Thomale J, *et al.* (2009). Combined PER2 and CRY1 expression predicts outcome in chronic lymphocytic leukemia. *European journal of haematology* **83**(4): 320-327.

Filipski E, Innominato PF, Wu M, Li XM, Iacobelli S, Xian LJ, *et al.* (2005). Effects of light and food schedules on liver and tumor molecular clocks in mice. *Journal of the National Cancer Institute* **97**(7): 507-517.

Filipski E, King VM, Li X, Granda TG, Mormont MC, Liu X, *et al.* (2002). Host circadian clock as a control point in tumor progression. *Journal of the National Cancer Institute* **94**(9): 690-697.

Filipski E, Subramanian P, Carriere J, Guettier C, Barbason H, Levi F (2009). Circadian disruption accelerates liver carcinogenesis in mice. *Mutation research* **680**(1-2): 95-105.

Fustin JM, Doi M, Yamada H, Komatsu R, Shimba S, Okamura H (2012). Rhythmic nucleotide synthesis in the liver: temporal segregation of metabolites. *Cell reports* **1**(4): 341-349.

Gauger MA, Sancar A (2005). Cryptochrome, circadian cycle, cell cycle checkpoints, and cancer. *Cancer research* **65**(15): 6828-6834.

Gorbacheva VY, Kondratov RV, Zhang R, Cherukuri S, Gudkov AV, Takahashi JS, *et al.* (2005). Circadian sensitivity to the chemotherapeutic agent cyclophosphamide depends on the functional status of the CLOCK/BMAL1 transactivation complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(9): 3407-3412.

Grundy A, Schuetz JM, Lai AS, Janoo-Gilani R, Leach S, Burstyn I, *et al.* (2013). Shift work, circadian gene variants and risk of breast cancer. *Cancer epidemiology* **37**(5): 606-612.

Heindryckx F, Colle I, Van Vlierberghe H (2009). Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research. *International journal of experimental pathology* **90**(4): 367-386.

Hsu CM, Lin SF, Lu CT, Lin PM, Yang MY (2012). Altered expression of circadian clock genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **33**(1): 149-155.

Innominato PF, Giacchetti S, Bjarnason GA, Focan C, Garufi C, Coudert B, *et al.* (2012). Prediction of overall survival through circadian rest-activity monitoring during chemotherapy for metastatic colorectal cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **131**(11): 2684-2692.

Isomoto H, Mott JL, Kobayashi S, Werneburg NW, Bronk SF, Haan S, *et al.* (2007). Sustained IL-6/STAT-3 signaling in cholangiocarcinoma cells due to SOCS-3 epigenetic silencing. *Gastroenterology* **132**(1): 384-396.

Knutsson A, Alfredsson L, Karlsson B, Akerstedt T, Fransson EI, Westerholm P, *et al.* (2013). Breast cancer among shift workers: results of the WOLF longitudinal cohort study. *Scandinavian journal of work, environment & health* **39**(2): 170-177.

Kobayashi S, Werneburg NW, Bronk SF, Kaufmann SH, Gores GJ (2005). Interleukin-6 contributes to Mcl-1 up-regulation and TRAIL resistance via an Akt-signaling pathway in cholangiocarcinoma cells. *Gastroenterology* **128**(7): 2054-2065.

Kornmann B, Schaad O, Reinke H, Saini C, Schibler U (2007). Regulation of circadian gene expression in liver by systemic signals and hepatocyte oscillators. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **72**: 319-330.

Lamia KA, Papp SJ, Yu RT, Barish GD, Uhlenhaut NH, Jonker JW, *et al.* (2011). Cryptochromes mediate rhythmic repression of the glucocorticoid receptor. *Nature* **480**(7378): 552-556.

Lee JH, Sancar A (2011). Circadian clock disruption improves the efficacy of chemotherapy through p73-mediated apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**(26): 10668-10672.

Lee JS, Chu IS, Mikaelyan A, Calvisi DF, Heo J, Reddy JK, *et al.* (2004). Application of comparative functional genomics to identify best-fit mouse models to study human cancer. *Nature genetics* **36**(12): 1306-1311.

Lee JS, Grisham JW, Thorgeirsson SS (2005). Comparative functional genomics for identifying models of human cancer. *Carcinogenesis* **26**(6): 1013-1020.

Lee S, Donehower LA, Herron AJ, Moore DD, Fu L (2010). Disrupting circadian homeostasis of sympathetic signaling promotes tumor development in mice. *PloS one* **5**(6): e10995.

Lengyel Z, Lovig C, Kommedal S, Keszthelyi R, Szekeres G, Battyani Z, *et al.* (2013). Altered expression patterns of clock gene mRNAs and clock proteins in human skin tumors. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **34**(2): 811-819.

Lewintre EJ, Martin CR, Ballesteros CG, Montaner D, Rivera RF, Mayans JR, *et al.* (2009). Cryptochrome-1 expression: a new prognostic marker in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* **94**(2): 280-284.

Li XM, Delaunay F, Dulong S, Claustrat B, Zampera S, Fujii Y, *et al.* (2010). Cancer inhibition through circadian reprogramming of tumor transcriptome with meal timing. *Cancer research* **70**(8): 3351-3360.

Lin YM, Chang JH, Yeh KT, Yang MY, Liu TC, Lin SF, *et al.* (2008). Disturbance of circadian gene expression in hepatocellular carcinoma. *Molecular carcinogenesis* **47**(12): 925-933.

Luo Y, Wang F, Chen LA, Chen XW, Chen ZJ, Liu PF, *et al.* (2012). Deregulated expression of cry1 and cry2 in human gliomas. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* **13**(11): 5725-5728.

Maeda S, Kamata H, Luo JL, Leffert H, Karin M (2005). IKKbeta couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell* **121**(7): 977-990.

Mancuso A (2013). Management of hepatocellular carcinoma: Enlightening the gray zones. *World journal of hepatology* **5**(6): 302-310.

Mazzoccoli G, Piepoli A, Carella M, Panza A, Paziienza V, Benegiamo G, *et al.* (2012). Altered expression of the clock gene machinery in kidney cancer patients. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* **66**(3): 175-179.

Mohawk JA, Green CB, Takahashi JS (2012). Central and peripheral circadian clocks in mammals. *Annual review of neuroscience* **35**: 445-462.

Narasimamurthy R, Hatori M, Nayak SK, Liu F, Panda S, Verma IM (2012). Circadian clock protein cryptochrome regulates the expression of proinflammatory cytokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**(31): 12662-12667.

Ortiz-Tudela E, Mteyrek A, Ballesta A, Innominato PF, Levi F (2013). Cancer chronotherapeutics: experimental, theoretical, and clinical aspects. *Handbook of experimental pharmacology*(217): 261-288.

Ozturk N, Lee JH, Gaddameedhi S, Sancar A (2009). Loss of cryptochrome reduces cancer risk in p53 mutant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**(8): 2841-2846.

Partch CL, Green CB, Takahashi JS (2013). Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends in cell biology*.

Relles D, Sendeck J, Chipitsyna G, Hyslop T, Yeo CJ, Arafat HA (2013). Circadian gene expression and clinicopathologic correlates in pancreatic cancer. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* **17**(3): 443-450.

Schmutz I, Albrecht U, Ripperger JA (2012). The role of clock genes and rhythmicity in the liver. *Molecular and cellular endocrinology* **349**(1): 38-44.

Shih MC, Yeh KT, Tang KP, Chen JC, Chang JG (2006). Promoter methylation in circadian genes of endometrial cancers detected by methylation-specific PCR. *Molecular carcinogenesis* **45**(10): 732-740.

Straif K, Baan R, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, *et al.* (2007). Carcinogenicity of shift-work, painting, and fire-fighting. *The lancet oncology* **8**(12): 1065-1066.

Sun B, Karin M (2013). Inflammation and liver tumorigenesis. *Frontiers of medicine* **7**(2): 242-254.

Tadlock L, Patel T (2001). Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signaling in transformed growth of a cholangiocarcinoma cell line. *Hepatology* **33**(1): 43-51.

Tokunaga H, Takebayashi Y, Utsunomiya H, Akahira J, Higashimoto M, Mashiko M, *et al.* (2008). Clinicopathological significance of circadian rhythm-related gene expression levels in patients with epithelial ovarian cancer. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica* **87**(10): 1060-1070.

van den Heiligenberg S, Depres-Brummer P, Barbason H, Claustrat B, Reynes M, Levi F (1999). The tumor promoting effect of constant light exposure on diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Life sciences* **64**(26): 2523-2534.

van der Horst GT, Muijtjens M, Kobayashi K, Takano R, Kanno S, Takao M, *et al.* (1999). Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* **398**(6728): 627-630.

Vollmers C, Gill S, DiTacchio L, Pulivarthy SR, Le HD, Panda S (2009). Time of feeding and the intrinsic circadian clock drive rhythms in hepatic gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**(50): 21453-21458.

Vollmers C, Schmitz RJ, Nathanson J, Yeo G, Ecker JR, Panda S (2012). Circadian oscillations of protein-coding and regulatory RNAs in a highly dynamic mammalian liver epigenome. *Cell metabolism* **16**(6): 833-845.

Wang F, Yeung KL, Chan WC, Kwok CC, Leung SL, Wu C, *et al.* (2013). A meta-analysis on dose-response relationship between night shift work and the risk of breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **24**(11): 2724-2732.

Yang H, Li TW, Peng J, Tang X, Ko KS, Xia M, *et al.* (2011). A mouse model of cholestasis-associated cholangiocarcinoma and transcription factors involved in progression. *Gastroenterology* **141**(1): 378-388, 388 e371-374.

Yang MY, Chang JG, Lin PM, Tang KP, Chen YH, Lin HY, *et al.* (2006). Downregulation of circadian clock genes in chronic myeloid leukemia: alternative methylation pattern of hPER3. *Cancer science* **97**(12): 1298-1307.

Zabron A, Edwards RJ, Khan SA (2013). The challenge of cholangiocarcinoma: dissecting the molecular mechanisms of an insidious cancer. *Disease models & mechanisms* **6**(2): 281-292.

Zhu Y, Stevens RG, Hoffman AE, Fitzgerald LM, Kwon EM, Ostrander EA, *et al.* (2009). Testing the circadian gene hypothesis in prostate cancer: a population-based case-control study. *Cancer research* **69**(24): 9315-9322.

Figure legends

Fig. 1. Systemic toxicity of DEN in both WT and *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* mice. (A) Relative body weight changes (mean \pm SEM) in WT and *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* mice during and after DEN exposure. Body weight loss was largest in WT mice (dark triangles) as compared to *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* animals (open triangles). The daily DEN doses (mg/kg) are shown in italics, for corresponding exposure spans. (B) Survival rate in WT (dark triangles) and *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* (open triangles) mice exposed to DEN at ZT11. (C) and (D) Histogram of ALT and AST serum activities (mean \pm SEM) after DEN exposure of WT (dark box) and *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* (open box) mice. (E) Serum concentrations of ALP in WT (dark box) and *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* (open box) mice on day 211.

Mean (\pm SEM) ALT, AST and ALP serum levels in untreated control mice are represented by gray horizontal bars. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Fig. 2. Representative histological slides of different types of lesions found 5 months after DEN exposure completion:

- a) Primary lesions in WT mouse
- b) Primary lesions in *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* mouse
- c) Cholangiocarcinoma
- d) Hepatocarcinoma

Fig. 3. DEN-induced liver cancer according to *Cry1Cry2* deficiency. (A) Number of tumor nodules in WT (black box) and in *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* (Open box) mice. (B) Number of hepatocarcinomas (open box) and cholangiocarcinomas (grey box) in WT and *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* mice. * $p < 0.01$.

Fig. 4. Rest-activity and body temperature patterns and circadian parameters in WT and *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* before, during and after DEN exposure. (A) Examples of rest-activity and body temperature patterns in a WT mouse (left) and in a *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* mouse (right) before DEN exposure. (B) Circadian acrophase changes for rest-activity (left panel) and body temperature (right panel) in WT (dark triangles) and *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* (open triangles) before, during, and after DEN exposure. A phase advance of nearly 3-h for rest-activity (ZT15:40 vs ZT18:50 in WT, $p < 0.001$) and of 1h30 minutes for body temperature (ZT16:45 vs 18:15 in WT, $p = 0.025$) was found in *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* as compared to WT over the 5 days before DEN treatment. (C) Corresponding histograms of 24-h mean amplitudes with 95% C.L. for rest-activity (left panel) and body temperature (right panel) in WT (dark boxes) and *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* (open boxes) mice before, during, and after DEN exposure. ** $p \leq 0.001$.

Figure 1

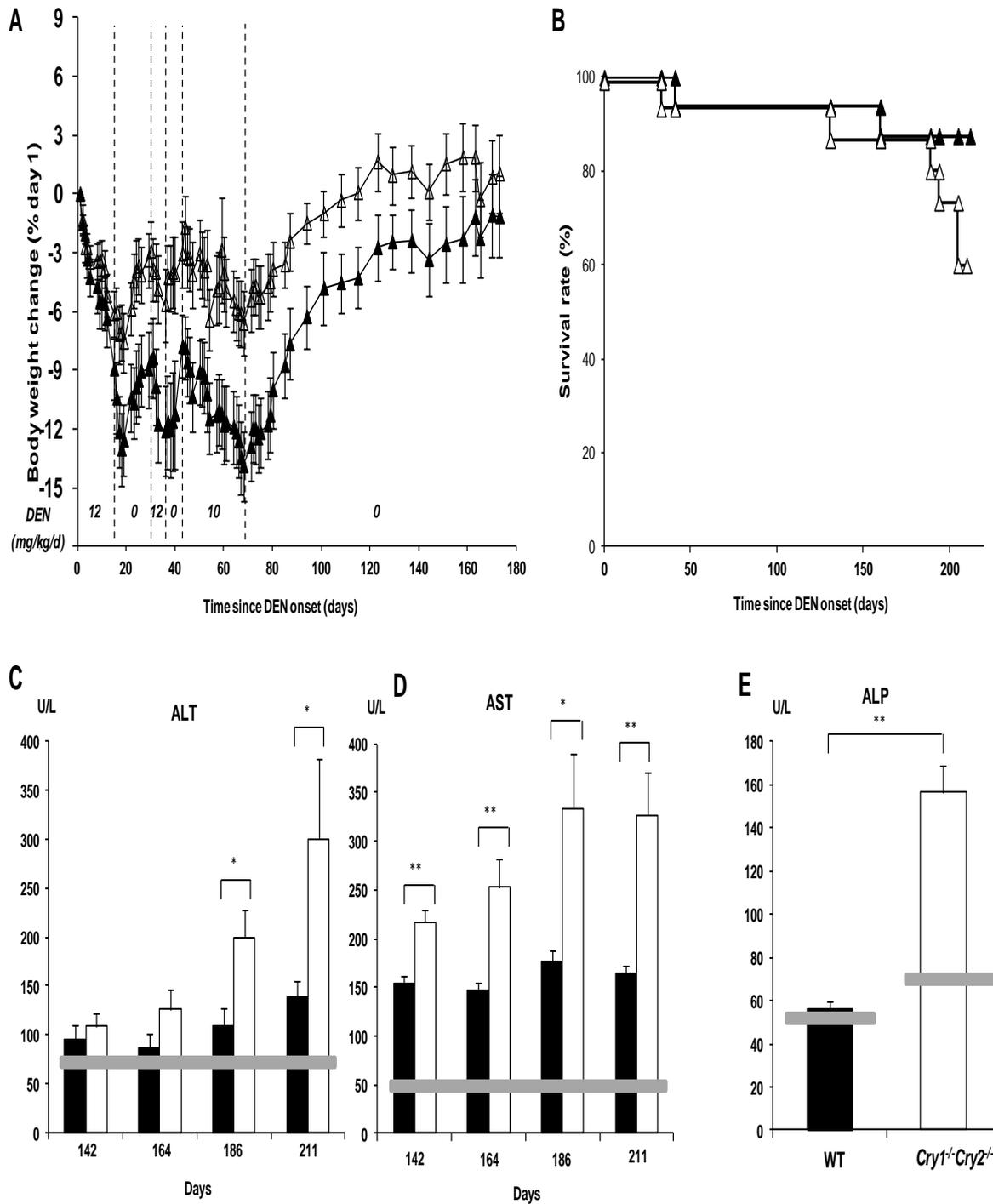


Figure 2

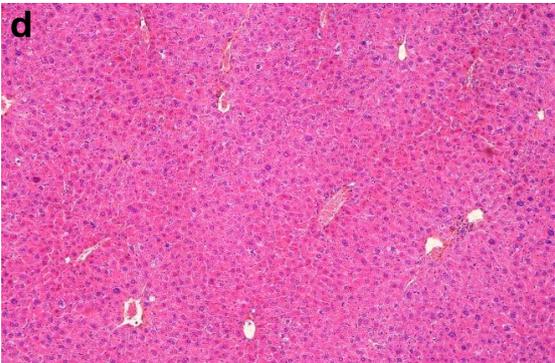
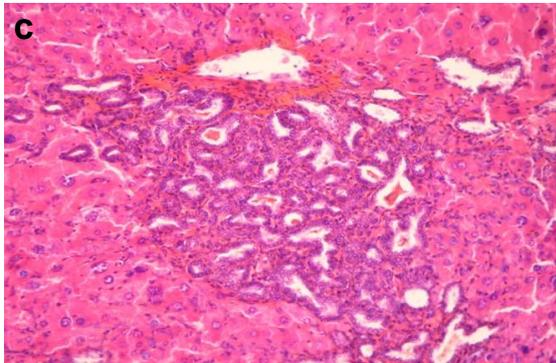
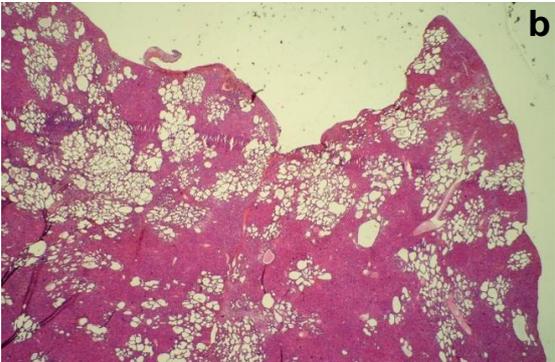


Figure 3

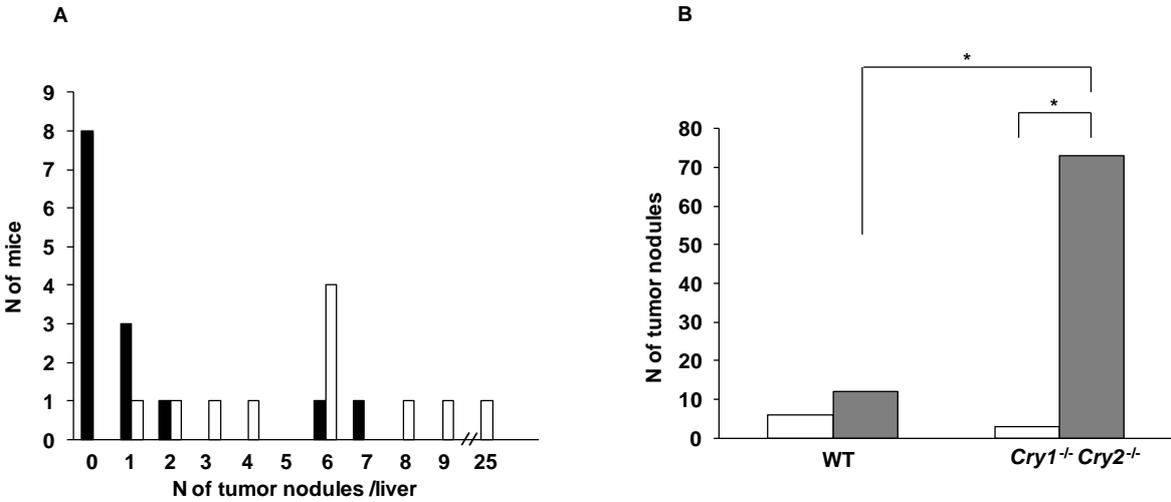
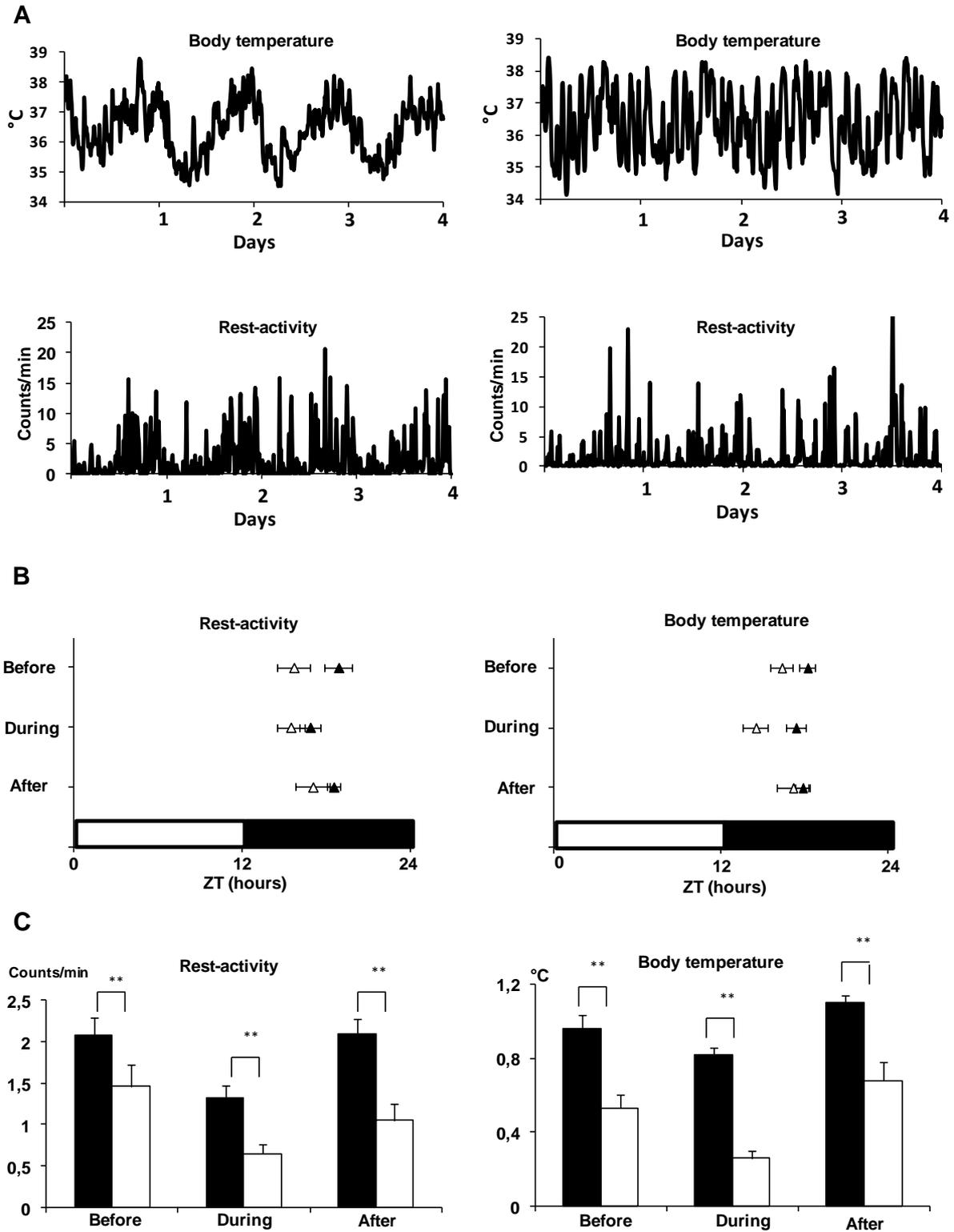


Figure 4



V.4. Interventions à visée de prévention de la cancérogénèse hépatique : alimentation programmée et chronocorticothérapie

V.4.1 Résumé

La disruption circadienne accélère la cancérogénèse chimio-induite et la progression de tumeurs implantées chez le Rat ou la Souris. L'alimentation programmée ou l'administration d'un chronobiotique ciblant l'horloge circadienne pourraient contrebalancer cet effet. Des souris ♂ "sauvages" ou *Per2^{m/m}* ont reçu une injection de DEN à la fin de la phase de repos diurne (Zeitgeber Time, ZT11) pendant 17 jours pour une dose cumulée de 195 mg/kg. Un lot de souris avait un accès à l'alimentation restreint à une durée de 6 heures pendant la phase d'obscurité, de Zeitgeber Time (ZT) 14 à ZT20. Un autre lot a reçu une injection quotidienne de dexaméthasone (1mg/kg/j) à ZT 14. L'injection de dexaméthasone et l'alimentation programmée sont commencées une semaine avant l'administration de diéthylnitrosamine et poursuivies jusqu'à la fin de l'expérimentation. Les souris de chaque génotype ont été euthanasiées 24 heures après la fin des injections de DEN. L'expression circadienne des gènes de l'horloge, de la prolifération, et de l'apoptose et les concentrations de cytokines ont été déterminées dans le foie.

Ni l'alimentation programmée ni l'administration quotidienne de la dexaméthasone n'a renforcé les rythmes des gènes de l'horloge hépatique chez les souris sauvages ou *Per2^{m/m}* exposées à la diéthylnitrosamine. Cependant, ces deux interventions ont exercé des effets importants sur les étapes précoces de la cancérogénèse hépatique. Ils ont en effet induit une répression de *c-Myc* et de *Kras*, une surexpression de *Wee1* (inhibiteur de la transition G2/M du cycle cellulaire), et une diminution des taux protéiques hépatiques d'IL-6 et de TNF- α . En conclusion, ces interventions thérapeutiques ciblées sur l'horloge circadienne ont provoqué des modifications génomiques ou protéiques associées à une réduction de la prolifération hépatocytaire tant chez les souris sauvages que chez les souris *Per2^{m/m}* exposées à la DEN. Ces résultats suggèrent qu'une intervention ciblant le système circadien pourrait prévenir l'hépatocarcinogénèse, sans nécessairement agir sur l'horloge moléculaire.

V.4.2. Résultats

Effet de l'alimentation programmée et de dexaméthasone sur la perte du poids corporel chez les souris sauvages et *Per2^{m/m}* exposées à la DEN

Sous DEN pendant 17 jours, la perte de poids corporel était équivalente pour les souris des deux génotypes. L'alimentation programmée ou l'administration quotidienne de dexaméthasone a induit une perte de poids plus importante chez les souris sauvages et *Per2^{m/m}* en comparaison des souris nourries *ad libitum* ou recevant un véhicule, respectivement. En effet, les souris sauvages et *Per2^{m/m}* en alimentation programmée ou exposées à la dexaméthasone et sous DEN perdent jusqu'à ~ 17% de leur poids corporel, en comparaison de ~ 8% chez les témoins ($p < 0.001$) (Figure 25).

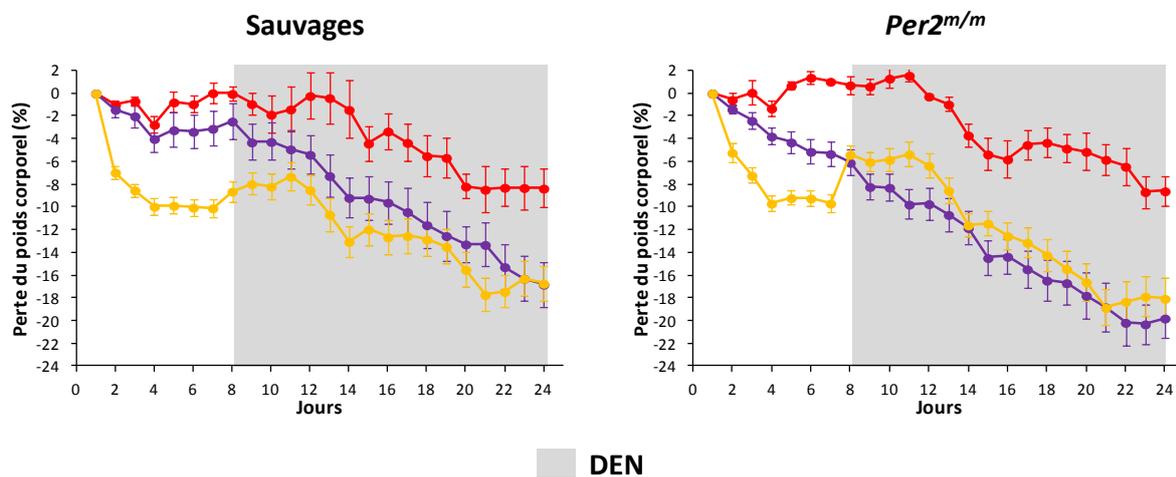


Figure 25 : Perte relative de poids corporel chez les souris sauvages et *Per2^{m/m}* exposées à la DEN avec alimentation *ad libitum* (rouge), ou DEN associée à l'alimentation programmée (orange) ou à la dexaméthasone avec alimentation *ad libitum* (violet).

Effet de l'alimentation programmée sur l'expression de gènes de l'horloge circadienne dans le foie de souris sauvages et *Per2^{m/m}* exposées à la DEN

Chez les souris sauvages, l'expression de gènes de l'horloge *Clock*, *Bmal1*, *Rev-erba*, *Cry1*, et *Cry2* présentait une variation temporelle de 24 heures dans les deux conditions d'alimentation : ad libitum et programmée (effet du temps par ANOVA, $p < 0.03$ pour chaque gène). L'analyse du cosinor a validé une rythmicité circadienne pour 4 gènes de l'horloge dans les deux conditions ($p < 0.005$) à l'exception de *Clock* chez les souris en alimentation programmée. Cette analyse a confirmé un amortissement de l'amplitude circadienne de *Bmal1*, *Cry1*, et *Cry2* de 38%, 85%, et 33% respectivement ($p < 0.03$), et une avance de phase de 1h40 pour *Rev-erba* ($p < 0.001$) chez les souris en alimentation programmée par rapport à celles nourries *ad libitum*. Ainsi, le niveau moyen d'expression sur 24 heures a été réduit de 39% à 75% pour *Clock*, *Bmal1*, *Cry1*, et *Cry2* en réponse à l'alimentation programmée ($p < 0.001$) (Figure 26).

Chez les souris *Per2^{m/m}* exposées à la DEN, l'analyse de variance a confirmé un effet du temps pour tous les gènes de l'horloge testés dans les deux conditions d'alimentation ($p < 0.001$). Un rythme circadien de 24 heures a été trouvé par l'analyse du cosinor pour tous ces gènes ($p < 0.03$) à l'exception de *Cry1* chez les souris en alimentation programmée. L'alimentation programmée affecte les rythmes de gènes de l'horloge puisqu'un amortissement de l'amplitude circadienne (-37%) associé à une avance de phase de 1h30 a été observé pour *Clock*, alors que *Bmal1*, *Rev-erba*, et *Cry2* présentaient un retard de phase de plus de 2h30 minutes ($p < 0.001$). De plus, la synchronisation alimentaire induisait une diminution de 21% du taux moyen d'expression de *Rev-erba* ($p = 0.01$), et réduisait de moitié celui de *Cry1* et *Cry2* ($p < 0.001$) (Figure 26).

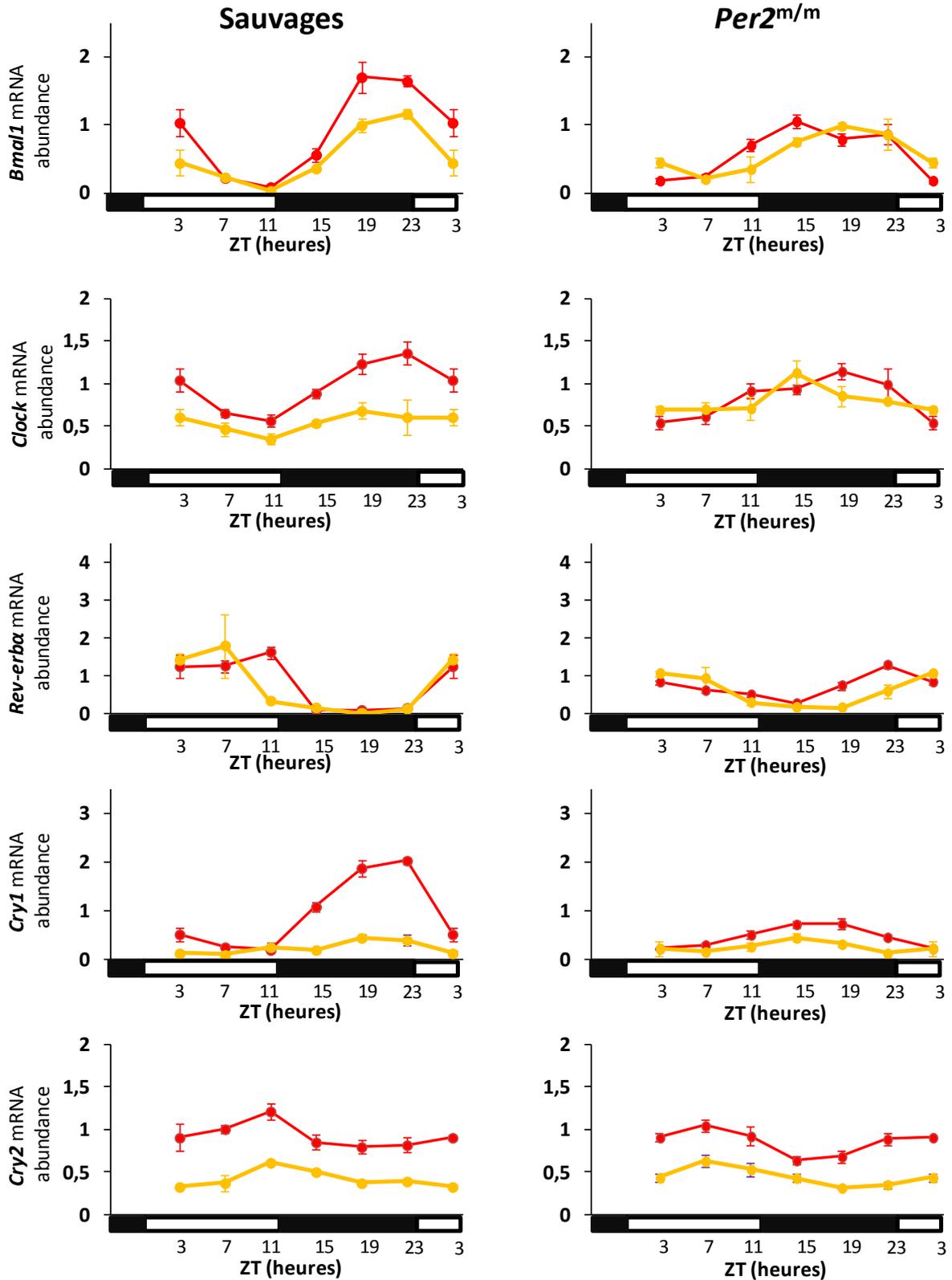


Figure 26 : Expression de gènes de l'horloge circadienne *Clock*, *Bmal1*, *Rev-erba*, *Cry1*, et *Cry2* dans le foie des souris sauvages (gauche) et *Per2^{m/m}* (droite) exposées à la DEN dans deux conditions d'alimentation : ad libitum (rouge) ou programmée (orange).

Effet de l'alimentation programmée sur l'expression de gènes du cycle cellulaire et de l'apoptose dans le foie de souris sauvages et *Per2^{m/m}* exposées à la DEN

Chez les souris sauvages, l'analyse de variance a démontré une variation temporelle de *P53*, *Bcl2*, *Wee1*, *Ccnb1*, et *K-ras* dans les deux conditions d'alimentation (Anova, $p \leq 0.005$). L'alimentation programmée entraînait une perte de rythme circadien de *P53*, *ATM*, et *Kras*, et une amplification de *Wee1* de 60% associée à une avance de phase de 3 heures (Analyse de Cosinor, $p < 0.001$). De plus, la synchronisation alimentaire doublait le niveau d'expression de *Wee1*, et réduisait l'expression de *P53*, *ATM*, *c-Myc*, et *Kras* ($p \leq 0.02$) (Figure 27).

Chez les souris *Per2^{m/m}* exposées à la DEN, les ARNm d'*ATM*, *Wee1*, *Ccnb1*, et de *Kras* sont exprimés rythmiquement dans les deux conditions d'alimentation (effet de temps par ANOVA, $p \leq 0.04$). L'alimentation programmée induisait un rythme de 24 heures pour les gènes *ATM*, *Wee1*, *Ccnb1* (Analyse du cosinor, $p \leq 0.04$). En réponse à l'alimentation programmée, le niveau moyen sur 24 heures des ARNm a été augmenté de 50% pour *Bcl2* ($p < 0.001$), doublé pour *Wee1* ($p < 0.001$), réduit pour *ATM*, *Ccnb1*, *K-ras*, et *P53* ($p < 0.01$), et diminué de moitié pour *c-Myc* ($p < 0.001$) (Figure 27).

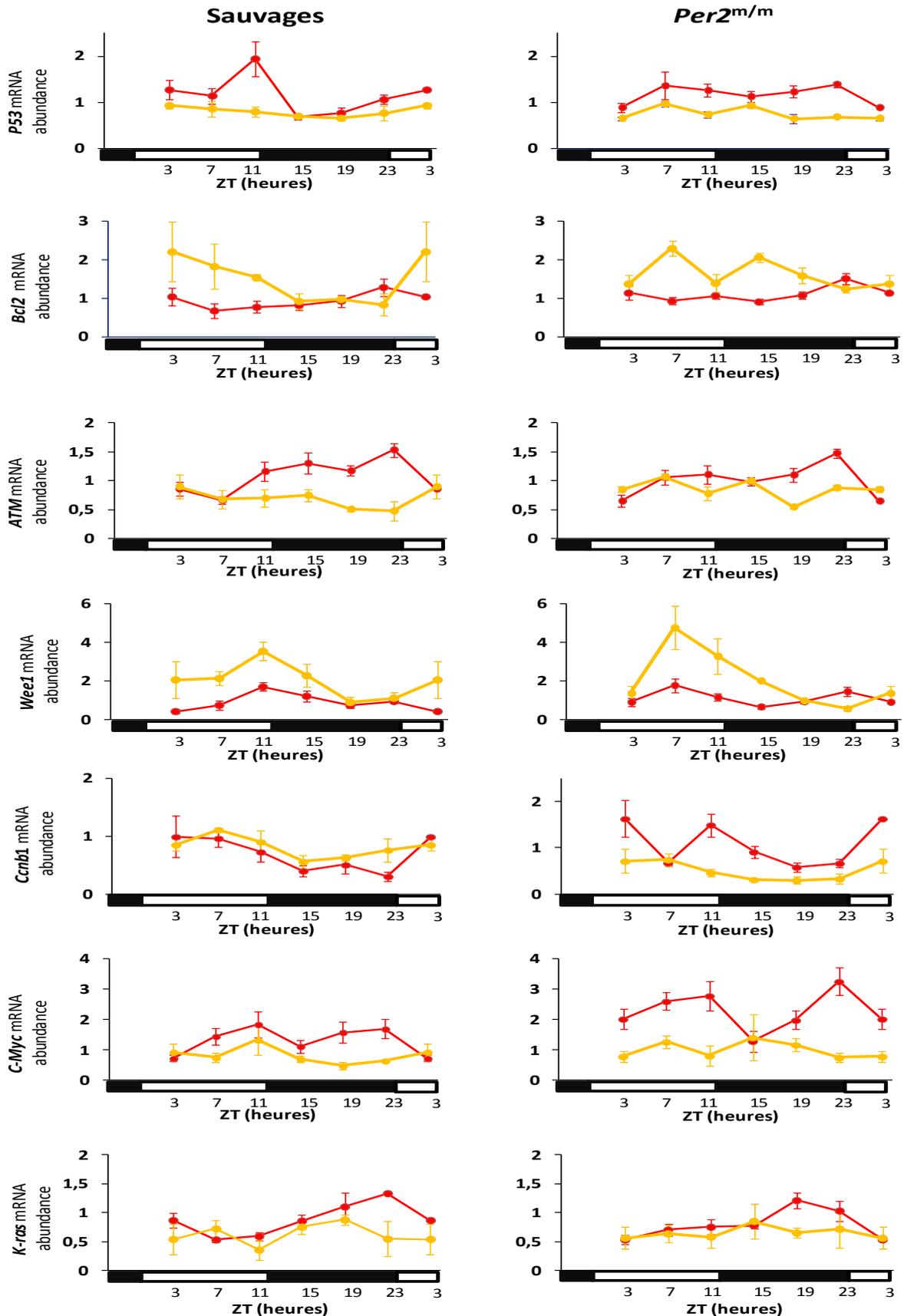


Figure 27 : Expression de gènes de la prolifération, du cycle cellulaire et de l'apoptose dans le foie de souris sauvages (gauche) et *Per2^{m/m}* (droite) exposées à la DEN dans deux conditions d'alimentation : ad libitum (rouge) ou programmée (orange).

Effet de l'alimentation programmée sur les concentrations protéiques d'IL-6 et de TNF- α de souris sauvages et *Per2^{m/m}* exposées à la DEN

Les souris sauvages nourries *ad libitum* et exposées à la DEN présentaient un rythme circadien sinusoïdal d'[IL-6] et de [TNF- α] (Cosinor, $p < 0.04$ et $p < 0.001$ respectivement). Cependant, l'alimentation programmée entraînait une perte du rythme sinusoïdal pour ces deux protéines, et réduisait leur niveau moyen de 20% pour IL-6 ($p = 0.02$) et de 30% pour TNF- α (Analyse de variance, $p < 0.001$) (Figure 28).

La synchronisation alimentaire induisait une perte de la rythmicité circadienne d'IL-6 et de TNF- α chez les souris *Per2^{m/m}* exposées à la DEN. Les concentrations hépatiques d'IL-6 et de TNF- α ont été diminuées de 45%, en réponse à l'alimentation programmée ($p < 0.001$) (Figure 28 A et B).

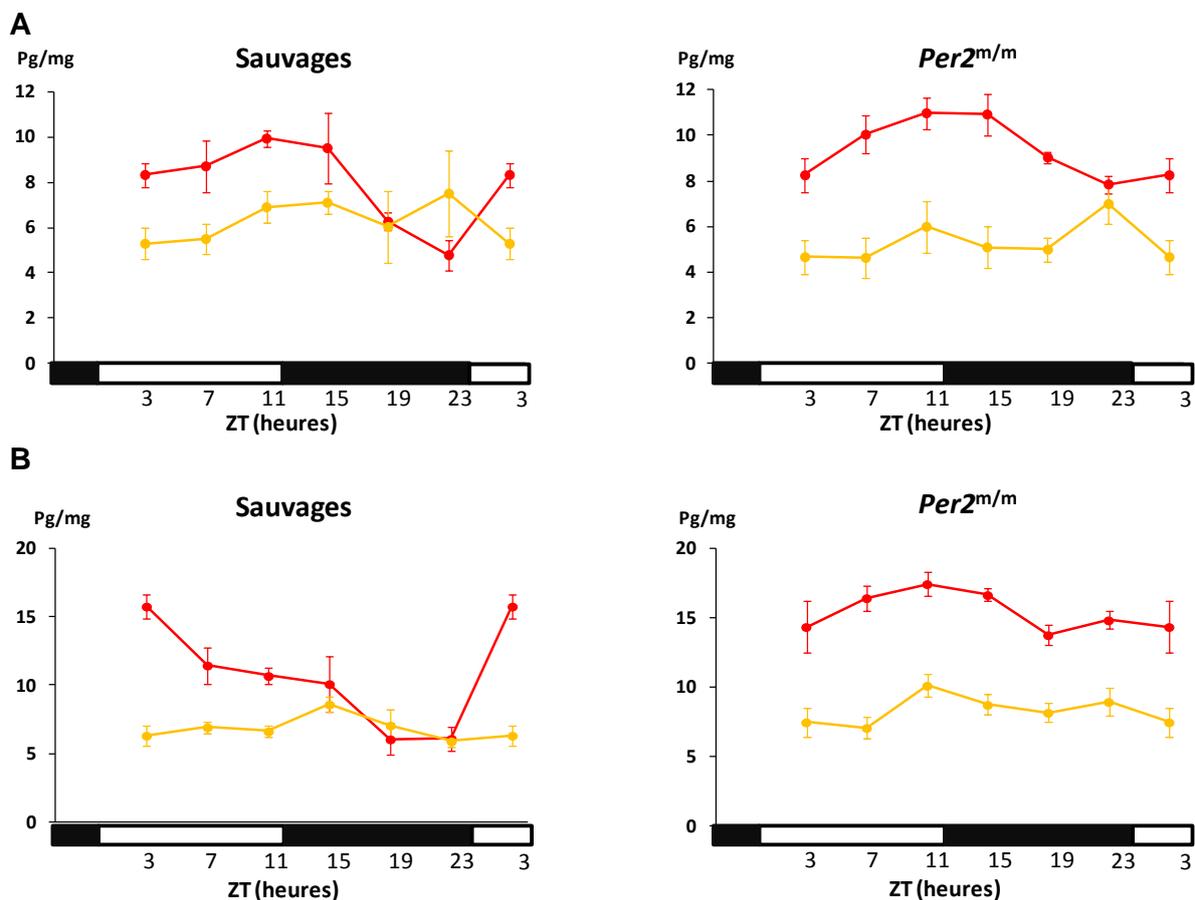


Figure 28 : Concentrations protéiques hépatique d'IL-6 (A) et de TNF- α (B) chez des souris sauvages (gauche) et *Per2^{m/m}* (droite) exposées à la DEN dans deux conditions d'alimentation : *ad libitum* (rouge) ou programmée (orange).

Effet de la dexaméthasone sur l'expression de gènes de l'horloge circadienne dans le foie de souris sauvages et *Per2^{m/m}* exposées à la DEN

Les ARNm de *Clock*, *Bmal1*, *Rev-erba*, *Cry1*, et *Cry2* présentaient une variation temporelle sur 24 heures chez les souris sauvages exposées à la DEN dans les deux conditions sans ou avec l'administration de dexaméthasone (effet de temps par ANOVA, $p < 0.002$). De plus, un rythme circadien a été validé pour ces gènes dans les deux conditions à l'exception de *Clock* dans le groupe ayant reçu de dexaméthasone (Cosinor, $p \leq 0.03$). En effet, les injections quotidiennes de dexaméthasone amortissait l'amplitude circadienne de *Bmal1*, *Cry1*, et *Cry2* de 53% à 65% (Cosinor, $p < 0.02$), et augmentait celle de *Rev-erba* de 91% ($p < 0.001$). De plus, elles induisaient un retard de phase de 1 à 6 heures pour *Bmal1*, *Rev-erba*, *Cry1*, et *Cry2* ($p < 0.001$). Le taux moyen sur 24 heures de *Clock*, *Bmal1*, *Cry1*, et *Cry2* a été décru ($p < 0.001$), alors celui de *Rev-erba* a été augmenté de 57% (Anova, $p = 0.038$) (Figure 29).

Chez les souris *Per2^{m/m}*, l'analyse de variance a validé une variation temporelle de *Bmal1*, *Rev-erba*, et *Cry1* indépendamment de l'administration de dexaméthasone (ANOVA, $p < 0.005$). En outre, l'administration de dexaméthasone entraînait une perte de rythmicité sinusoïdale circadienne pour tous les gènes de l'horloge testés (sauf pour *Cry2*). L'expression des gènes *Clock*, *Bmal1*, et *Cry2* a été diminuée ($p \leq 0.04$), alors que celle de *Rev-erba* a été augmentée en réponse aux injections de dexaméthasone ($p < 0.001$) (Figure 29)

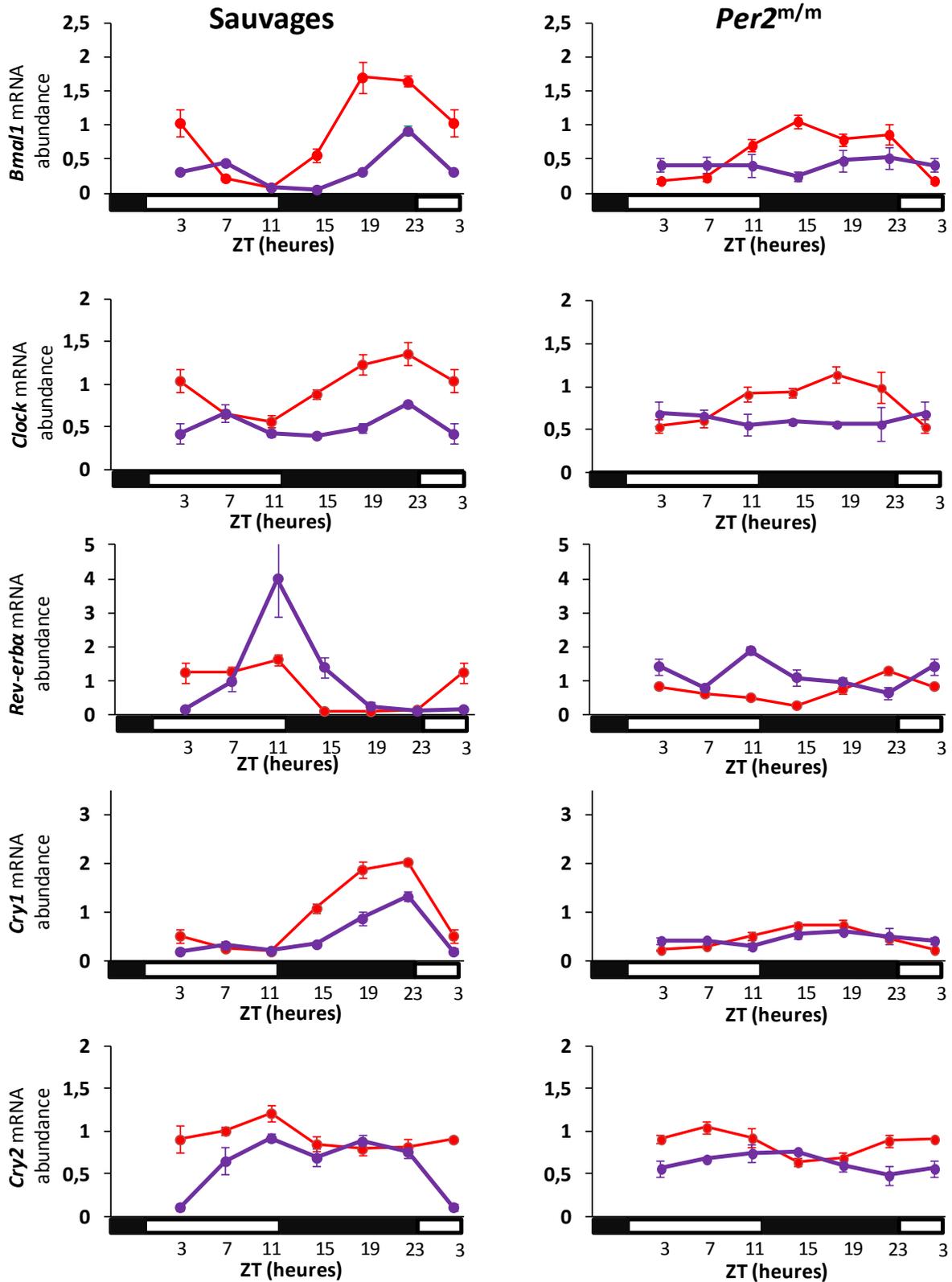


Figure 29 : Expression circadienne de gènes de l'horloge *Clock*, *Bmal1*, *Rev-erba*, *Cry1*, et *Cry2* dans le foie des souris sauvages (gauche) et *Per2^{m/m}* (droite) exposées à la DEN seule (rouge) ou associée à la dexaméthasone (violet).

Effet de la dexaméthasone sur l'expression de gènes du cycle cellulaire et de l'apoptose dans le foie de souris sauvages et *Per2^{m/m}* exposées à la DEN

L'administration de dexaméthasone induisait une perte de rythmicité circadienne de *P53*, *ATM*, *Wee1*, *Ccnb1* et *Kras*, chez les souris sauvages par rapport aux souris non traitées par la dexaméthasone. De plus, le niveau moyen d'*ATM*, *c-Myc*, et *K-ras* est diminué de 20%, 31%, et 52% respectivement en réponse à la dexaméthasone (Anova, $p < 0.02$) (Figure 30).

Chez les souris *Per2^{m/m}*, une variation temporelle a été confirmée pour *Wee1* et *Ccnb1* dans les souris traitées ou non par dexaméthasone. Celle-ci induisait une surexpression de *Bcl2*, doublait le taux moyen de *Wee1*, et diminuait le niveau d'expression de *Ccnb1* (-50%), *c-Myc* (-71%), et *Kras* (-27%) (Anova, $p \leq 0.05$) (Figure 30).

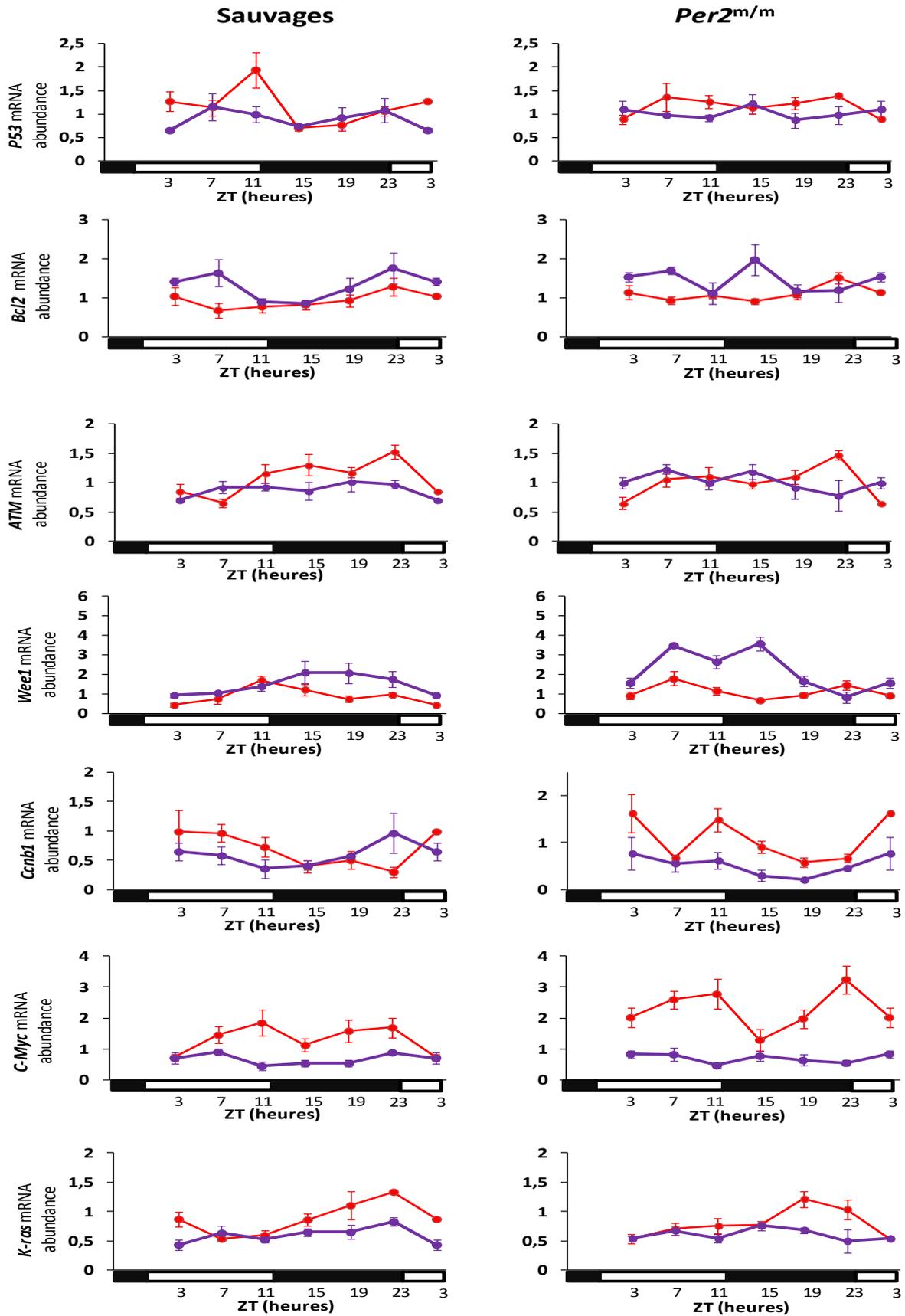


Figure 30 : Expression de gènes de la prolifération, du cycle cellulaire et de l'apoptose dans le foie de souris sauvages (gauche) et *Per2^{m/m}* (droite) exposées à la DEN seule (rouge) ou associée à la dexaméthasone (violet).

Effet de l'administration de dexaméthasone sur les concentrations protéiques d'IL-6 et de TNF- α hépatiques de souris sauvages et *Per2^{m/m}* exposées à la DEN

La dexaméthasone induisait une perte de rythme circadien de [IL-6] et [TNF- α] chez les souris sauvages et *Per2^{m/m}*. Elle diminuait le taux protéiques d'IL-6 de 28% et de 20% chez les souris sauvages et *Per2^{m/m}* respectivement (Anova, $p \leq 0.006$). Le taux protéique de TNF- α a été réduit de moitié chez les souris *Per2^{m/m}* (Anova, $p < 0.001$), en réponse aux injections quotidiennes de dexaméthasone (Figure 31).

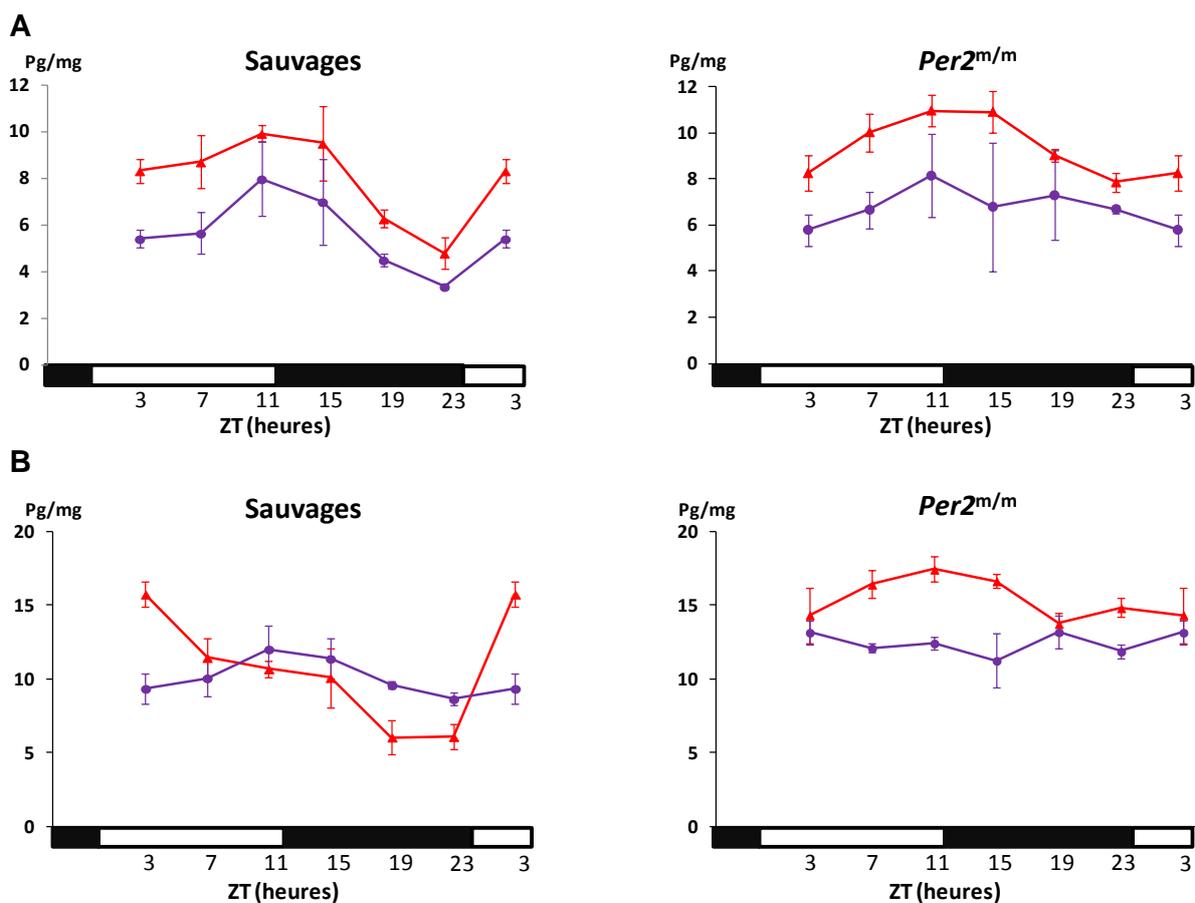


Figure 31 : Concentrations protéiques hépatique d'IL-6 (A) et de TNF- α (B) chez des souris sauvages (gauche) et *Per2^{m/m}* (droite) exposées à la DEN avec alimentation *ad libitum* (rouge) ou associée à la dexaméthasone (violet).

Enregistrements téléométrique de la physiologie circadienne

Les variations dynamiques de la physiologie circadienne ont été documentées d'après les enregistrements téléométriques continus de l'activité locomotrice et de la température corporelle, à l'aide d'un capteur implanté dans la cavité péritonéale. Les enregistrements sont commencés une semaine avant le début de l'alimentation programmée et l'administration de la dexaméthasone, et ont été poursuivis jusqu'à la fin de l'expérience.

Effet de l'alimentation programmée et de la dexaméthasone sur le rythme de la température corporelle

L'administration de la diéthylnitrosamine aux animaux nourris *ad libitum* a diminué l'amplitude circadienne de la température corporelle de 43% chez les souris sauvages (Test t apparié, $p= 0.01$), et de moitié chez les *Per2^{m/m}* (0.6°C vs 0.3°C , $p = 0.04$) (Figure 32), sans altération de la phase.

La synchronisation alimentaire a avancé la phase de 1h 18 minutes ($p < 0.001$), et augmenté de 39% l'amplitude du rythme thermique chez les souris sauvages avant l'administration de DEN ($p= 0.004$). Malgré les administrations quotidiennes de DEN, la synchronisation alimentaire a permis aux souris sauvages de conserver une amplitude circadienne physiologique ($p= 0.101$), et a avancé la phase du rythme thermique de 46 minutes (Test t apparié, $p= 0.023$) (Figure 32).

Chez les souris *Per2^{m/m}*, la programmation de l'accès à l'alimentation a, de même, augmenté de ~50% l'amplitude du rythme thermique avant exposition à la DEN. L'administration du cancérogène a réduit significativement l'amplitude de ce rythme chez les souris soumises à l'alimentation programmée en comparaison des souris témoins sans DEN. (0.97°C vs 0.79°C , $p= 0.013$). La phase de la température n'a pas été modifiée (Figure 32).

Les injections quotidiennes de dexaméthasone ont réduit de 25% l'amplitude circadienne de la température corporelle des souris sauvages nourries *ad libitum* avant l'administration de cancérogène (Test t apparié, $p < 0.05$). Sous DEN, l'amplitude circadienne de ce rythme a diminué au cours du traitement par dexaméthasone, qui n'a altéré la phase du rythme thermique ni avant ni pendant l'exposition à la DEN (Figure 32).

Chez les souris *Per2^{m/m}*, l'administration de la dexaméthasone a réduit de 20% l'amplitude de rythme de la température (Test t apparié, $p= 0.002$). La phase n'a pas changé dans cette condition (Figure 32).

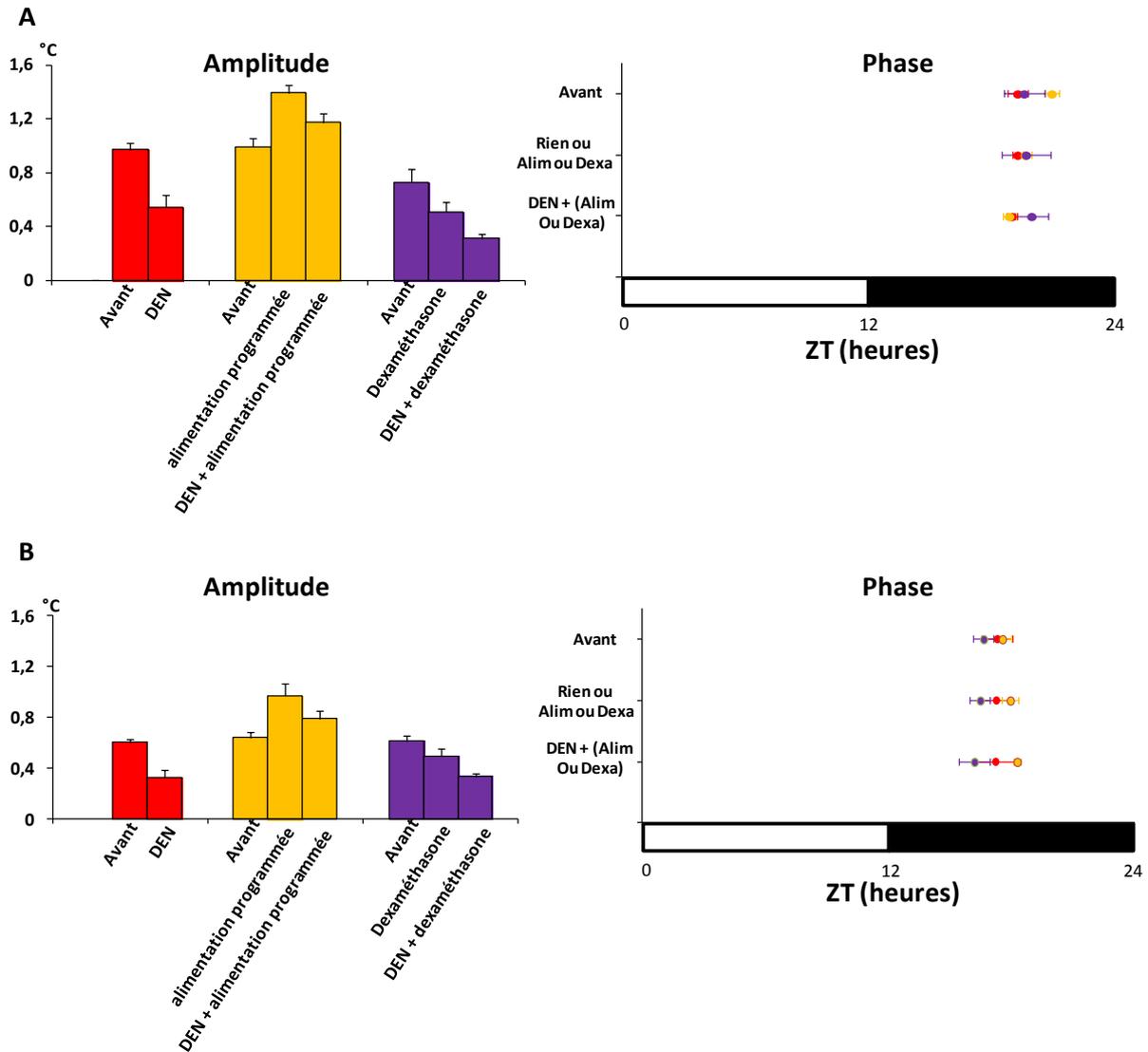


Figure 32: Variations de l'amplitude et de la phase de la température corporelle chez les souris sauvages (A) et *Per2^{m/m}* (B) exposées à la DEN seule (rouge), ou associée à l'alimentation programmée (orange) ou à la dexaméthasone (violet). Résultats des calculs des paramètres et de leurs intervalles de confiance à 95% par la méthode du Cosinor avec une période de 24 h.

Effet de l'alimentation programmée et de la dexaméthasone sur le rythme de la l'activité-repos

La diéthylnitrosamine a diminué de 5,3 fois l'amplitude du rythme de l'activité-repos (Test t-apparié, $p= 0.03$), et en a avancé la phase d'une heure (Test t-apparié, $p= 0.035$) chez les souris sauvages nourries *ad libitum* (Figure 33). Chez les souris *Per2^{m/m}*, la DEN a réduit l'amplitude circadienne de 5,7 fois (Test t-apparié, $p= 0.001$) et en a avancé sa phase de ~1h 15 minutes ($p= 0.008$) (Figure 33). Ainsi la DEN a-t elle provoqué des effets semblables sur l'amplitude et la phase du rythme d'activité-repos quelle que soit la fonctionnalité de *Per2*.

La programmation de l'accès à l'alimentation a augmenté de 70% l'amplitude de ce rythme, en l'absence d'administration de DEN (Test t-apparié, $p= 0.04$) chez les souris sauvages. La DEN a réduit de moitié l'amplitude du rythme d'activité-repos de ces animaux ($p= 0.002$), et en a avancé la phase de ~ 2 heures (Test t-apparié, $p= 0.04$) (Figure 33).

Bien que l'alimentation programmée n'ait aucun effet sur l'amplitude du rythme d'activité-repos des souris *Per2^{m/m}*, l'amplitude circadienne de ce rythme a été réduite de moitié par l'association d'une alimentation programmée à l'administration de DEN (Test t-apparié, $p= 0.016$) (Figure 33).

Les souris sauvages traitées par DEN et dexaméthasone présentent une diminution de 5,3 fois de l'amplitude du rythme d'activité-repos (Test t-apparié, $p= 0.04$), en comparaison des animaux *ad libitum*, non exposés à la DEN (Figure 33). Chez les souris *Per2^{m/m}*, la dexaméthasone a réduit l'amplitude circadienne de 35% (Test t-apparié, $p= 0.03$) et induit une avance de phase de 1h 45 minutes ($p= 0.02$). L'administration de DEN dans ce groupe de souris *Per2^{m/m}* exposées à la dexaméthasone a réduit de moitié l'amplitude du rythme activité-repos (Test t-apparié, $p= 0.03$) en comparaison des animaux soumis à la dexaméthasone, et non exposés à la DEN (Figure 33).

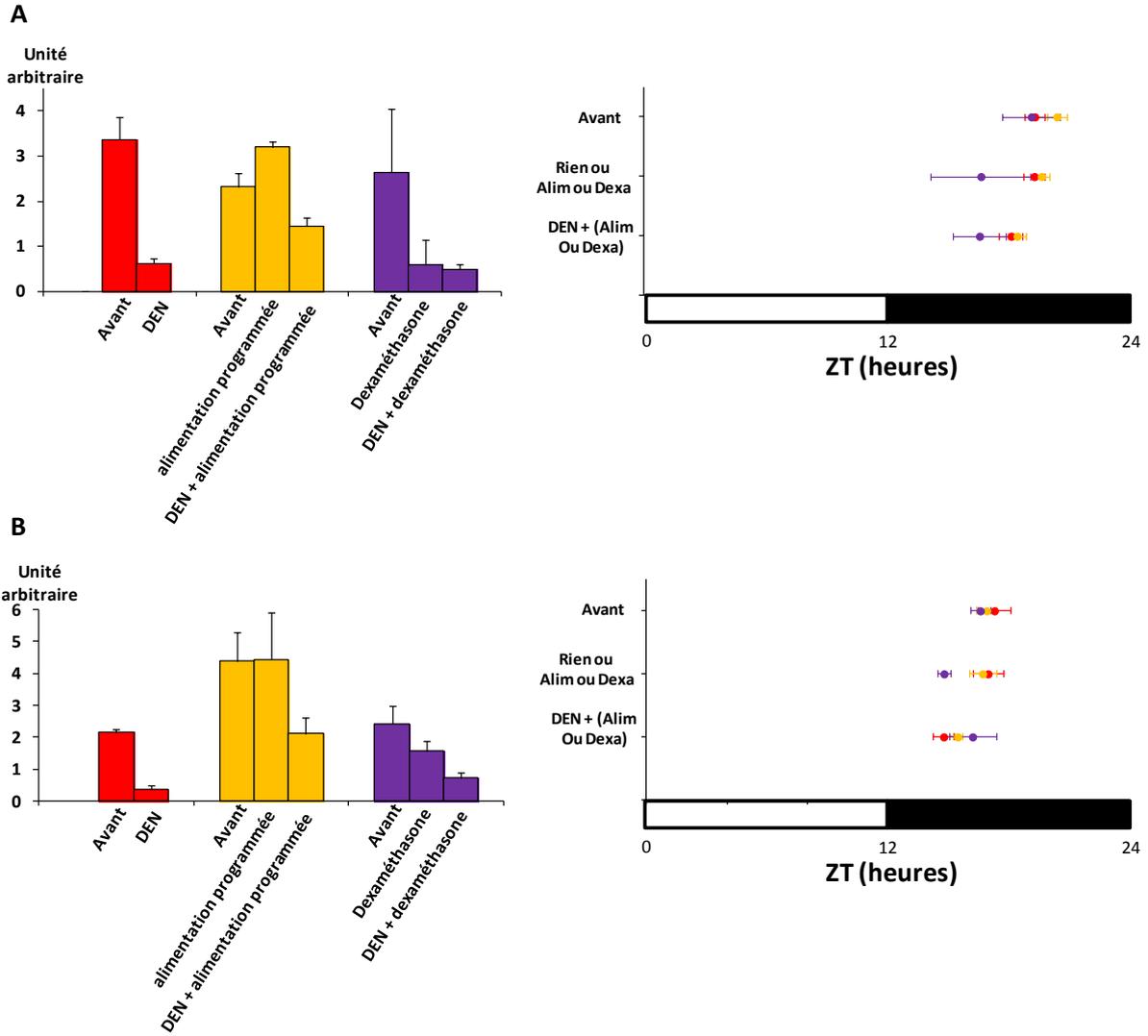


Figure 33: Variations de l'amplitude et de l'acrophase de l'activité-repos chez les souris sauvages (**A**) et *Per2^{mm}* (**B**) exposées à la DEN seule (rouge), ou associée à l'alimentation programmée (orange) ou à la dexaméthasone (violet). Résultats des calculs des paramètres et de leurs intervalles de confiance à 95% par la méthode du Cosinor avec une période de 24 h.

Effet de l'alimentation programmée sur le taux de corticostérone chez des souris sauvages et $Per2^{m/m}$ exposées à la diéthylnitrosamine

Le taux plasmatique de la corticostérone présentait une variation temporelle sur 24 heures chez les souris sauvages exposées à la DEN dans les deux conditions d'alimentation : *ad libitum* et programmée (ANOVA, $p=0.002$). L'alimentation programmée altérait le rythme circadien de la corticostéronémie, qui devenait bimodal, avec une période de 12 heures (Cosinor, $p=0.046$) (Figure 34).

Chez les souris $Per2^{m/m}$ exposées à la DEN, la synchronisation alimentaire induisait aussi un rythme circadien d'une période de 12 heures (Cosinor, $p=0.017$), alors qu'aucun rythme n'était décelable chez les souris $Per2^{m/m}$ sous DEN et *ad libitum* (Figure 34).

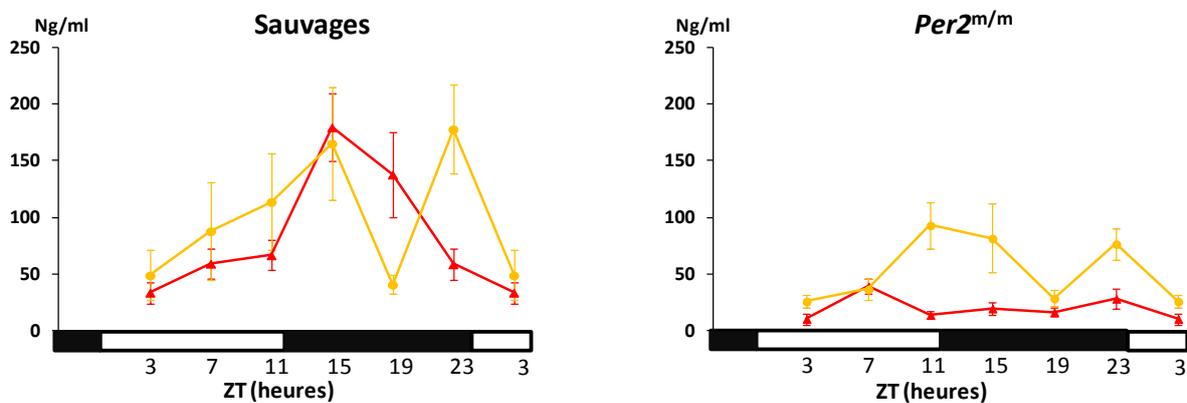


Figure 34: Rythme de la sécrétion de corticostérone chez des souris sauvages et $Per2^{m/m}$ exposées à la DEN dans deux conditions d'alimentation : *ad libitum* (rouge) et programmée (orange).

Effet de l'administration de la dexaméthasone sur le taux de corticostérone chez des souris sauvages et $Per2^{m/m}$ exposées à la diéthylnitrosamine

Le taux de corticostérone présentait une variation temporelle chez les souris sauvages exposées à la DEN seule ou associée à la dexaméthasone (ANOVA, $p=0.036$). L'administration quotidienne de dexaméthasone a supprimé le rythme circadien de la corticostéronémie (Figure 35).

Chez les souris $Per2^{m/m}$, aucun rythme circadien a été validé dans les deux conditions : avec ou sans dexaméthasone (Figure 35).

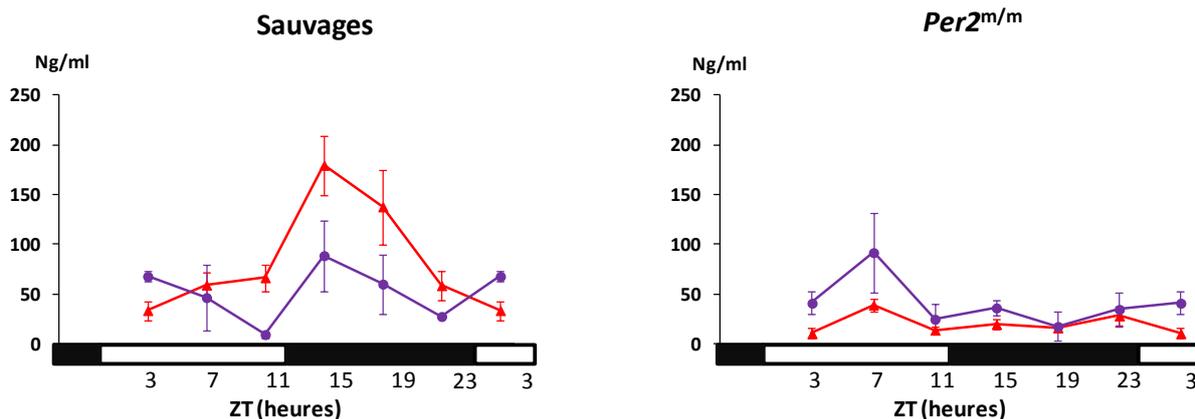


Figure 35: Rythme de la sécrétion de corticostérone chez des souris sauvages et $Per2^{m/m}$ exposées à la DEN seules (rouge) ou associée à la dexaméthasone (violet).

V.4.3. Discussion et Conclusions

Dans cette étude, nous avons étudié l'effet de l'alimentation programmée et de l'administration de la dexaméthasone sur les étapes précoces de la cancérogénèse hépatique. Pour cela, nous avons utilisé trois lots différents constitué chacun de souris sauvages et $Per2^{m/m}$. Le premier a reçu seulement la DEN (en *ad libitum*). Le deuxième et le troisième ont été soumis respectivement à l'alimentation programmée et à la dexaméthasone, pendant une semaine avant les injections de DEN et durant l'exposition à la DEN. Nous avons observé que ces deux modes d'interventions ne renforçaient les rythmes de l'horloge moléculaire ni chez les souris sauvages, ni chez les souris $Per2^{m/m}$. Par contre, l'alimentation programmée et la dexaméthasone avaient des effets importants sur les étapes précoces de la cancérogénèse hépatique, et plus précisément, ces effets ont été observés pour les oncogènes (répression de *c-Myc*, et *K-ras*), pour la prolifération cellulaire (répression de *Ccnb1*, et surexpression de *Wee1*), et pour l'inflammation (diminution de taux protéiques d'IL-6 et de TNF- α).

Il a été montré que l'alimentation programmée pourrait synchroniser l'horloge moléculaire hépatique et ralentir la croissance de tumeurs greffées chez la souris (Wu *et al.*, 2004, Filipinski *et al.*, 2005, Li *et al.*, 2010). De même, l'administration de la dexaméthasone ou de la corticostérone ralentissait respectivement la progression tumorale chez la souris (Egberts *et al.*, 2008), et la cancérogénèse chimio-induite chez le Rat (Bouzahzah *et al.* 1998). Notre étude a montré que ces interventions ne renforçaient pas les rythmes moléculaires de l'horloge circadienne hépatique, possiblement en raison d'interactions entre la DEN et les rythmes hépatiques. De plus, nous avons commencé l'alimentation programmée et l'administration de

dexaméthasone une semaine avant le début des injections de DEN, et cette période pourrait être pas suffisante pour synchroniser de façon durable les rythmes hépatiques chez les souris exposées à la DEN.

V.5. Rôle de la mutation du gène *Per2* dans la chronotoxicité de la diéthylnitrosamine

V.5.1. Résumé

La diéthylnitrosamine (DEN) est un cancérogène puissant largement utilisé pour induire les cancers hépatiques chez la Souris ou chez le Rat. Son métabolisme par le Cytochrome P450 2E1 et 2A5 dans le foie aboutit à la formation d'adduits de l'ADN. Le gène circadien *Per2* inhibe la bioactivation de la DEN. La présente étude a pour objectif de rechercher l'influence du gène *Per2* sur la chronotoxicité de DEN.

La DEN a été administrée par voie intrapéritonéale à six horaires différents (Zeitgeber Time, ZT 3, 7, 11, 15, 19, et 23) à des lots de souris femelles sauvages ou *Per2^{m/m}* pour une dose cumulée de 195 mg/kg répartie sur 17 jours. La toxicité générale de la DEN s'est traduite par une perte de poids, une élévation des enzymes hépatiques, et de possibles altérations histologiques. Les souris ont été sacrifiées à 6 stades circadiens pour étude histologique du foie et dosage des transaminases 24 heures après la dernière injection de DEN. La perte maximale de poids était plus importante chez les souris sauvages par rapport aux souris *Per2^{m/m}* à tous les stades circadiens étudiés (Analyse de variance, $p \leq 0.04$) sauf à ZT11. Ainsi la perte maximale de poids ainsi que la mortalité toxique suivaient un rythme circadien chez les souris sauvages, avec un minimum à ZT11. Aucun rythme de toxicité ne caractérisait les souris *Per2^{m/m}*. De plus, la mortalité globale était six fois supérieure chez les souris sauvages par rapport aux souris *Per2^{m/m}* (22% vs 3.5%, test de χ^2 : $p = 0.001$). Le taux moyen d'ALAT était plus élevé chez les souris sauvages en comparaison des souris *Per2^{m/m}* ($p = 0.008$), tandis que le taux moyen d'ASAT était similaire dans les deux génotypes. Les taux d'ALAT et d'ASAT n'ont montré aucun rythme circadien chez les souris femelles sauvages et *Per2^{m/m}*. L'étude histologique n'a pas montré de différence entre les deux génotypes pour tous les horaires d'administration de DEN testés.

Cette étude montre une toxicité générale (perte de poids et mortalité) de DEN plus importante chez les souris sauvages que chez les souris *Per2^{m/m}*, et confirme le rôle de l'horloge moléculaire dans la toxicité de la DEN, au cours de la phase d'initiation cancéreuse.

V.5.2. Résultats

Perte maximale de poids corporel

La perte moyenne de poids corporel était moindre chez les souris *Per2^{m/m}* en comparaison des souris sauvages ($15 \pm 2\%$ vs $23 \pm 2\%$, $p = 0.014$). La perte maximale de poids corporel moyenne variait de 16% à 27,7% chez les souris sauvages, et de 12,25% à 20% chez les souris *Per2^{m/m}* en fonction du ZT d'administration (Analyse de variance, $p < 0,01$) (Figure 36). L'analyse de variance a validé une variation temporelle de la perte maximale de poids dans les deux génotypes (effet de temps, $p < 0.001$). Chez les souris sauvages, l'analyse de Cosinor a montré une rythmicité d'une période de 12 heures de la perte maximale de poids corporel ($p = 0.03$), avec une meilleure tolérance trouvée à ZT11 et pire à ZT7. Alors que chez les souris *Per2^{m/m}*, aucune variation temporelle de la perte de poids n'a été validée. Ainsi, la perte maximale de poids était plus importante chez les souris sauvages par rapport aux souris *Per2^{m/m}*, à tous les stades circadiens d'administrations à l'exception de ZT11 (Analyse de variance, $p \leq 0.04$).

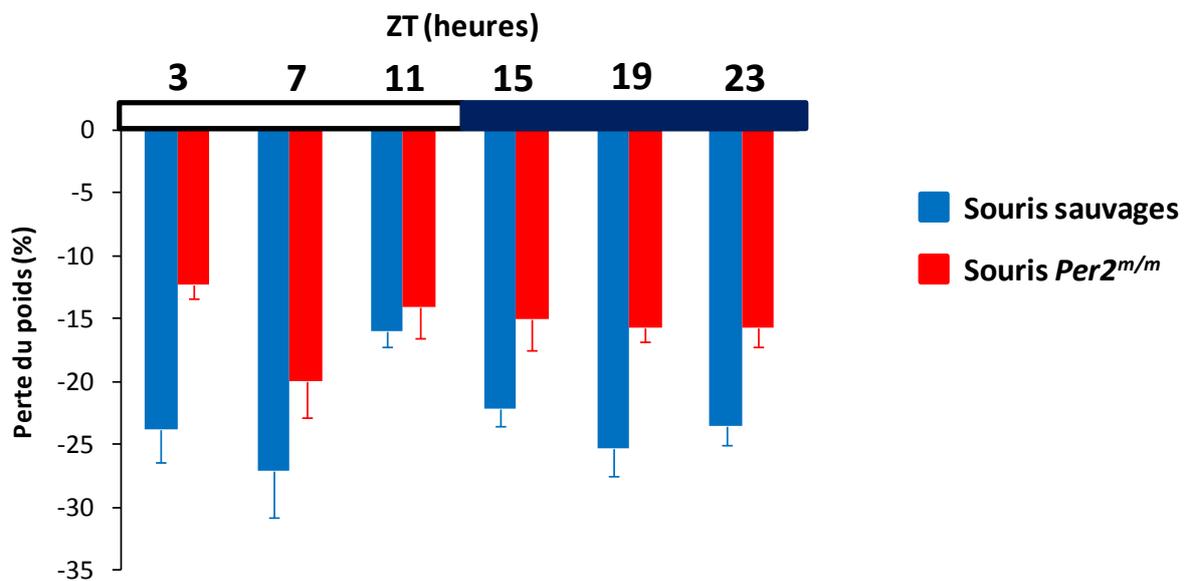


Figure 36 : Perte maximale de poids corporel en fonction de l'heure d'administration de la diéthylnitrosamine chez des souris ♀ sauvages et *Per2^{m/m}*.

Mortalité

La mortalité globale était plus élevée chez les souris sauvages par rapport aux souris *Per2^{m/m}* (22% vs 3.5% , test de χ^2 : $p = 0.001$). La mortalité des souris sauvages était de 57% après DEN

à ZT7 et de 0% après DEN à ZT11 (Figure 37). Aucune mortalité n'a été observée chez les souris mutantes du gène *Per2* pour ZT3, 7, 11, 15, et 19, tandis que le point ZT23 a montré une différence significative de mortalité entre les souris sauvages et *Per2^{m/m}* (14% vs. 33%).

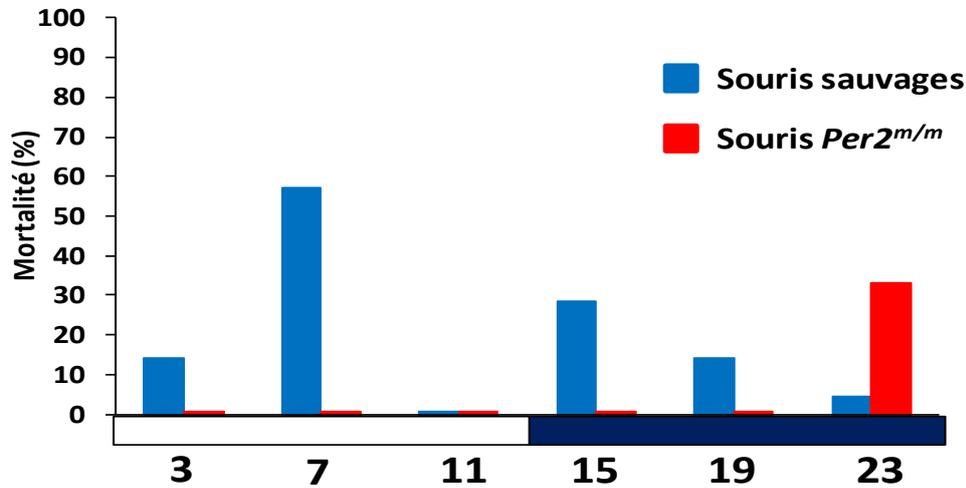


Figure 37 : Taux de mortalité en fonction de l'heure d'administration chez des souris ♀ sauvages et *Per2^{m/m}* exposées à la diéthylnitrosamine.

Taux sériques des enzymes hépatiques circulantes

Dans les souris des deux génotypes, les concentrations sériques d'ALAT et d'ASAT n'ont pas montré de rythme circadien validé (Figure 38). Les principaux résultats obtenus par analyse de variance (ANOVA) ne font ressortir aucune influence de génotype, du stade circadien d'administration de la DEN, ou de leur interaction sur les concentrations d'ASAT. Le taux moyen d'ALAT était moindre chez les souris *Per2^{m/m}* par rapport aux souris sauvages ($p=0.008$). Aucun effet du stade circadien ni aucune interaction entre temps et génotype n'ont été statistiquement validés pour le taux d'ALAT.

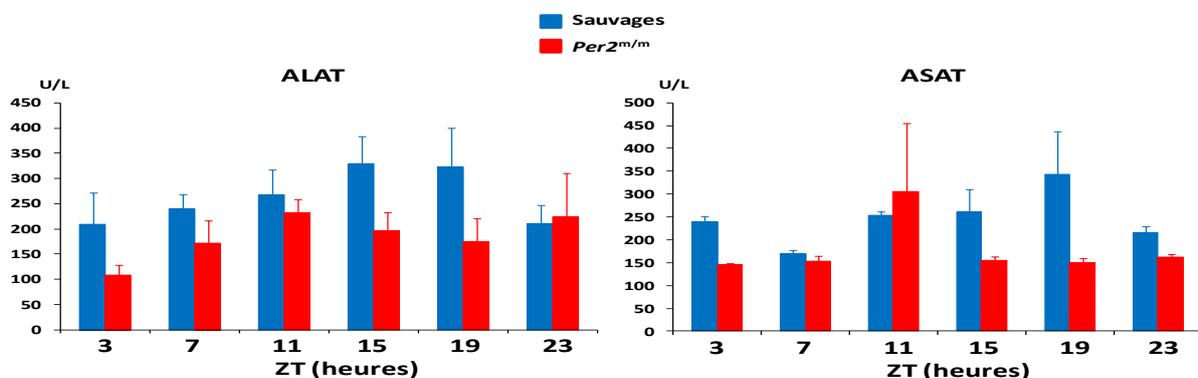


Figure 38 : Concentrations sériques d'ALAT et d'ASAT chez des souris ♀ sauvages et *Per2^{m/m}* exposées à la diéthylnitrosamine.

Lésions histologiques hépatiques

L'exposition des souris à la DEN a été associée histologiquement à la présence de lésions d'hépatite associée à des foyers inflammatoires et la présence de cellules nécrotiques et apoptotiques. Aucune différence histologique n'a été observée en fonction du génotype ou du ZT d'administration de la DEN.

V.5.3. Discussion et Conclusions

Dans cette étude, on a étudié l'effet de la mutation du gène *Per2* sur la chronotoxicité de la diéthylnitrosamine chez les souris femelles. Nous avons évalué la toxicité de la DEN par 4 paramètres : la perte de poids, le taux de la mortalité, les taux de transaminases circulantes, et les altérations histologiques hépatiques. Nous avons trouvé que la perte moyenne et maximale de poids corporel, les taux d'ALAT, et le taux de la mortalité étaient moindres chez les souris *Per2^{m/m}*. De plus, la perte de poids maximale et la mortalité suivaient un rythme circadien avec une moindre toxicité de la DEN à ZT11 chez les souris sauvages. Au contraire, aucun rythme de toxicité n'a été mis en évidence chez les *Per2^{m/m}*, confirmant le rôle de l'horloge moléculaire dans la chronotoxicité de ce xénobiotique. Cependant les taux d'ASAT et d'ALAT ne différaient pas de façon statistiquement significative selon le génotype ou l'heure d'administration de DEN, indiquent une dissociation entre toxicité systémique, évaluée par la perte de poids et la mortalité, et altérations hépatiques complexes reflétées par les concentrations sériques de transaminases et l'analyse histologique des foies de ces animaux. La DEN est un cancérigène hépatique dont le métabolisme est régulé par l'horloge circadienne. Il a été montré que le métabolisme de DEN est inhibé par le gène *Per2* (Verna *et al.*, 1996, Matsunaga *et al.*, 2007). Nous émettons l'hypothèse d'une toxicité de la DEN supérieure chez les souris *Per2^{m/m}*. A l'inverse, la toxicité de la DEN s'est révélée moindre chez les souris *Per2^{m/m}* par rapport aux souris sauvages, à l'exception du stade circadien ZT11. Dans notre première étude (partie V.2 de résultats), nous avons trouvé que les souris mâles *Per2^{m/m}* exposées à la DEN à ZT11 étaient davantage susceptibles de développer des cancers hépatiques en comparaison des souris sauvages. Possiblement, la toxicité systémique de la DEN et sa cancérigénicité hépatique suivent des mécanismes distincts, ainsi que l'illustre également la dissociation entre toxicité et cancérigénicité de la DEN chez les souris *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}*. En outre, le sexe des animaux pourrait jouer un rôle très important dans la

modulation de la chronotoxicité de la DEN, ainsi que nous l'avons mis en évidence pour l'irinotécan.

En effet, dans une étude récente de notre laboratoire, à laquelle j'ai participé (partie V.6. de résultats), nous avons montré que la mutation du gène *Per2* et le sexe des animaux affectait la chronotoxicité de l'irinotécan chez la Souris. Le sexe joue aussi un rôle important dans le métabolisme des médicaments, partiellement via les hormones sexuelles. L'ensemble de ces résultats indique que la mutation *Per2* modifie la toxicité des xénobiotiques (irinotécan, diéthylnitrosamine), de façon dépendante du sexe.

V.6. Personnalisation de la chronothérapie du cancer

V.6.1. Résumé

L'administration des médicaments anticancéreux selon le rythme circadien des patients a considérablement amélioré leur tolérance et leur efficacité, mais a révélé l'existence de différences interindividuelles importantes. En utilisant des souris des deux sexes de 3 souches différentes, on a identifié 3 classes de la chronotoxicité de l'irinotecan, un inhibiteur de topoisomérase 1 utilisé dans le traitement du cancer colorectal. La mesure de l'expression circadienne de 27 gènes a été réalisée dans le foie et le colon des souris de ces 3 classes. L'analyse parcimonieuse discriminante a permis d'identifier que les expressions de *Bmal1* et de *Rev-erba* discriminaient le mieux ces trois classes de chronotoxicité. Une avance de phase de 8 heures a été trouvée pour les deux gènes *Bmal1* et *Rev-erba*, ainsi que pour la chronotoxicité de l'irinotecan chez les souris *Per2^{m/m}*. Le développement d'un modèle mathématique linéaire basé sur l'expression circadienne de *Bmal1* et de *Rev-erba*, a permis de prédire l'heure optimale de l'irinotecan. L'évaluation des expressions circadiennes de *Bmal1* et *Rev-erba* pourrait améliorer la tolérance à la chimiothérapie grâce à ce modèle capable de fournir l'heure optimale du traitement. *Conclusions principales*: L'heure de moindre toxicité d'un médicament anticancéreux varie de 8 heures dans six catégories différentes de souris de sexe et génotype distincts. L'horaire de traitement optimal peut être prédit par un modèle mathématique qui utilise l'expression circadienne de *Bmal1* et *Rev-erba* hépatique comme données d'entrée, et la tolérance au traitement comme paramètre de sortie.

Cancer Research



A Circadian Clock Transcription Model for the Personalization of Cancer Chronotherapy

Xiao-Mei Li, Ali Mohammad-Djafari, Mircea Dumitru, et al.

Cancer Res 2013;73:7176-7188. Published OnlineFirst October 23, 2013.

Updated version	Access the most recent version of this article at: doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1528
Supplementary Material	Access the most recent supplemental material at: http://cancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2013/10/22/0008-5472.CAN-13-1528.DC1.html

Cited Articles	This article cites by 47 articles, 16 of which you can access for free at: http://cancerres.aacrjournals.org/content/73/24/7176.full.html#ref-list-1
----------------	---

E-mail alerts	Sign up to receive free email-alerts related to this article or journal.
Reprints and Subscriptions	To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at pubs@aacr.org .
Permissions	To request permission to re-use all or part of this article, contact the AACR Publications Department at permissions@aacr.org .

A Circadian Clock Transcription Model for the Personalization of Cancer Chronotherapy

Xiao-Mei Li^{1,4}, Ali Mohammad-Djafari⁵, Mircea Dumitru⁵, Sandrine Dulong^{1,4}, Elisabeth Filipiński^{1,4}, Sandrine Siffroi-Fernandez⁶, Ali Mteyrek^{1,4}, Francesco Scaglione⁷, Catherine Guettier², Franck Delaunay⁵, and Francis Lévi^{1,3,4}

Abstract

Circadian timing of anticancer medications has improved treatment tolerability and efficacy several fold, yet with intersubject variability. Using three C57BL/6-based mouse strains of both sexes, we identified three chronotoxicity classes with distinct circadian toxicity patterns of irinotecan, a topoisomerase I inhibitor active against colorectal cancer. Liver and colon circadian 24-hour expression patterns of clock genes *Rev-erba* and *Bmal1* best discriminated these chronotoxicity classes, among 27 transcriptional 24-hour timeseries, according to sparse linear discriminant analysis. An 8-hour phase advance was found both for *Rev-erba* and *Bmal1* mRNA expressions and for irinotecan chronotoxicity in clock-altered *Per2^{tm/m}* mice. The application of a maximum-a-posteriori Bayesian inference method identified a linear model based on *Rev-erba* and *Bmal1* circadian expressions that accurately predicted for optimal irinotecan timing. The assessment of the *Rev-erba* and *Bmal1* regulatory transcription loop in the molecular clock could critically improve the tolerability of chemotherapy through a mathematical model-based determination of host-specific optimal timing. *Cancer Res*; 73(24); 7176–88. ©2013 AACR.

Major Findings

The optimal circadian timing of an anticancer drug was predicted despite its variation by up to 8-hour along the 24 hours among six mouse categories. This prediction relied on a mathematical model using liver circadian expression of clock genes *Rev-erba* and *Bmal1* as input data and treatment tolerability as output parameter.

Introduction

A significant improvement in the safety of cancer therapies could result from adequate drug timing within the 24 hours, as

Authors' Affiliations: ¹INSERM UMRS 776 «Rythmes biologiques et cancers», ²Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, ³Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Unité de Chronothérapie, Département d'Oncologie Médicale, Hôpital Paul Brousse, Villejuif; ⁴Université Paris-Sud, Orsay; ⁵Laboratoire des Signaux et Systèmes, UMR8506 CNRS-SUPELEC-UNIV PARIS-SUD, Gif-sur-Yvette; ⁶University of Nice-Sophia-Antipolis, Institute de Biologie Valrose, CNRS UMR 7277, INSERM 1091, Nice, France; and ⁷Department of Medical Biotechnology and Translational Medicine, University of Milan, Milan, Italy

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

Corresponding Author: Francis Lévi, INSERM UMRS 776, Rythmes Biologiques et Cancers, Campus CNRS, 7 rue Guy Môquet, Villejuif 94800, France. Phone: 33149583483; Fax: 33149583459; E-mail: francis.levi@inserm.fr

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1528

©2013 American Association for Cancer Research.

shown in international randomized trials (1). Indeed a fixed circadian delivery schedule—so-called chronotherapy—improved tolerability of 5-fluorouracil/leucovorin/oxaliplatin up to 5-fold as compared with constant rate or differently timed chronomodulated infusions of the same drugs over the same infusion duration (2, 3). In experimental models, systemic and organ-specific toxicities of forty anticancer medications varied up to 10-fold according to circadian timing, supporting the concept of chronotoxicity (1). Strikingly, the timing of best drug tolerability coincided with that of best efficacy (1, 4–6). This puzzling finding was best explained both by the disruption of circadian clocks and by cell-cycle variability in cancer cells (7). Indeed the delivery of medications according to circadian timing could shift the current cancer treatment paradigm from “the worse the toxicity, the better the efficacy” toward “the better the tolerability, the better the efficacy” (1, 6, 8). Chronotherapy effects resulted from the rhythmic control of drug absorption, transport, metabolism, detoxification, drug targets, cell cycle, and apoptosis by circadian clocks (1, 9–16). Indeed, a molecular clock ticks within most body cells through 3 main interwoven transcriptional/posttranslational feedback loops. These molecular clocks are coordinated by a central pacemaker in the hypothalamic suprachiasmatic nuclei, through diffusible and neurophysiologic signals (17, 18). Recent extensive clinical data showed that male patients on a fixed chronotherapy schedule survived significantly longer than both female patients on the same schedule and male patients on conventional delivery (19, 20). We assumed that the fixed chronotherapy schedule was optimal in male patients, as it was developed on the basis of results from experiments in male mice and humans (19). Thus, it so happened that most

Quick Guide to Equations and Assumptions

Here, we present the mathematical model that was designed for predicting the circadian rhythm in drug toxicity, using body weight loss (BWL) as main toxicity endpoint, based on circadian clock gene expression data. The inputs of this linear system model are the circadian clock gene expressions data, whereas outputs are BWL data. The model matrix is trained to respond to each input (gene expression data) with the corresponding output (BWL data) for a finite number of cases (training set). Then, another set of data (validating set) is used for measuring model performance. For the training part, we adopt a Bayesian estimation approach that is summarized as follows: considering the linear model $g_k = H f_k + \epsilon_k$, $k = 1, 2, \dots, K$, where g_k represents the output vector (BWL), H is the model matrix, f_k represents the input data (gene expression data, *Rev-1* and *Bmal1*), ϵ_k represents modeling and measurements errors, and K is the number of cases. We assign a normal distribution for the errors ϵ_k , which gives the possibility to define the likelihood of all sets of data, and we also assign a normal distribution to the unknown elements of the matrix H to translate our prior knowledge about it:

$$p(g|H; f; v) \propto \exp \left(-\frac{1}{2v} \sum_{k=1}^K (g_k - H f_k)^2 \right); p(H) \propto \exp \left(-\frac{1}{2v_H} \sum_{k=1}^K H^2 \right) \quad \text{A}$$

where v_0 is the variance of the noise, v_H represents the a priori variance of the elements of the matrix H , and \propto represents "proportional to." Using the likelihood and the prior, we use the Bayes rule to obtain the expression of the posterior law:

$$p(H|g; f; v; v_H) \propto \exp \left(-\frac{1}{2v} \sum_{k=1}^K (g_k - H f_k)^2 - \frac{1}{2v_H} \sum_{k=1}^K H^2 \right) \quad \text{B}$$

Finally, we propose to use the maximum-a-posteriori (MAP) estimate defined as:

$$\hat{H} = \arg \max_H p(H|g; f; v; v_H) \propto \arg \min_H \left(\frac{1}{2} \sum_{k=1}^K (g_k - H f_k)^2 + \frac{1}{2} \sum_{k=1}^K H^2 \right) \quad \text{C}$$

which leads to the optimization of the criterion:

$$J(H) = \frac{1}{2v} \sum_{k=1}^K (g_k - H f_k)^2 + \frac{1}{2v_H} \sum_{k=1}^K H^2 \quad \text{D}$$

where $I = \frac{1}{v_H}$. This criterion is a quadratic function of H and the argument of its optimum obtained analytically as:

$$\hat{H} = \frac{\sum_{k=1}^K g_k f_k^T}{\sum_{k=1}^K f_k f_k^T + I} \quad \text{E}$$

The proposed model is a simple linear one. The assigned prior laws are Gaussian (A). This simplifies the expression of the posterior law, which is also Gaussian (B), and both MAP and posterior mean (PM) estimators become the same, so that we have an analytical expression for it (E). No other assumption was added to the model. An interesting extension would involve the use a prior law that could enforce the sparsity of the elements of the model matrix. However, the limited numbers of training and validating experimental data sets (4 and 2, respectively) call for caution regarding a broad generalization of model predictions.

scientific investigations have been usually conducted in male experimental models and humans, besides reproductive tract studies.

In the current study, a systems biology approach combined in vivo and in silico studies to concurrently address the issue of sex and genetic dependencies of optimal chemotherapy timing using irinotecan as a model drug. This anticancer agent is a topoisomerase I inhibitor with proven efficacy against colorectal and other cancers. Yet it can produce severe neutropenia, diarrhea, and fatigue, and compromise quality of life, and even survival (21–23). Previous mouse studies showed that circadian timing significantly modified hematologic and/or intestinal toxicities of irinotecan. However its optimal drug timing varied

by up to 8 hours in mice under similar light/dark synchronization according to the different publication reports (24–26). Here, we prospectively identified 3 distinct chronotoxicity classes according to sex and genetic background, despite the same photoperiodic synchronization, using both pharmacologic and molecular endpoints. We confirmed the role of molecular clock function for irinotecan chronotoxicity in mice with clock gene *Per2* mutation. The data helped us design a mathematical model that accurately predicted for optimal irinotecan timing according to both clock gene circadian expressions and recapitulated sex and genetic differences. We discuss the implications of this new concept for improving treatment outcomes through personalized chronotherapy.

Materials and Methods

Animals and synchronization

All procedures were conducted in accordance with the French guidelines for animal care and experimentation (Decree 87-843). The studies were carried out in male and female mice of C57BL/6J, B6D2F1 (female C57BL/6 x male DBA2) and B6CBAF1 (female C57BL/6 x male CBA), 7 weeks of age, were purchased from Janvier. Mice were synchronized with an alternation of 12 hours of light (L) and 12 hours of darkness (D) (LD 12:12), with food and water ad libitum for 3 weeks before any intervention. Zeitgeber Time 0 (ZT0) and ZT12 corresponded to L onset and D onset, respectively. All manipulations during the dark span were conducted under dim red light (<7 lux).

Drug

Hydrochloride irinotecan powder was purchased from Chemos GmbH and diluted in sterile water every 2 days on each study day, before injections. The final drug solution was injected intravenously into the retro-orbital venous sinus of the mice (10 mL/kg of body weight).

Experimental designs

For the systemic chronotoxicity experiments, irinotecan was administered daily at ZT3, ZT7, ZT11, ZT15, ZT19, or ZT23 for 4 consecutive days. Overall 720 mice received a daily dose level of 50 mg/kg for C57BL/6J and B6D2F1 or 80 mg/kg for B6CBAF1, according to previous equitoxicity data (27). For the target organ chronotoxicity experiments, mice in each potential chronotoxicity class (total N = 198) received daily irinotecan (50 mg/kg/d) for 4 consecutive days at the ZT corresponding to their respective best and worst tolerability, that is, ZT15 and ZT3 for class 1, ZT11 and ZT23 for class 2, and ZT15 and ZT7 for class 3. Blood cell counts and bone marrow and intestinal damage were assessed 2, 4, and 6 days after irinotecan treatment completion.

For the pharmacokinetic experiment, mice in each class (total N = 240) received a single irinotecan dose (50 mg/kg) at the ZT corresponding to its respective best and worst tolerability. Iterative blood sampling was conducted in separate groups of mice, from 1 minute to 12 hours postdose, according to a transverse design.

For the molecular characterization of the 3 chronotoxicity classes, we determined the mRNA expressions of selected genes in liver and/or in colon mucosa using a total of 72 mice from 3 chronotoxicity classes through tissue sampling at ZT0, ZT3, ZT6, ZT9, ZT12, ZT15, ZT18, or ZT21. We studied clock genes *Rev-erba*, *Per2*, and *Bmal1* and clock-controlled genes involved in irinotecan metabolism—*CES2*, *Top1*, *UGT1A1*, and *DBP*; cell cycle—*Wee1*, *Ccna2*, *Conb2*, and *p21*; and apoptosis—*Bcl2*, *Mdm2*, *Bax*, and *p53*.

The 24-hour patterns in *Rev-erba* and *Bmal1* mRNA expression were documented in the liver of male wild type (WT) and male and female *Per2^{nv/m}* (129SvEv^{Brd} × C57BL/6-Tyr^{c-Brd} background). Five mice were studied in each group at each of 6 time points staggered by 4 hours (ZT3, 7, 11, 15, 19, or 23). To probe the critical role of the molecular clock for irinotecan

chronotoxicity, we used mice with *Per2^{nv/m}* (*Per2^{brdm1}* on 129SvEv^{Brd} × C57BL/6-Tyr^{c-Brd} background and 7 backcross generation in C57BL/6J) in 2 consecutive experiments. This clock-defective model reportedly displayed gradual suppression of the circadian activity rhythm in constant darkness (28), altered corticosterone rhythm, and deregulated cell cycle (29). Irinotecan (50 mg/kg/d × 4 days) was first injected at 1 of 6 ZT in 41 male and 30 female *Per2^{nv/m}* mice, with body weight change being the primary endpoint. To probe the effect of molecular clock disruption on irinotecan target organ toxicities, we administered irinotecan (50 mg/kg/d × 4 days at ZT7) to 16 male *Per2^{nv/m}* or wide type WT mice and obtained blood, femoral bone marrow, and ileum and colon mucosae 48 hours after treatment completion. The circadian molecular clocks were investigated in male corresponding WT and *Per2^{nv/m}* of both sexes (129SvEv^{Brd} × C57BL/6-Tyr^{c-Brd} background).

Hematologic toxicity

Blood and 2 femurs were sampled from each mouse. Bone marrow cells were collected by repeatedly flushing the femurs with PBS through a 26-gauge needle. Circulating leukocytes and lymphocytes and bone marrow nucleated cells were counted with Cell-Dyn 3500R (Abbott Diagnostic).

Histopathology

The ileum and colon were obtained following treatment at 2 ZT's, respectively, corresponding to "best" or "worst" tolerability of each class, or at optimal ZT for *Per2^{nv/m}* mice and fixed into 4% paraformaldehyde. Twenty-four hours later, the samples were dehydrated and embedded into paraffin. Sections were stained with hemalun/erythrosine/safran. Each slide was examined by the same histopathologist, and lesions were graded in a blind manner. Ileum and colon lesions were scored as 1 for each of the following items: surface epithelial cells, villi structure, and crypt gland cells. The sum of all 3 scores was computed as being a toxicity grade, ranging from 0 (normal) to 3 (alteration for each item). Apoptotic cells per 10 crypts were counted in ileum mucosa by a senior pathologist.

Plasma irinotecan and SN-38 pharmacokinetic

Blood was collected at 1, 15, 30, 60, 120, 240, 360, and 720 minutes after irinotecan injection. Plasma was obtained by centrifugation at 850 × g for 10 minutes at 4 °C and then kept at 4 °C until analyses.

Plasma concentrations of irinotecan and SN-38 were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC; ref. 30). Plasma concentrations versus time data were analyzed by noncompartmental methods. Kinetics program was used to calculate area under the concentration curve (AUC), maximum concentration (C_{max}), clearance, volume of distribution (V_d), and elimination $t_{1/2}$ values. AUC for 0 to 12 hours (AUC_{0-12h}) was calculated by using plasma concentration–time curves of irinotecan and SN-38. The AUC calculations were based on the linear trapezoidal rule. Plasma concentration of irinotecan and SN-38 determined in first minute was accepted as C_{max} parameter. The metabolic ratio was computed as AUC_{0-12h} of SN-38/ AUC_{0-12h} of irinotecan.

Quantitative reverse transcription PCR

Colon was sectioned and the colon lumen was washed with PBS and then cut open longitudinally. Colon mucosa was harvested by lightly scraping the surface, then suspended in PBS, and stored at -80°C until RNA extraction.

Total RNA from liver and colon mucosa were purified (31) and stored at -80°C until use. Total RNA was converted to cDNA using random primers and Superscript II (Invitrogen). Quantitative PCR was carried out with a Light Cycler 480 (Roche Diagnostics) using SYBR Green I dye detection. Expression levels were normalized to the levels of the constitutively and nonrhythmically expressed housekeeping gene 36B4, as previously described (32). All primers were obtained from Invitrogen Life Technologies.

Statistical analyses

Means and SEM were calculated and plotted for each set of parameters. Intergroup differences were statistically validated by multiple-way ANOVA with Scheffe post hoc tests.

Rhythm parameters were computed for each group by using standard population Cosinor procedures. Cosinor analysis provided mesor (rhythm-adjusted mean), double amplitude (difference between minimum and maximum of fitted cosine function), and acrophase (time of maximum in best-fitting cosine function, with light onset as phase reference), with their respective 95% confidence limits when $P < 0.05$. Cosinor-computed parameters were compared using the Hotelling t test. All statistical analyses were conducted with dedicated tools developed under SPSS.

Signal and systems analyses

Factor analysis and principal component analysis (PCA) were used to identify the number of factors or principal components best needed to describe the 27 gene expression time series, using FACTORAN and PCA programs for MATLAB. Modified sparse PCA was then used to minimize the number of non-zero elements and select relevant variables in the loading matrix (33). Linear discriminant analysis (LDA) was applied to identify those factors that best discriminated the 3 chronotoxicity classes. This process was complemented by the use of sparse LDA, which jointly searched for the most discriminating and the sparsest loading matrix (34, 35).

The degree of dependencies between 2 variables was robustly measured using Spearman correlation coefficient, without any assumption of a Gaussian distribution (Spearman correlation coefficients were computed between the circadian expressions waveforms). The adjacency tables between the variables and their respective graphical displays were constructed for each organ in each chronotoxicity class.

Mathematical modeling for predicting irinotecan chronotoxicity pattern and optimal timing

The time series of 2 clock gene expressions were used for predicting the chronotoxicity pattern (BWL). The relation between the input data (here, Rev-erba and Bmal1) and the output data (BWL) was assumed to be linear (Supplementary Fig. S1).

The mathematical equations relating the inputs and the outputs for different classes were written as

$$g_k = H f_k + b, \quad k = 1; \dots; K$$

where f_k represented the input vectors, g_k represented the output vectors, H was the model matrix, and K was the number of classes. The MAP criterion used was equivalent to the minimization of the following criterion:

$$J(H, b) = \sum_{k=1}^K \|g_k - H f_k - b\|^2 + \lambda \|H\|^2$$

where λ was the regularization parameter. Minimizing this criterion:

$$\hat{H} = \arg \min_H J(H, b)$$

resulted in the following solution:

$$\hat{H} = \sum_{i=1}^K g_i f_i^T + \lambda I$$

The data representing the input had been sampled every 3 hours, from ZT0 to ZT21, in the non-mutant case, and every 4 hours, from ZT3 to ZT21 in the mutant case. Therefore, the Rev-erba data and Bmal1 data were represented as vectors having the length 8 (an extrapolation is used for the mutant case), so the input vector had the length 16. The data representing the output were sampled every 4 hours, from ZT3 to ZT23, so the BWL data, was represented as a vector having the length 6. Both input and output data represented the mean values of the measured data at every point. The matrix H thus had the dimension 6×16 .

The method was implemented on mean data. The matrix was built using 3 pairs of data representing the non-mutant case and 1 pair of data representing the mutant case (training). For checking the accuracy of prediction, one pair of data representing the non-mutant case and one pair of data representing the mutant case were used (testing).

Results

Chronotoxicity classes

The dosing time dependency of irinotecan tolerability was first investigated in mice according to sex and genetic background, so as to possibly define distinct chronotoxicity classes. Mice on irinotecan lost weight, with a nadir occurring 1 to 3 days after the fourth daily dose and fully recovered pretreatment weight within 1 to 7 days. Maximum BWL varied as a function of circadian timing, sex and strain (ANOVA, $P < 0.001$ for each factor; Fig. 1A and B; Supplementary Fig. S2A–S2C).

Overall, irinotecan was best tolerated in female rather than male mice ($P < 0.001$). Tolerability was best in B6CBAF1 rather than C57BL/6 or B6D2F1 ($P < 0.001$). BWL was most prominent in mice treated at ZT23, that is, near the end of the nocturnal activity span, or at ZT3 or at ZT7 pending upon sex and strain ($P < 0.001$). The relative circadian improvement in irinotecan tolerability ranged from 4.2- to 8.4-fold in female mice and from 1.9- to 3.6-fold in male mice, according to genetic background.

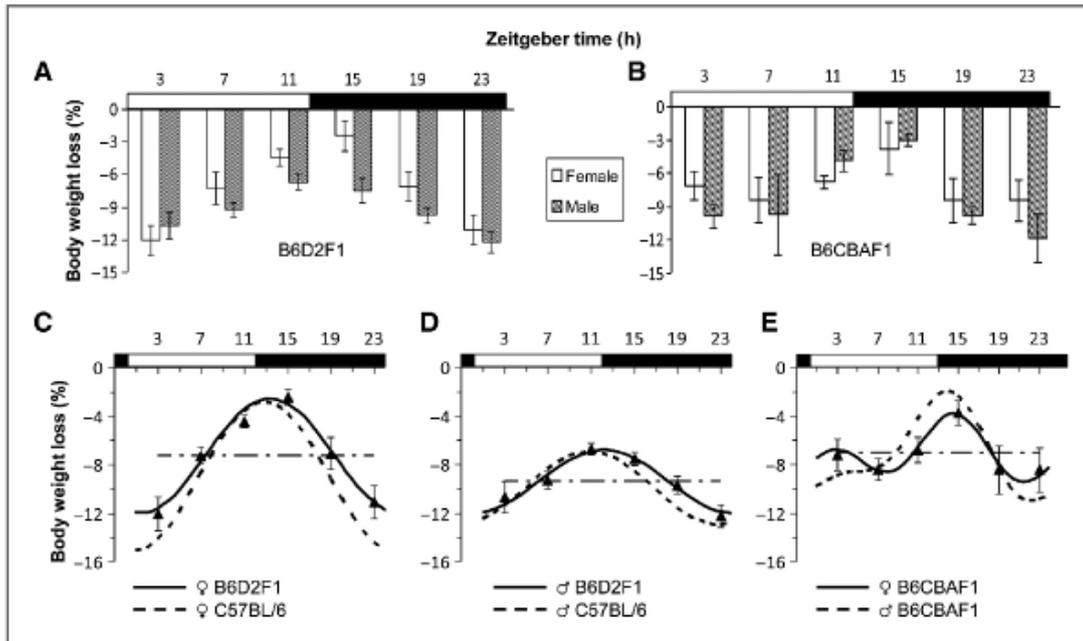


Figure 1. BWL as a function of irinotecan circadian timing in male or female mice from 3 mouse strains. Equitoxic doses of irinotecan were administered daily for 4 days to C57BL/6 or B6D2F1 (50 mg/kg/d) or B6CBAF1 (80 mg/kg/d) at 1 of 6 ZT. Top row, histograms of mean body weight change \pm AESEM according to irinotecan timing (n = 15–45 per ZT for each sex and hybrid background) in B6D2F1 (A) and B6CBAF1 (B). Bottom row, identification of 3 chronotoxicity classes based on the reconstructed circadian patterns with statistically validated 24-hour \pm 12-hour rhythmic components according to Cosinor analysis class 1, female B6D2F1 and C57BL/6 (C); class 2, male B6D2F1 and C57BL/6 (D); class 3, female and male B6CBAF1 (E). Dashed lines, 24-hour mesor value; triangle symbol, mean (AESEM) according to ZT for the respective representatives of each class (class 1, female B6D2F1; class 2, male B6D2F1; class 3, female B6CBAF1). Horizontal axis, white and black rectangles indicate light and dark spans of photoperiodic cycle, respectively. Statistically significant differences as a function of ZT, sex, and strain (P from 2-way ANOVA, <0.001). Modeled circadian maximum and minimum BWL at ZT3 and ZT15 for class 1, at ZT23 and ZT11 for class 2, and at ZT7 and ZT15 for class 3, respectively. See Supplementary Table S1 for results from Cosinor analyses.

Chronotoxicity patterns were similar in C57BL/6 and B6D2F1 mice of the same sex, but they differed in B6CBAF1. Sex-related differences were most obvious in B6D2F1 (Supplementary Fig. S2A and S2B and Supplementary Table S1).

The accuracy of optimal irinotecan timing was further determined among ZT7, ZT11, or ZT15 through adequately powered additional experiments in male and female B6D2F1 and B6CBAF1 mice. The optimal dosing time of irinotecan was confirmed to be ZT11 in male B6D2F1 (ANOVA, $P = 0.034$; post hoc Scheffe test, $ZT7 < ZT11$, $P = 0.041$; Supplementary Fig. S2D). In contrast, treatment at ZT15 achieved best tolerability in female B6D2F1 mice ($P < 0.001$) and in male and female B6CBAF1 ($P = 0.01$ and 0.04 , respectively; Supplementary Fig. S2D and S2E).

The circadian waveform of the toxicity pattern displayed a unimodal 24-hour pattern, with a single fundamental period of 24 hours, both in male and female B6D2F1 ($P < 0.00001$) and C57BL/6 ($P < 0.001$), without any significant 12-hour harmonic component (Supplementary Table S1). Conversely, both 24- and 12-hour periodic components were validated in male and female B6CBAF1. Distinct 24-hour patterns characterized the reconstructed circadian signals as a function of sex and genetic background (Fig. 1C–E).

These results supported the identification of 3 chronotoxicity classes and their underlined representatives for subsequent studies to be conducted: female B6D2F1 and C57BL/6 as class 1, male B6D2F1 and C57BL/6 as class 2, and male and female B6CBAF1 as class 3. These representatives displayed statistically validated differences regarding chronotoxicity mesor, amplitude, timing, and reconstructed waveform (Fig. 1C–E; Supplementary Table S1).

In addition, the extents of both hematologic and intestinal toxicities also depended upon irinotecan timing, in good agreement with body weight change data (Fig. 2A–D). However, no consistent relation-linked drug toxicities and irinotecan or SN-38 plasma pharmacokinetics. The expected positive relation between chronotoxicity and plasma exposure to irinotecan and SN-38 was found for class 1, but not for classes 2 or 3 (Fig. 2E and F; Supplementary Tables S2 and S3). These findings called for investigations of molecular clock and clock-controlled pathways in liver, where irinotecan was bioactivated and detoxified, and in colon, an important toxicity target.

Class-dependent peripheral clocks

To identify molecular markers discriminating the 3 chronotoxicity classes, we determined the circadian patterns in the

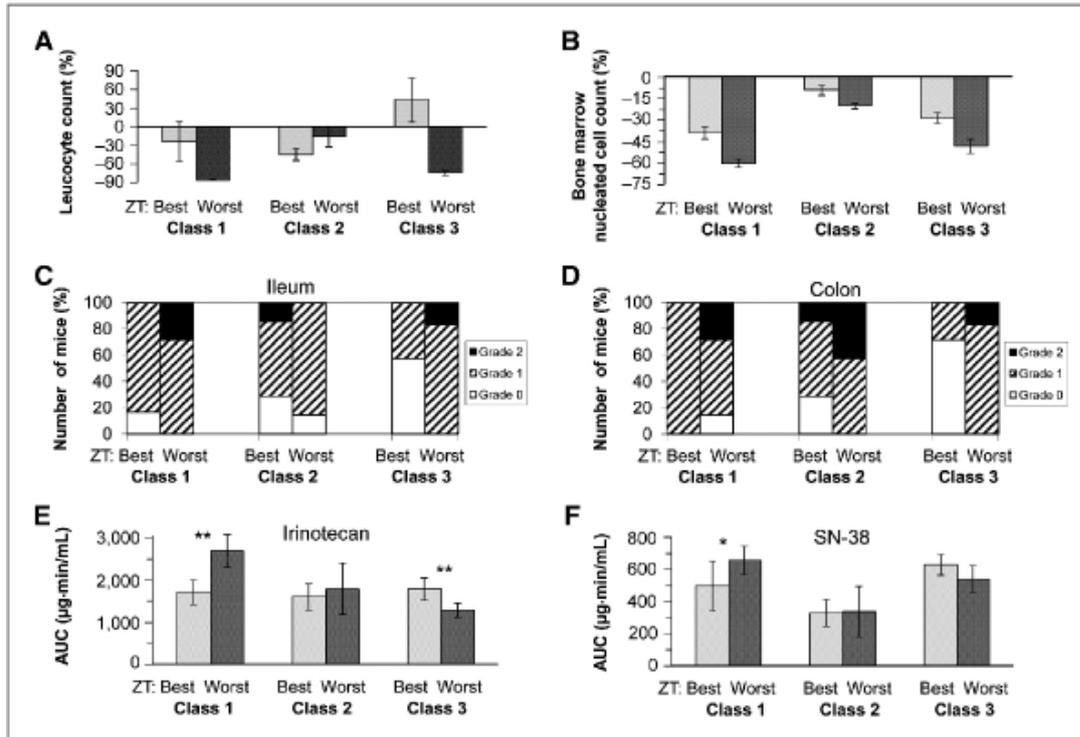


Figure 2. Class-dependent circadian control of hematologic and intestinal toxicities and pharmacokinetics. **A**, leukopenia: the rebound over baseline found for leukocyte count in class 3 treated at ZT15 (best ZT) most likely reflected accelerated hematologic recovery. **B**, bone marrow nucleated cell depletion. **C**, histologic score of ileum mucosa damage. **D**, histologic score of colon mucosa damage. **E**, plasma AUC of irinotecan. **F**, plasma AUC of bioactive metabolite SN-38. Irinotecan was administered at class-specific timing of best or worst tolerability (ZT15 or ZT3 for class 1, ZT11 or ZT23 for class 2, and ZT15 or ZT7 for class 3). Data are mean \pm SEM for **A**, **B**, **E**, **F**, and percentages for **C** and **D**. Bone marrow and intestinal toxicities were significantly reduced following treatment at the class-specific best timing according to ANOVA (leukopenia, $P \leq 0.014$; bone marrow hypoplasia, $P \leq 0.005$), 2-sided Fisher exact test (ileum and colon lesions, $P \leq 0.044$). Statistically significant differences in AUCs consistent with chronotoxicity pattern for class 1 only (2-way ANOVA and multiple comparisons; A , $P < 0.05$; AA , $P < 0.01$). Also note large class-related differences in SN-38 bioactivation following irinotecan administration at the least toxic time, with SN-38 AUC (mean \pm SEM, ng min/mL) ranging from 329 \pm 85 in class 2 to 498 \pm 154 in class 1, and 630 \pm 64 in class 3. All pharmacokinetic parameters analyses in Supplementary Tables S2 and S3.

mRNA expression of relevant genes in liver and colon mucosa (Fig. 3). The largest peak-to-trough differences were found for *Rev-erba*, both in liver (by 360- to 380-fold according to class) and in colon (by 65- to 118-fold). *Per2* expression varied 13- to 17-fold in liver and 7.5- to 15-fold in colon, whereas *Bmal1* ranges 19- to 109-fold in liver and 10- to 15-fold in colon according to class. Cosinor analysis documented sinusoidal circadian rhythms for the expression of all 3 genes, with acrophases occurring near mid-light for *Rev-erba*, near mid-dark for *Per2*, and near the end of the dark span for *Bmal1*. The expression of *Rev-erba* during the light span and that *Bmal1* at night mostly differentiated the 3 classes. The circadian peak of clock-controlled gene *Wee1* in liver occurred at ZT9 in classes 1 and 3, as compared with ZT15 in class 2 (Fig. 3). In colon, *Wee1* peaked at ZT12 in class 1 and ZT15 in classes 2 and 3. For *DBP*, a key clock controlled transcription factor driving circadian drug metabolism, the largest peak-to-trough differences varied 35- to 61-fold in liver and 4- to 18-fold in colon according to class. Circadian peak time occurred at ZT12 in classes 1 and 2 but at ZT9 in class 3 in colon (Fig. 3).

Main molecular patterns differentiating chronotoxicity classes

This issue was investigated through the application of PCA, independent component analysis, and factor analysis on the spectral patterns of the 24-hour liver and colon gene expression timeseries. The maximized log-likelihood ratio increased by 20 to 30 decibels, which corresponded to a 100- to 1,000-fold increase, as a result of the number of factors increasing from 1 to 7. Similarly, the error degrees of freedom decreased by about 60 following an increase in the number of factors from 1 to 7 (Fig. 4A and B). The minimum number of factors best describing the data ranged from 4 to 7 according to organ or class. This result was confirmed with a sparse PCA method, which further identified the most critical gene expression patterns within each factor.

An LDA based on a sparse representation (sparse LDA) helped determine which gene expression patterns best discriminate the 3 classes. The 3 most discriminant gene expression patterns were *Rev-erba*, *Bmal1* and *Top1* in liver, and *Rev-erba*, *Bmal1* and *UGT1A1* in colon as shown on a

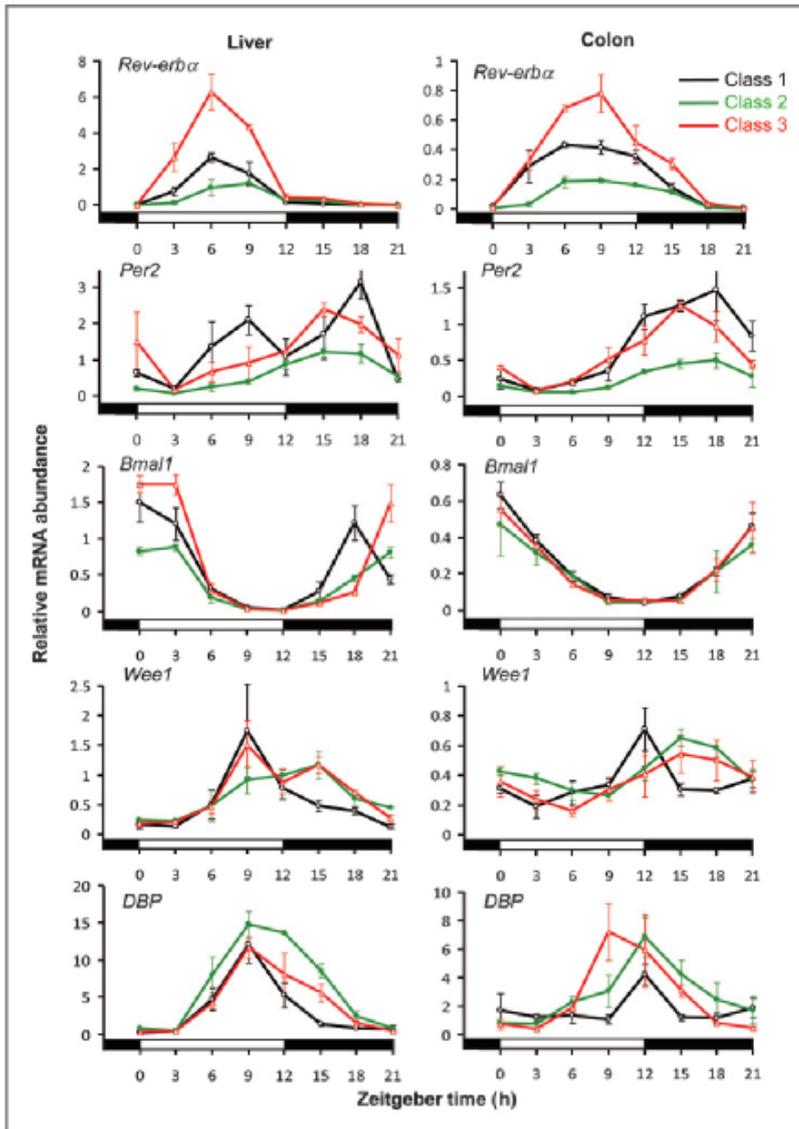


Figure 3. Circadian gene expression patterns according to chronotoxicity class. Mean (\pm SEM) mRNA expression of each gene of interest at each ZT for each chronotoxicity class representative. Horizontal axis, white and black rectangles indicate light and dark spans of photoperiodic cycle, respectively. Statistically significant differences as a function of ZT ($P < 0.001$), class ($P < 0.001$) and organ ($P < 0.001$), with significant ZT and class interaction terms ($P < 0.05$), except for *Bmal1* in colon. Circadian rhythms confirmed with Cosinor.

Hinton display (Fig. 4C). Thus, the 3 classes were mostly differentiated by the circadian clock (*Rev-erba* and *Bmal1*) and the drug metabolism (*Top1*, *UGT1A1*) molecular markers. Other genes such as *p53*, *Bax*, *DBP*, and *CES2* in liver and *p53*, *Mdm2*, and *Bax* in colon also contributed yet to a much lower degree (Supplementary Fig. S3).

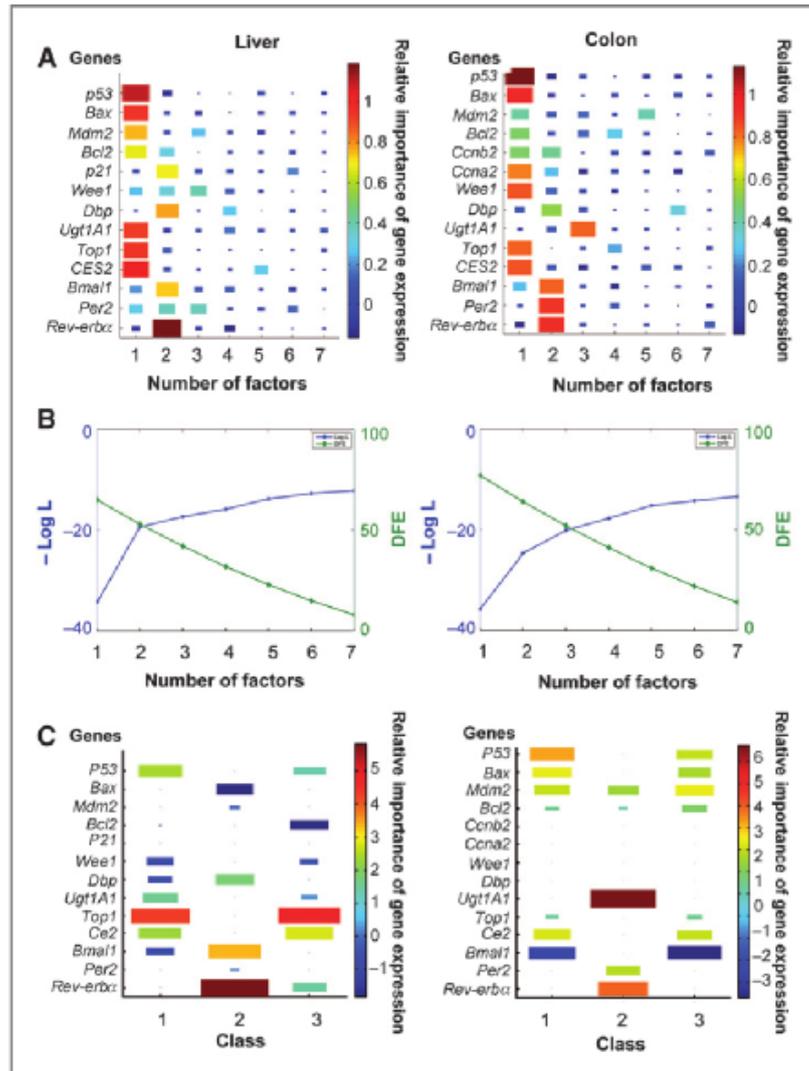
Spearman correlations estimated dependency relations between circadian gene expression patterns in liver and colon. Tight reciprocal interdependencies linked circadian clock gene expression and metabolism, proliferation and apoptosis markers in class 2. This was not the case for classes 1 or 3, a finding

supporting class-specific clock-controlled molecular pathways (Supplementary Fig. S4).

Experimental validation of clock-dependent irinotecan chronotoxicity

The respective roles of sex and molecular clock for irinotecan chronotoxicity were then investigated in *Per2^{fl/m}* mice. Moreover, the circadian rhythms in *Rev-erba* and *Bmal1* mRNA expression was found here to be phase-advanced by 3 to 4 hours in male *Per2^{fl/m}* as compared both with corresponding WT, and with the 3 chronotoxicity classes. Although the

Figure 4. Signal and systems analyses for discriminating chronotoxicity classes based on selected circadian mRNA gene expressions in liver and colon mucosa. A, Hinton representation of the loading matrix of the factors according to factor analysis of gene expressions. The display illustrates the importance of each gene expression as a colored rectangle with dimensions being proportional to the absolute values of the corresponding coefficients in the loading matrix (an intensity colored scale ranging from dark blue for lowest value to brown for highest value). B, error degrees of freedom (DFE) and the maximized log likelihood ($-\log L$) as a function of number of components, according to factor analysis. C, results from sparse LDA of gene expression spectra, with most important variables corresponding to largest rectangle size and "warmest" (red) or "coolest" (blue) color.



Rev-erba 24-hour patterns were similar in male and female $Per2^{fl/m}$, this was not the case for the *Bmal1*, whose amplitude was decreased by 36% and acrophase was advanced by 1:40 in males (Fig. 5A).

The administration of irinotecan to $Per2^{fl/m}$ mice resulted in about 3-fold variation in BWL according to circadian timing and sex. Least toxicity occurred at ZT7 both in male and in female mice. In contrast, worst toxicity occurred following dosing at ZT19 in males or ZT15, ZT19, or ZT23 in females (Fig. 5B). Cosinor analysis and Hotelling t test revealed a statistically significant increase in mean toxicity ($P < 0.0001$) and a 4-hour phase advance in females as compared with males ($P = 0.00006$; Supplementary Table S1). Thus, the molecular clock, sex, and

genetic background were independent determinants of irinotecan chronotoxicity. Following irinotecan dosing at ZT7, hematologic toxicity was significantly worse in $Per2^{fl/m}$ as compared with WT, with regard to counts in circulating leukocytes ($4,961 \pm 2,864$ vs. $2,937 \pm 290$, $P = 0.035$) and lymphocytes ($1,450 \pm 185$ vs. $2,556 \pm 283$, $P = 0.006$), as well as nucleated cell counts in bone marrow ($2,550 \pm 324$ vs. $3,270 \pm 263$, $P = 0.10$). Furthermore, the toxic damage for the ileum mucosa was also more severe in $Per2^{fl/m}$ than in WT mice ($P = 0.03$). Similarly, the count of mean apoptotic cells increased by 41% in $Per2^{fl/m}$ as compared with WT in the ileum mucosa (Fig. 5C–E). In contrast, no significant genotype-related difference was found for toxic lesions or rate of apoptotic cells in colon mucosa. Thus, the critical role of *Per2* for

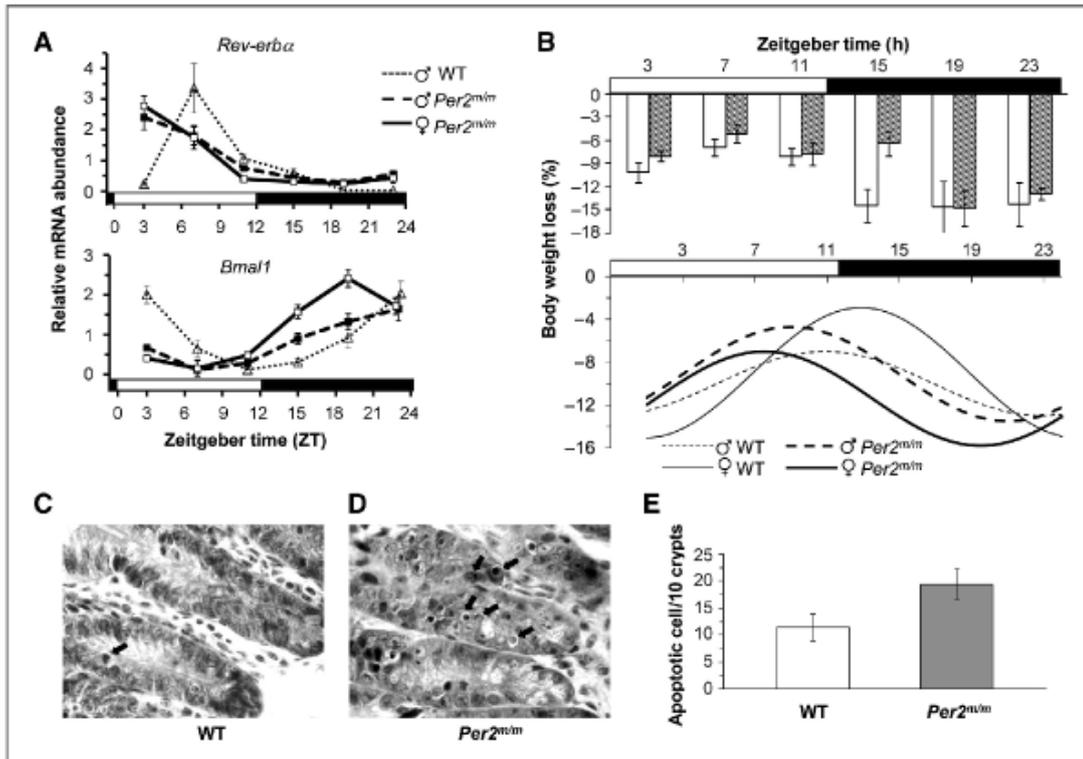


Figure 5. Irinotecan chronotoxicity in mice with disrupted clock. **A**, twenty-four hour changes in mean (±SEM) mRNA expression of clock genes *Rev-erba* and *Bmal1* in male WT and in male or female *Per2^{mut/m}* mice (129SvEv^{B6} × C57BL/6-Tyr^{-Brd} background) kept in LD 12:12. Statistically significant differences as a function of ZT for each sex (*P* from ANOVA <0.001) and confirmed sinusoidal rhythmic patterns (*P* from Cosinor <0.001). **B**, mean BWL as a function of irinotecan circadian timing (50 mg/kg/d × 4 days) in male or female *Per2^{mut/m}* mice (C57BL/6 background). Top row, real data in *Per2^{mut/m}* mice. Bottom row, reconstructed circadian patterns with statistically validated 24-hour rhythm according to Cosinor analysis for *Per2^{mut/m}* and WT littermates (C57BL/6) mice. Horizontal axis, white and black rectangles indicate light and dark spans of photoperiodic cycle, respectively. Circadian rhythms and sex effects validated with 2-way ANOVA (ZT, *P* < 0.001; sex, *P* ¼ 0.04) and Cosinor (*P* ¼ 0.006 in females and *P* ¼ 0.0001 in males). **C** and **D**, representative hemalun/erythrosine/safran histologic slides illustrating irinotecan-induced lesions and apoptosis in the ileum mucosa of WT or *Per2^{mut/m}* (C57BL/6), respectively (microscopic objective 40 and magnification 250×). Arrows indicate typical apoptotic cells. **E**, mean count of apoptotic cells per 10 crypts in ileum mucosa of WT versus *Per2^{mut/m}* mice receiving irinotecan at ZT7 (*P* from *t* test ¼ 0.058).

the hematologic and ileum toxicities of irinotecan was shown here for the first time. Given the different 24-hour patterns in *Rev-erba* and *Bmal1* expression in *Per2^{mut/m}* and in the 3 chronotoxicity classes, and the associated distinct irinotecan chronotoxicity patterns, a mathematical model was then sought to attempt predict for optimal irinotecan timing according to clock genes as input data.

A *Rev-erba* and *Bmal1* model for predicting irinotecan chronotoxicity

A linear model was inferred using a MAP Bayesian inference method. It was first trained and validated on the mean circadian time series from 3 chronotoxicity classes (classes 1, 2, and 3) and from female *Per2^{mut/m}* (M1). The prediction was then tested using data from male B6CBAF1, which belonged to class 3, and male *Per2^{mut/m}* (M2).

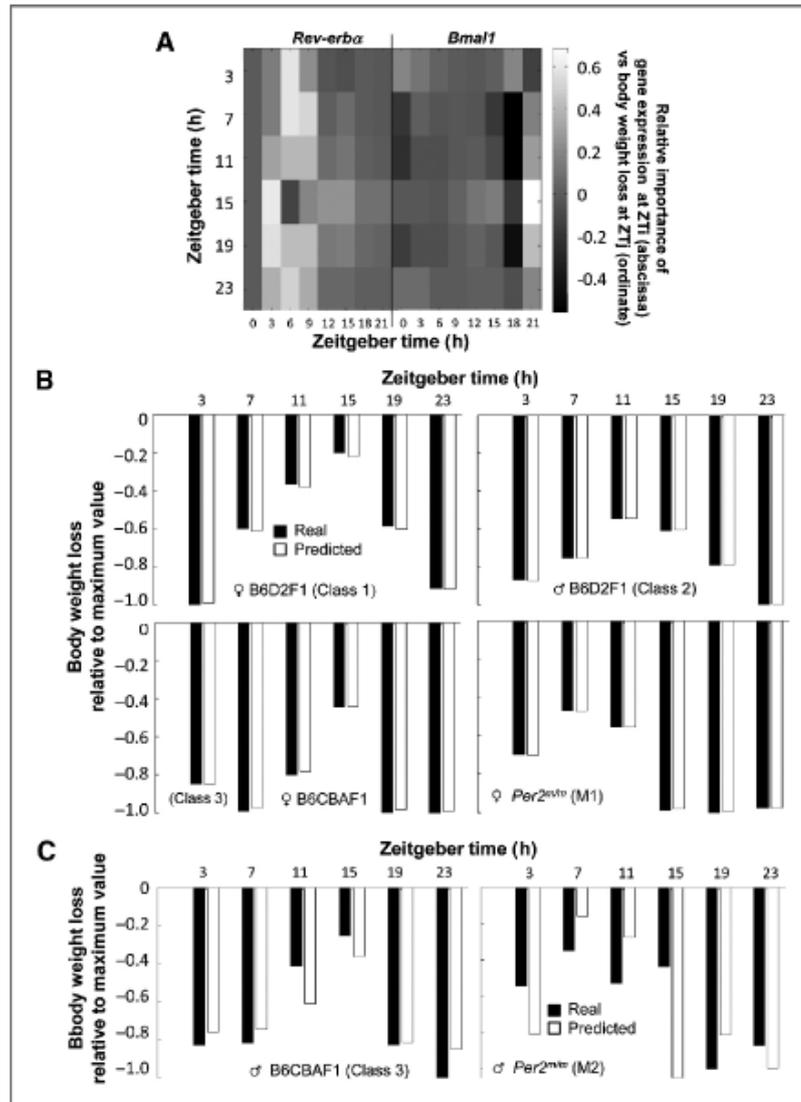
The prediction matrix related the toxicity values on the y-axis to the values of *Rev-erba* and *Bmal1* on the x-axis accord-

ing to ZT. Most of the critical information derived from gene expression was obtained at ZT3 to ZT9 for *Rev-erba* and at ZT18 to ZT24 for *Bmal1* consistently with raw data displayed in Fig. 3 (Fig. 6A). The predicted time series clearly overlapped the real-time series in the 4 groups of the training set (Fig. 6B). Moreover, an accurate prediction of optimal irinotecan timing was obtained for the 4 WT strains, through any permutation between the training set and the validation set. However, the model did not fit all the real data for M2, as a single representative of a clock mutation was available in the training set. Nevertheless, the model reliably predicted the dosing time associated with minimum toxicity for both WT male B6CBAF1 at ZT15 and male *Per2^{mut/m}* at ZT7 in the validation set (Fig. 6C).

Discussion

Our study is the first one that showed that optimal chemotherapy timing could be predicted by clock gene expression

Figure 6. Mathematical model for irinotecan optimal timing prediction according to circadian mRNA expressions of *Rev-erba* and *Bmal1*. A, prediction matrix developed on the training set using input data from female and male B6D2F1 and female B6CBAF1 (classes 1, 2, and 3, respectively), y-axis, toxicity values at different ZT. x-axis, *Rev-erba* and *Bmal1* mean expressions according to ZT. The relative importance of gene expression at ZTI (abscissa) versus BWL at ZTI (ordinate) is visualized using an intensity gray scale ranging from darkest for lowest value to lightest for highest value. B, results in the training set using classes 1, 2, 3, and female *Per2tm* (M1). C, validation set using male B6CBAF1 (class 3) and male *Per2tm* (M2). The accurate prediction of optimal irinotecan timing (ZT associated with minimum BWL) in each of the 6 mouse categories.



patterns irrespective of sex and genotype. Different circadian toxicity profiles were shown for irinotecan in 3 C57BL/6-based mouse strains of both sexes despite synchronization with the same light/dark cycle. Three chronotoxicity classes were identified. The overall toxicity pattern had a single 24-hour periodic component for classes 1 and 2, whereas both 24- and 12-hour components were found for class 3. Optimal timing occurred 4 hours earlier in class 2 as compared with classes 1 and 3. The magnitude of timing-related improvement in tolerability was twice as large in class 1 as compared with classes 2 or 3. Prominent target organ toxicities were hematologic for class 1, intestinal for class 2, and both hematologic and intestinal for

class 3. No consistent relation was found here between drug plasma disposition and toxicity according to circadian timing among the 3 classes, in agreement with prior reports in male ICR mice and in patients with cancer (24, 36). Plasma exposure to irinotecan and other anticancer drugs varied more than 10-fold among individual patients with cancer despite the administration of the same dose level, without debated consistent consequences for adverse events (37, 38). Moreover, a positive relationship between irinotecan and SN-38 plasma AUCs was reported for neutropenia but an opposite one for diarrhea in patients with cancer (22, 39). Indeed, neutropenia was severely worsened in the patients whose UGT1A1 genotype resulted in

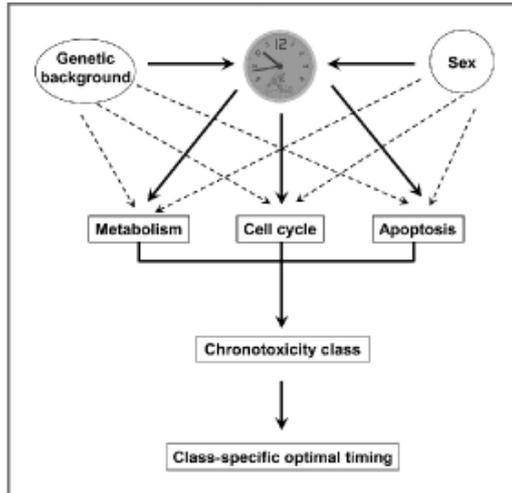


Figure 7. Scheme describing the critical role of the circadian clock in its interaction pathways with metabolism, cell cycle, and apoptosis for the determination of irinotecan chronotoxicity. Regulations identified in the present work (solid line) or in separate studies (dashed line).

impaired glucuronidation of SN-38 by hepatic UGT1A1 enzymes (40). However, ATP-binding cassette transporters, as well as sex and race also contributed significantly to neutropenia in patients with cancer, with less hematologic toxicity being reported in female patients (41). In our study, mathematical analysis of 27 genomic circadian time series pinpointed *Rev-erba* and *Bmal1* clock markers as critical determinants for both optimal timing and amplitude of the tolerability rhythm. The relevance of these molecular clock markers was then validated experimentally in *Per2tm* mice kept under usual photoperiodic synchronization. Furthermore, the circadian amplitude and phase of the mRNA expression of clock-controlled genes *Wee1* and *DBP* varied not only according to tissue, as earlier reported (42, 43), but also according to chronotoxicity class. Clock genes *Clock*, *Bmal1*, or *Cry* and clock-controlled genes *DBP*, *Tef*, and *Hlf* reportedly moderated cyclophosphamide and/or mitoxantrone toxicities at 1 or 2 selected times of day (11, 44). However, no prior study systematically investigated whether clock genes expression patterns could predict optimal drug timing and the respective roles of sex and genotype on such prediction.

The preclinical models here placed circadian clocks and gene expression dynamics at the forefront of the personalization of anticancer therapies. Indeed the predictive value of genetic signatures about toxicity outcomes was moderated by host factors, such as sex and race (20, 45, 46). Moreover, the usefulness of a single genomic tumor assessment for the identification of the most effective drugs was tempered by the clonal heterogeneity of cancer cells and the dynamic changes both in gene mutations and epigenetics (47). Our data support the need for the integration of the molecular clock jointly with sex and genetic background as critical players in the regulation of metabolism, cell cycle, and apoptosis events (Fig. 7). Indeed,

tailoring treatment delivery to the circadian clocks of an individual has the potential to increase treatment tolerability several fold. Anticancer drugs, such as irinotecan, not only target cancer cells but also damage rapidly renewing tissues, including bone marrow and gut mucosa, sometimes resulting in life-threatening neutropenia, asthenia, or diarrhea (48, 49). It is thus crucial to minimize toxicities through personalized drug timing. Indeed treatment toxicities not only deteriorate the quality of life of patients with cancer but also impair the successful development of new anticancer therapies. Recent clinical data further revealed that the minimization of toxicity optimized the anticancer efficacy of circadian chronotherapy. This was not the case for conventional chemotherapy delivery, where the occurrence of hematologic toxicity usually predicted for improved efficacy (4, 5, 8).

In summary, the current study showed that the circadian clock was a critical determinant for achieving several fold improvements in irinotecan tolerability through its delivery at an optimal circadian time. However, optimal drug timing ranged over an 8-hour span according to sex and genetic background despite exposure to the same light/dark schedule. Mathematical modeling using circadian expression of clock genes *Rev-erba* and *Bmal1* as input data enabled accurate prediction of optimal irinotecan timing, a novel finding whose relevance now deserves testing both in experimental settings for other anticancer agents and in clinical situations for irinotecan.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Authors' Contributions

Conception and design: X.-M. Li, A. Mohammad-Djafari, S. Dulong, E. Filipiński, F. Delaunay, F. Levi
 Development of methodology: A. Mohammad-Djafari, M. Dumitru, S. Dulong
 Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): S. Dulong, E. Filipiński, S. Sifroi-Fernandez, A. Mteyrek, F. Scaglione
 Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): X.-M. Li, A. Mohammad-Djafari, M. Dumitru, S. Dulong, E. Filipiński, F. Scaglione, F. Delaunay, F. Levi
 Writing, review, and/or revision of the manuscript: X.-M. Li, A. Mohammad-Djafari, S. Dulong, F. Scaglione, F. Delaunay, F. Levi
 Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): X.-M. Li, A. Mohammad-Djafari, M. Dumitru, E. Filipiński
 Study supervision: X.-M. Li, A. Mohammad-Djafari, E. Filipiński, F. Levi
 Pathologic analysis: C. Guettier

Acknowledgments

The authors thank C. Ahowesso, V. Hossard (INSERM) and S. Brangolo (IBV) for technical assistance in experimental studies and U. Albrecht (University of Freiburg, Freiburg, Switzerland) for the gift of *Per2tm* mice.

Grant Support

This work was supported in part by grant LSHG-CT-2006-037543 from the European Union through STREP TEMPO (Temporal genomics for tailored chronotherapeutics) to F. Levi, F. Delaunay, and F. Scaglione; and CSSys project through grant ANR 2009-SYSB-002-01-04 (ERASySbio) and FP7 to F. Levi, F. Delaunay, and A. Mohammed-Djafari; and the Association pour la Recherche sur le Temps Biologique et la Chronothérapie (ARTBC International, hospital Paul Brousse, Villejuif, France) to X.-M. Li.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received May 31, 2013; revised October 18, 2013; accepted October 18, 2013; published OnlineFirst October 23, 2013.

References

- Levi F, Okyar A, Dulong S, Innominato PF, Clairambault J. Circadian timing in cancer treatments. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2010; 50:377-421.
- Levi F, Zidani R, Misset JL. Randomised multicentre trial of chronotherapy with oxaliplatin, fluorouracil, and folinic acid in metastatic colorectal cancer. *International Organization for Cancer Chronotherapy*. *Lancet* 1997;350:681-6.
- Levi F, Focan C, Karaboué A, de la Valette V, Focan-Henrard D, Baron B, et al. Implications of circadian clocks for the rhythmic delivery of cancer therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 2007;59:1015-35.
- Innominato PF, Giacchetti S, Moreau T, Smaaland R, Focan C, Bjarnason GA, et al. Prediction of survival by neutropenia according to delivery schedule of oxaliplatin-5-Fluorouracil-leucovorin for metastatic colorectal cancer in a randomized international trial (EORTC 05963). *Chronobiol Int* 2011;28:586-600.
- Innominato PF, Giacchetti S, Bjarnason GA, Focan C, Garufi C, Coudert B, et al. Prediction of overall survival through circadian rest-activity monitoring during chemotherapy for metastatic colorectal cancer. *Int J Cancer* 2012;131:2684-92.
- Ortiz-Tudela E, Mteyrek A, Ballesta A, Innominato PF, Levi F. Cancer chronotherapeutics: experimental, theoretical, and clinical aspects. *Handb Exp Pharmacol* 2013;217:261-88.
- Levi F, Altinok A, Goldbeater A. Circadian rhythms and cancer chronotherapeutics. In: Marcus F, Cesario A, editors. *Cancer systems biology, bioinformatics and medicine: research and clinical applications*. Heidelberg, London, New York: Springer Dordrecht; 2011. p. 381-407.
- Innominato PF, Giacchetti S, Moreau T, Bjarnason GA, Smaaland R, Focan C, et al. Fatigue and weight loss predict survival on circadian chemotherapy for metastatic colorectal cancer. *Cancer* 2013;119:2564-73.
- Levi F, Schibler U. Circadian rhythms: mechanisms and therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007;47:593-628.
- Matsuo T, Yamaguchi S, Mitsui S, Emi A, Shimoda F, Okamura H. Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. *Science* 2003;302:255-9.
- Gorbacheva VY, Kondratov RV, Zhang R, Cherukuri S, Gudkov AV, Takahashi JS, et al. Circadian sensitivity to the chemotherapeutic agent cyclophosphamide depends on the functional status of the CLOCK/BMAL1 transactivation complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:3407-12.
- Gréchez-Cassiau A, Rayet B, Guillaumond F, Teboul M, Delaunay F. The circadian clock component BMAL1 is a critical regulator of p21 WAF1/CIP1 expression and hepatocyte proliferation. *J Biol Chem* 2008;283:4535-42.
- Oklejewicz M, Destici E, Tamanini F, Hut RA, Janssens R, van der Horst GT. Phase resetting of the mammalian circadian clock by DNA damage. *Curr Biol* 2008;18:286-91.
- Lee JH, Sancar A. Regulation of apoptosis by the circadian clock through NF-kappaB signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:12036-41.
- Zmrzljak UP, Rozman D. Circadian regulation of endobiotic and xenobiotic detoxification pathways: the time matters. *Chem Res Toxicol* 2012;25:811-24.
- Dallmann R, Viola AU, Tarokh L, Cajochen C, Brown SA. The human circadian metabolome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:2625-9.
- Hastings MH, Reddy AB, Maywood ES. A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 2003;4:649-61.
- Dibner C, Schibler U, Albrecht U. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu Rev Physiol* 2010;72:517-49.
- Giacchetti S, Bjarnason G, Garufi C, Genet D, Iacobelli S, Tampellini M, et al. Phase III trial of 4-day chronomodulated versus 2-day conventional delivery of fluorouracil, leucovorin and oxaliplatin as first line chemotherapy of metastatic colorectal cancer: the European Organization for Research and Treatment of Cancer Chronotherapy Group. *J Clin Oncol* 2006;24:3562-9.
- Giacchetti S, Dugué PA, Innominato PF, Bjarnason GA, Focan C, Garufi C, et al. Sex moderates circadian chemotherapy effects on survival of patients with metastatic colorectal cancer: a meta-analysis. *Ann Oncol* 2012;23:3110-6.
- Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer* 2006;6:789-802.
- Kweeekel D, Guchelaar HJ, Gelderblom H. Clinical and pharmacogenetic factors associated with irinotecan toxicity. *Cancer Treat Rev* 2008;34:656-69.
- Wallace BD, Wang H, Lane KT, Scott JE, Orans J, Koo JS, et al. Alleviating cancer drug toxicity by inhibiting a bacterial enzyme. *Science* 2010;330:831-5.
- Ohdo S, Makinosumi T, Ishizaki T, Yukawa E, Higuchi S, Nakano S, et al. Cell cycle-dependent chronotoxicity of irinotecan hydrochloride in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;283:1383-8.
- Filipski E, Lemaigre G, Liu XH, Mery-Mignard D, Mahjoubi M, Levi F. Circadian rhythm of irinotecan tolerability in mice. *Chronobiol Int* 2004;21:613-30.
- Granda TG, D'Attino RM, Filipski E, Vrignaud P, Garufi C, Terzoli E, et al. Circadian optimization of irinotecan and oxaliplatin efficacy in mice with Glasgow osteosarcoma. *Br J Cancer* 2002;86:999-1005.
- Ahowesso C, Piccolo E, Li XM, Dulong S, Hossard V, La Sorda R, et al. Relations between strain and gender dependencies of irinotecan toxicity and UGT1A1, CES2 and TOP1 expressions in mice. *Toxicol Lett* 2010;192:395-401.
- Zheng B, Larkin DW, Albrecht U, Sun ZS, Sage M, Eichele G, et al. The *Per2* gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock. *Nature* 1999;400:169-73.
- Fu L, Pelicano H, Liu J, Huang P, Lee C. The circadian gene *Period2* plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *Cell* 2002;111:41-50.
- Schoemaker NE, Rosing H, Jansen S, Schellens JH, Beijnen JH. Ther Drug Monit. High-performance liquid chromatographic analysis of the anticancer drug irinotecan (CPT-11) and its active metabolite SN-38 in human plasma. *Ther Drug Monit* 2003;25:120-4.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-9.
- Iurisci I, Filipski E, Reinhardt J, Bach S, Gianella-Borradori A, Iacobelli S, et al. Improved tumor control through circadian clock induction by Seliciclib, a cyclin-dependent kinase inhibitor. *Cancer Res* 2006;66:10720-8.
- Zou H, Hastie T, Tibshirani R. Sparse principal component analysis. *J Comput Graph Stat* 2006;15:265-86.
- Qiao Z, Zhou L, Huang JZ. Sparse linear discriminant analysis with applications to high dimensional low sample size data. *Int J Appl Math* 2008;39:48-60.
- Mohammad-Djafari A. Bayesian approach with prior models which enforce sparsity in signal and image processing. *J Adv Signal Processing* 2012;52.
- Toffoli G, Cecchin E, Corona G, Russo A, Buonadonna A, D'Andrea M, et al. The role of UGT1A1²⁸ polymorphism in the pharmacodynamics and pharmacokinetics of irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:3061-8.
- Chabot GG, Abigeres D, Catimel G, Culine S, de Forni M, Extra JM, et al. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of irinotecan (CPT-11) and active metabolite SN-38 during phase I trials. *Ann Oncol* 1995;6:141-51.
- Saif MW, Choma A, Salamone SJ, Chu E. Pharmacokinetically guided dose adjustment of 5-fluorouracil: a rational approach to improving therapeutic outcomes. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:1543-52.
- Mathijssen RH, van Alphen RJ, Verweij J, Loos WJ, Nooter K, Stoter G, et al. Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11). *Clin Cancer Res* 2001;7:2182-94.
- Hu ZY, Yu Q, Pei Q, Guo C. Dose-dependent association between UGT1A1²⁸ genotype and irinotecan-induced neutropenia: low doses also increase risk. *Clin Cancer Res* 2010;16:3832-42.

Li et al.

41. Innocenti F, Kroetz DL, Schuetz E, Dolan ME, Ramirez J, Relling M, et al. Comprehensive pharmacogenetic analysis of irinotecan neutropenia and pharmacokinetics. *J Clin Oncol* 2009;27:2604-14.
42. Storch KF, Lipan O, Leykin I, Viswanathan N, Davis FC, Wong WH, et al. Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature* 2002;417:78-83.
43. Polidarova L, Sotak M, Sladek M, Pacha J, Sumová A. Temporal gradient in the clock gene and cell-cycle checkpoint kinase Wee1 expression along the gut. *Chronobiol Int* 2009;26:607-20.
44. Gachon F, Olela FF, Schaad O, Descombes P, Schibler U. The circadian PAR-domain basic leucine zipper transcription factors DBP, TEF, and HLF modulate basal and inducible xenobiotic detoxification. *Cell Metab* 2006;4:25-36.
45. Ma BB, Hui EP, Mok TS. Population-based differences in treatment outcome following anticancer drug therapies. *Lancet Oncol* 2010;11:75-84.
46. Wettergren Y, Carlsson G, Odin E, Gustavsson B. Pretherapeutic uracil and dihydrouracil levels of colorectal cancer patients are associated with sex and toxic side effects during adjuvant 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Cancer* 2012;118:2935-43.
47. You JS, Jones PA. Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? *Cancer Cell* 2012;22:9-20.
48. Eng C. Toxic effects and their management: daily clinical challenges in the treatment of colorectal cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2009;6:207-18.
49. Cleeland CS, Allen JD, Roberts SA, Brell JM, Giral SA, Khakoo AY, et al. Reducing the toxicity of cancer therapy: recognizing needs, taking action. *Nat Rev Clin Oncol* 2012;9:471-8.

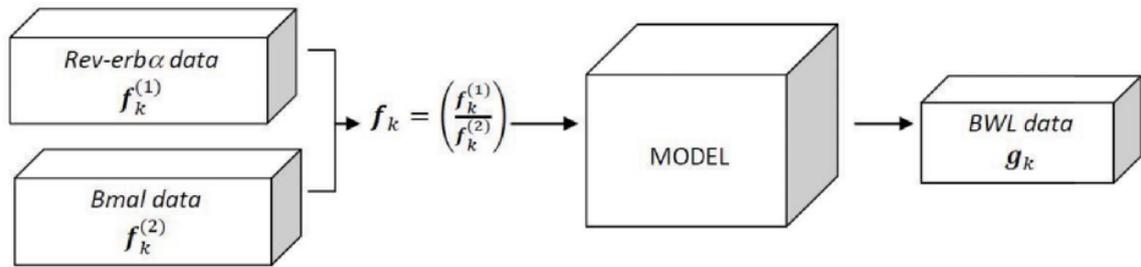
Supplementary figure legend

Supplementary Figure S1. Scheme of the mathematical model, describing the linear relation between input data (mRNA expression of *Rev-erb α* and *Bmal1*) and output data (body weight loss - BWL)

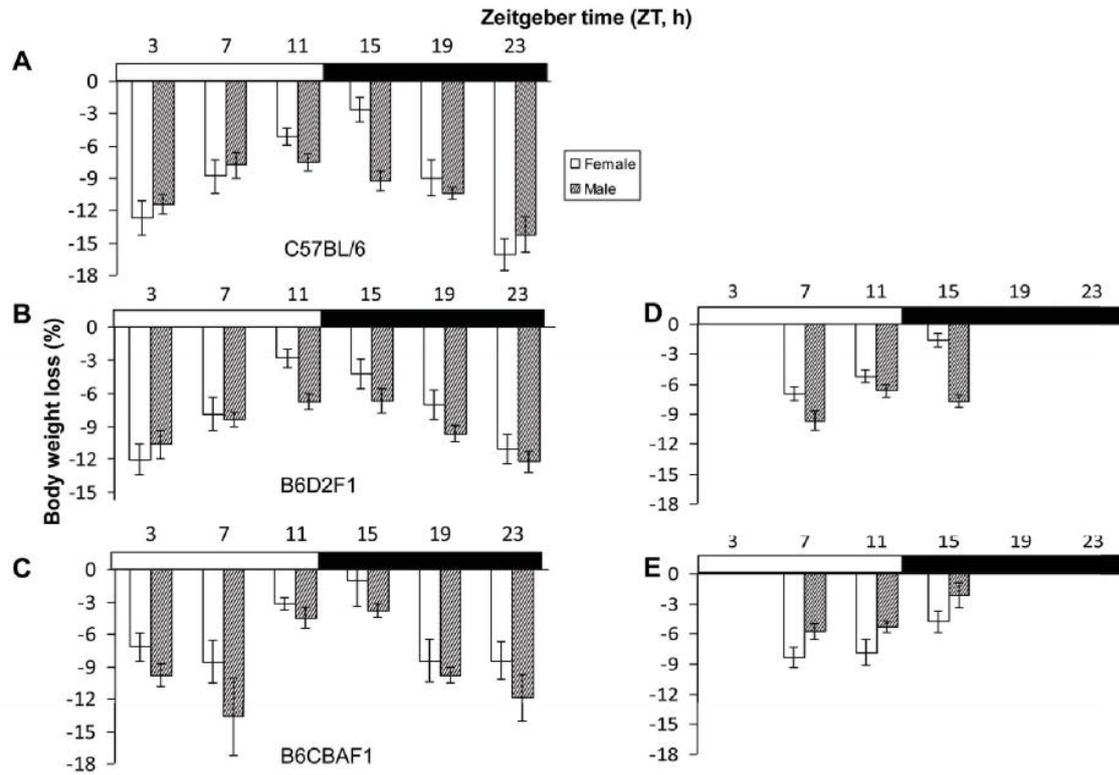
Supplementary Figure S2. Body weight loss as a function of irinotecan circadian timing in male or female mice from three mouse strains. Equitoxic doses of irinotecan were administered daily for 4 days to C57BL/6 or B6D2F1 (50 mg/kg/day) or B6CBAF1 (80 mg/kg/day) at one of six (**A-C**, $n = 15/$ ZT/sex/strain) or three ZTs of additional experiment (**D and E**, $n = 30/$ ZT/sex/strain). Horizontal axis, white and black rectangles indicate light and dark spans of photoperiodic cycle, respectively. *Two-way ANOVA validated statistically significant differences as a function of ZT, sex and strain ($p < 0.001$).*

Supplementary Figure S3. Circadian gene expression patterns in liver and colon mucosa according to chronotoxicity Class. Mean (\pm SEM) mRNA expression of each gene of interest at each ZT for each selected Chronotoxicity Class (Class 1, female B6D2F1; Class 2, male B6D2F1; Class 3, female B6CBAF1). Horizontal axis, white and black rectangles indicate light and dark spans of photoperiodic cycle, respectively.

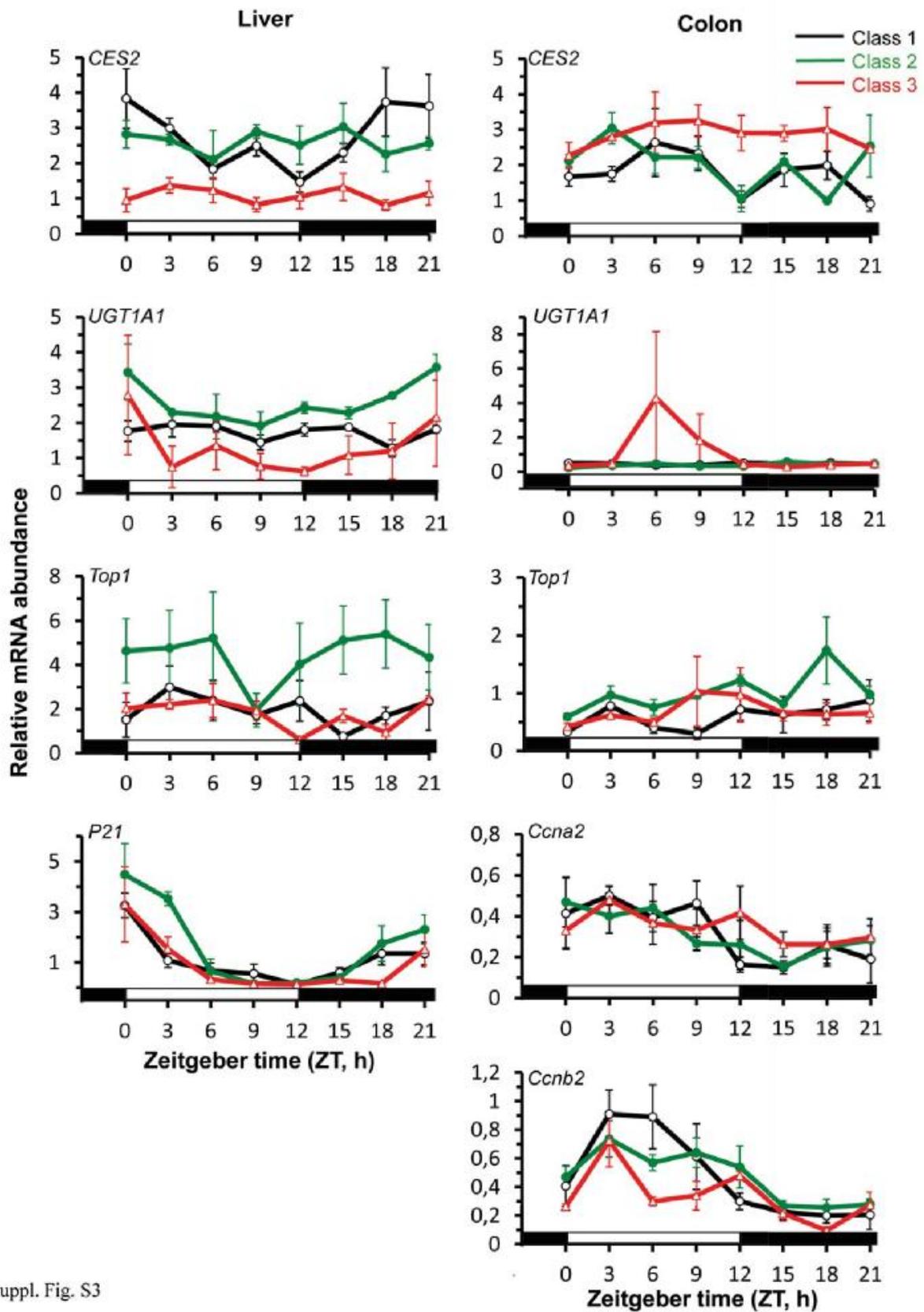
Supplementary Figure S4. Discriminating chronotoxicity Classes based on selected circadian mRNA gene expressions in liver and colon mucosa. Spearman correlation graph of links between gene expressions patterns in each organ and Chronotoxicity Class, whenever the correlation coefficient between two time series is ≥ 0.85). *Direct links are obvious for Class 2, while indirect modulation is apparent for Class 1 and 3.*



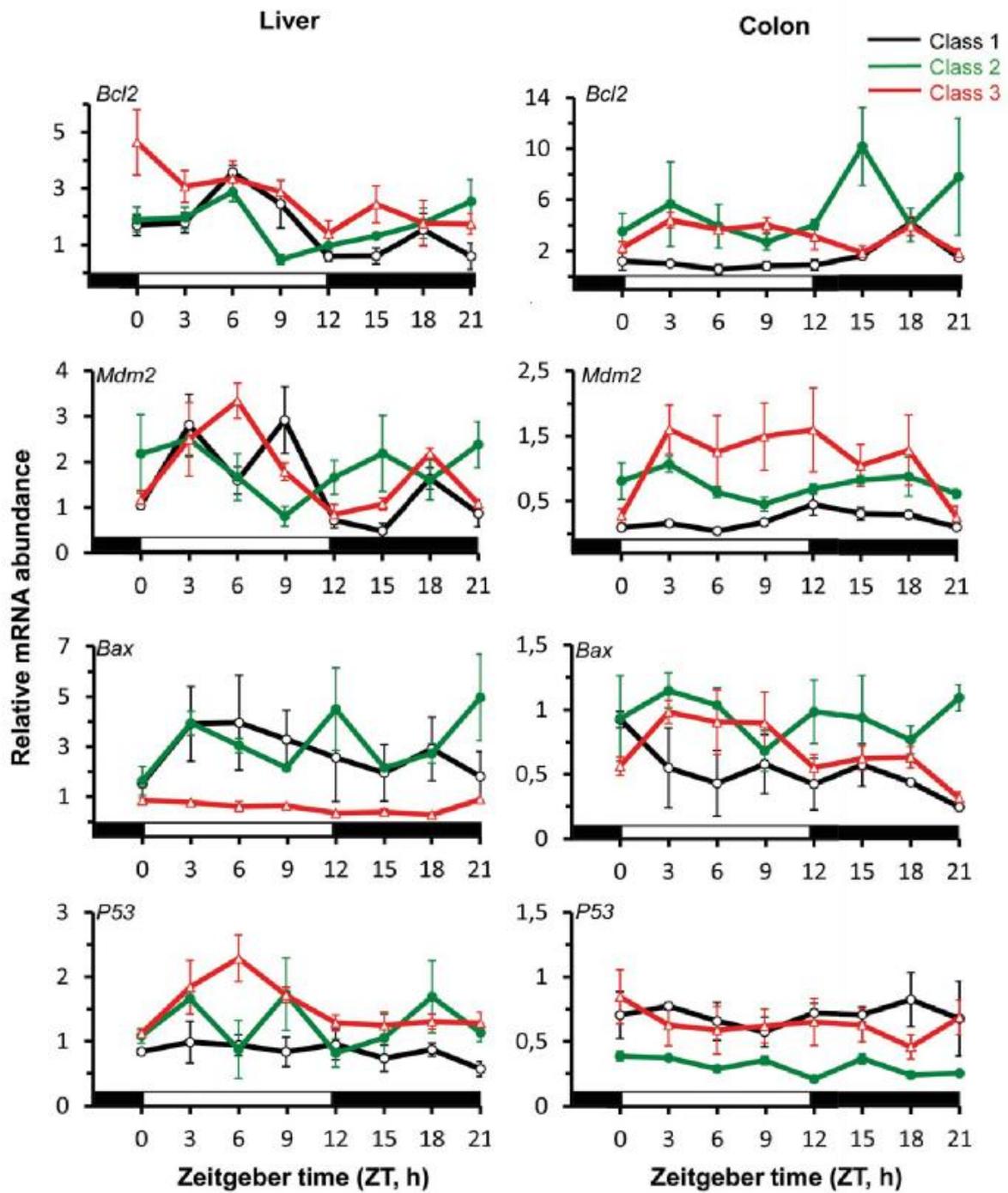
Suppl. Fig. S1



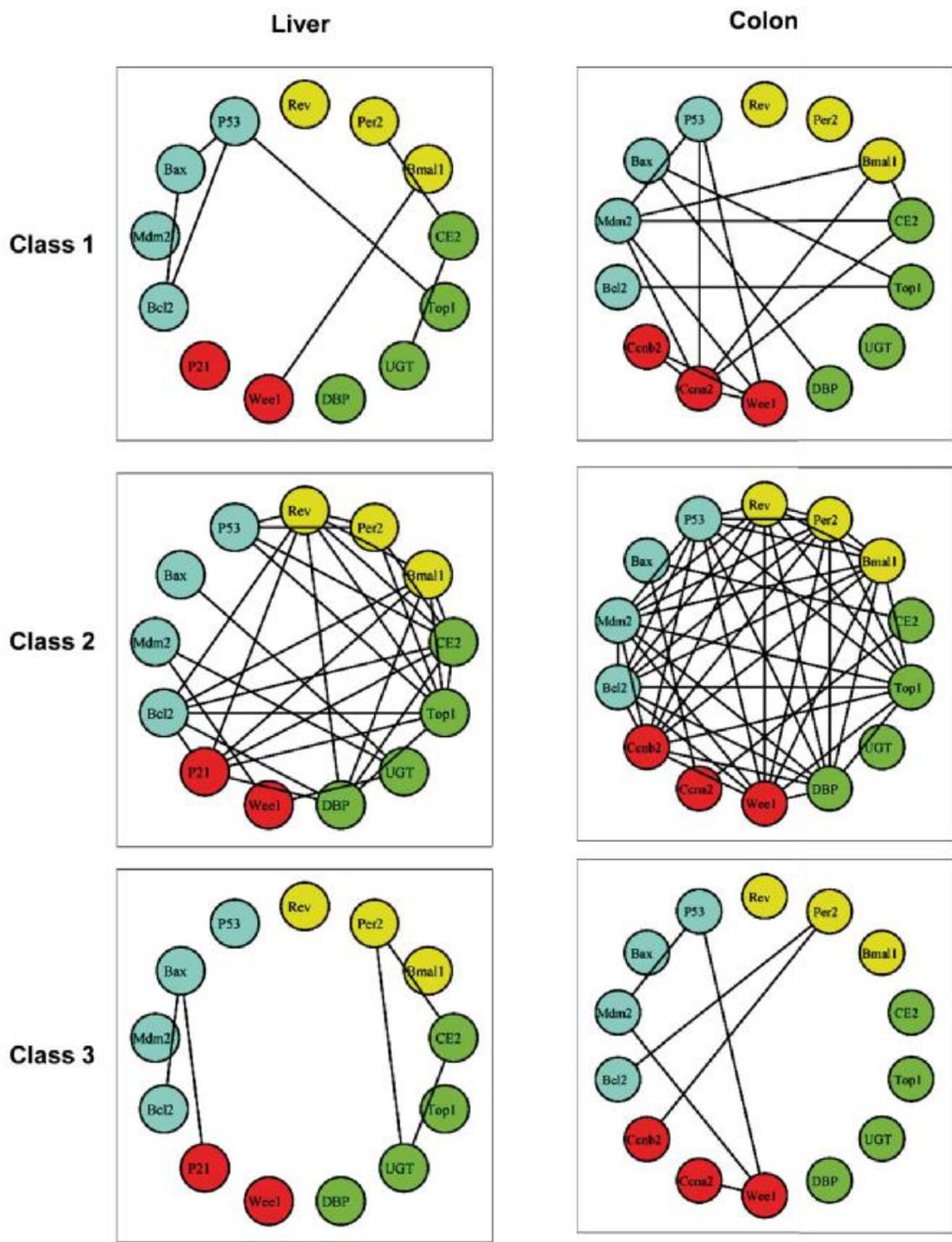
Suppl. Fig. S2



Suppl. Fig. S3



Suppl. Fig. S3



Suppl. Fig. S4

Supplementary Table S1: Irinotecan-induced changes in body weight according to sex and strain. Results from cosinor analysis with 24 + 12 h periodic components.

Class	Sex	Strain	Period (h)	p ^a	Mesor, % [95% CL]	Amplitude, % [95% CL]	Acrophase, ZT:min [95% CL]
1	♀	B6D2F1	24	< 0.001	-7.3 [-6.5 to -8.1]	4.7 [3.6 to 5.8]	13:25 [12:30 to 14:20]
			12	0.4		(0.7)	(5:05 and 17:05)
		C57BL/6	24	< 0.001	-9.0 [7.9 to 10.2]	6.1 [4.5 to 7.7]	12:50 [11:50 to 13:55]
			12	0.1		(1.7)	4:10 and 16:10)
2	♂	B6D2F1	24	0.000002	-9.4 [-8.7 to -10.1]	2.6 [1.6 to 3.6]	12:10 [10:40 to 13:35]
			12	0.9		(0.3)	1:25 and 13:25)
		C57BL/6	24	0.00002	-10.0 [-9.2 to -10.9]	3.0 [1.8 to 4.2]	10:55 [9:15 to 12:30]
			12	0.2		(1.0)	(6:20 and 18:20)
3	♀	B6CBAF1	24	0.01	-7.0 [-5.8 to -8.1]	2.1 [0.6 to 3.6]	15:15 [12:15 to 18:20]
			12	0.005		2.2 [0.9 to 3.5]	2:20 [1:05 to 3:40] 14:20 [13:05 to 15:40]
	♂		24	< 0.001	-7.2 [-6.1 to -8.3]	3.8 [2.2 to 5.4]	13:00 [11:40 to 14:20]
			12	0.08		1.6 [0.2 to 3.0]	2:30 [0:35 to 4:30] 14:30 [12:35 to 16:30]
Other	♀	<i>Per2^{mut}</i>	24	0.008	-11.4 [-9.6 to -13.3]	4.4 [1.7 to 7.0]	7:30 [5:00 to 10:00]
			12	0.8		(0.9)	(8:20 and 20:20)
	♂		24	0.0002	-9.1 [-7.9 to -10.4]	4.4 [2.7 to 6.1]	9:00 [7:20 to 10:35]
			12	0.09		(1.9)	(3:05 and 15:05)

^a: From F test of rejection of the null amplitude hypothesis. Inferred parameters in parenthesis, if p > 0.08

Supplementary Table S2: Plasma pharmacokinetic parameters (Mean \pm SEM) of irinotecan according to timing and chronotoxicity classes.

Class	Sex and Strain	Irinotecan timing (ZT)	Tolerability time	Cmax ($\mu\text{g/ml}$)	AUC _{0-12h} ($\mu\text{g}\cdot\text{min/ml}$)	t1/2 (min)	Clearance (ml/min)	Vd (ml)
1	♀ B6D2F1	3	Worst	16.7 \pm 3.5	2692 \pm 385	114.2 \pm 15.0	18.6 \pm 3	3070.0 \pm 595.6
		15	Best	16.7 \pm 7.6	1716 \pm 292	130.1 \pm 35.2	28.8 \pm 4.2	5447.4 \pm 1703.5
	p* value for comparison ZT3 vs ZT15			N.S. [†]	< 0.001	N.S.	0.008	N.S.
2	♂ B6D2F1	23	Worst	17.9 \pm 8.3	1797 \pm 611	219.6 \pm 113.7	27.4 \pm 10.1	7506.5 \pm 2225
		11	Best	27.4 \pm 12.5	1608 \pm 309	181.8 \pm 54.5	30.4 \pm 4.8	8227.0 \pm 3543
	p* value for comparison ZT23 vs ZT11			N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
3	♀ B6CBAF1	7	Worst	17.7 \pm 8.3	1287 \pm 162	218.1 \pm 61.0	37.8 \pm 4.5	12131.2 \pm 4428
		15	Best	19.0 \pm 5.8	1789 \pm 262	156.7 \pm 57.3	27.7 \pm 3.3	6350.0 \pm 2745
	p* value for comparison ZT7 vs ZT15			N.S.	0.04	N.S.	0.008	0.004

* p from Tukey Test (Pairwise multiple comparison)

[†] : not statistically significant when $p > 0.05$

Supplementary Table S3: Plasma pharmacokinetic parameters (Mean \pm SEM) of irinotecan bioactive metabolite SN-38 according to timing and chronotoxicity classes.

Class	Sex and Strain	Irinotecan timing (ZT)	Tolerability time	Cmax ($\mu\text{g/ml}$)	AUC _{0-12h} ($\mu\text{g}\cdot\text{min/ml}$)	Clearance (ml/min)	Vd (ml)	Metabolic ratio (%)
1	♀ B6D2F1	3	Worst	3.77 \pm 0.72	656 \pm 87	30.91 \pm 12.93	43628 \pm 5038	24.7 \pm 4.4
		15	Best	3.66 \pm 0.70	498 \pm 153	81.17 \pm 67.85	43847 \pm 6963	29.0 \pm 7.8
	p* value for comparison ZT3 vs ZT15			N.S.	0.031	N.S.	N.S.	N.S.
2	♂ B6D2F1	23	Worst	1.42 \pm 0.46	337 \pm 158	81.21 \pm 50.74	73924 \pm 4976	21.9 \pm 10.3
		11	Best	2.58 \pm 0.96	329 \pm 85	88.36 \pm 61.96	99068 \pm 60835	20.5 \pm 4.1
	p* value for comparison ZT23 vs ZT11			N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
3	♀ B6CBAF1	7	Worst	4.59 \pm 0.82	540 \pm 84	77.58 \pm 12.37	31743 \pm 4998	41.9 \pm 3.2
		15	Best	4.23 \pm 0.41	630 \pm 64	54.23 \pm 18.44	34138 \pm 7326	35.5 \pm 4.1
	p* value for comparison ZT7 vs ZT15			N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

* p from Tukey Test (Pairwise multiple comparison)

† : not statistically significant when $p > 0.05$

DISCUSSION GENERALE

VI. DISCUSSION GENERALE

Le cancer du foie est le 6^{ème} cancer le plus fréquent, et la 3^{ème} cause de mortalité par cancer chez l'Homme (Mancuso, 2013). Le carcinome hépatocellulaire, développé à partir des hépatocytes, est le plus fréquent des cancers primitifs du foie. Alors que le cholangiocarcinome qui a pour origine les cellules épithéliales des voies biliaires, est une tumeur plus rare.

Le foie, où peuvent se développer ces cancers, est un des organes les mieux rythmés de l'organisme. En effet, plus de 15% du transcriptome hépatique est sous le contrôle du système circadien (Oishi *et al.*, 2003; Schmutz *et al.*, 2012). De même, environ de 20% du protéome hépatique est rythmique (Reddy *et al.*, 2006). Une étude récente montre que ~ 60% du métabolome hépatique dépend du système circadien (Eckel-Mahan *et al.*, 2012). Ces rythmes hépatiques sont générés par les multiples voies redondantes du système circadien.

En effet, le système circadien est composé d'un pacemaker central, les noyaux suprachiasmatiques qui coordonnent les rythmes circadiens dans les différents organes, tissus et cellules, où se situent les horloges périphériques. Cette coordination est assurée par l'intermédiaire d'une physiologie circadienne, dont les rythmes constituent aussi des biomarqueurs circadiens, qui renseignent sur le fonctionnement du système. Au moins quinze gènes spécifiques constituent l'horloge moléculaire génétique, qui génère les rythmes circadiens moléculaires dans les NSC et les cellules des tissus périphériques. Chez l'Homme, on commence à identifier plusieurs pathologies liées à des dysfonctionnements du système circadien. En effet, de nombreuses études épidémiologiques et cliniques ont montré que la perturbation du système circadien pouvait augmenter le risque de cancer. A l'échelle expérimentale, les perturbations de l'horloge circadienne par la destruction des noyaux suprachiasmatiques, l'altération de cycles lumière/obscurité, ou les mutations des gènes de l'horloge peuvent accélérer la cancérogénèse chimio- ou radio-induite, et la progression tumorale, ainsi que l'a notamment montré notre laboratoire (van den Heiligenberg *et al.*, 1999; Filipski *et al.*, 2002; Fu *et al.*, 2002; Filipski *et al.*, 2005; Filipski *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010).

Dans ce projet de thèse, j'ai testé l'hypothèse que la disruption circadienne moléculaire accélérerait la cancérisation hépatique. Pour cela, j'ai choisi de travailler sur le modèle murin de cancer de foie induit par la DEN. Chez la souris, la DEN entraîne le développement de tumeurs présentant une histologie, et des changements d'expressions protéiques et géniques

semblables à ceux rencontrés dans le cancer du foie chez l'Homme (Lee *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005).

Dans le cadre de cette thèse, j'ai utilisé des souris mâles excepté dans l'étude de la chronotoxicité de DEN, réalisée chez les souris femelles, en raison de leur disponibilité. Les données épidémiologiques indiquent que les hommes sont plus susceptibles de développer un cancer du foie que les femmes (Mancuso, 2013). Il a été démontré que la DEN induit la formation de cancer du foie chez 100% des souris mâles, et seulement chez 10 à 30% des souris femelles, confirmant la liaison de la cancérogenèse hépatique au sexe (Nakatani *et al.*, 2001; Maeda *et al.*, 2005; Naugler *et al.*, 2007). Le développement du cancer du foie est souvent associé à une inflammation chronique. Ainsi, une augmentation importante des concentrations protéiques d'IL-6 a été observée chez les souris mâles par rapport aux souris femelles suite à l'administration de DEN. Chez les souris femelles, le taux élevé d'œstrogènes inhibe les concentrations d'IL-6, et diminue la formation de cancers du foie. Cependant, l'ovariectomie augmente le taux d'IL-6, et accélère la cancérogenèse hépatique induite par la DEN chez les souris femelles (Naugler *et al.*, 2007).

A partir des études menées ici chez des souris mâles porteuses d'une mutation du gène *Per2*, nous avons montré que cette mutation accélérerait la cancérisation hépatique induite par la DEN. De plus, la majorité des lésions correspondait à un carcinome hépatocellulaire. Chez l'Homme, une répression de l'expression des ARNm des gènes *Per1*, *Per2*, *Per3*, et *Cry2* a été rapportée dans le carcinome hépatocellulaire (Lin *et al.*, 2008). Il a aussi été déjà démontré que la disruption circadienne résultant de l'exposition de rats à la lumière constante ou de souris à un décalage horaire chronique, deux conditions qui provoquent une disruption circadienne, favorisait la cancérogenèse hépatique induite par la diéthylnitrosamine, en jouant un rôle de promoteur de l'hépatocarcinogénèse. Dans les deux cas, la majorité des lésions étaient des CHC (van den Heiligenberg *et al.*, 1999; Filipinski *et al.*, 2009). Plusieurs études *in vivo* et *in vitro* ont montré que le gène *Per2* jouait un rôle suppresseur de tumeur. Les souris mutantes pour *Per2* étaient plus susceptibles de développer des cancers spontanés ou induits par irradiation (Fu *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2010). Selon ces publications, les souris mâles porteuses de la mutation du gène *Per2* développaient des tératomes fréquents et 15 % des souris mouraient des suites de lymphomes spontanés, fréquence qui montait à 71 % après irradiation (contre 5 % chez les animaux sauvages) (Fu *et al.*, 2002).

Dans la présente étude, l'accélération de la cancérogénèse hépatique par la mutation de *Per2* était précédée par une altération sévère touchant les rythmes moléculaires de l'expression des ARNm des gènes de l'horloge hépatiques et de plusieurs rythmes physiologiques. Ainsi il existait une dérégulation de marqueurs moléculaires de l'instabilité génomique, de la prolifération, et de l'inflammation durant les trois premières semaines de l'administration de DEN, étape d'initiation de la cancérogénèse. Les analyses ont identifié une avance de phase et un amortissement des rythmes d'expression des gènes de l'horloge *Clock*, *Bmal1*, *Rev-erba* et *Cry1* chez les souris *Per2^{m/m}* par rapport aux souris sauvages. De même, la corticostéronémie moyenne était significativement réduite, et son rythme était supprimé chez les souris *Per2^{m/m}* en comparaison des souris sauvages.

Nous avons mis en évidence que la mutation homozygote de *Per2* entraînait une avance de phase de l'expression des ARNm de *c-Myc* et de *Wee1*, et la suppression du rythme circadien de *Ccnb1* et de *Kras* dans le foie. De plus, cette mutation a augmenté le niveau d'expression de *c-Myc* et de *Bcl2*, et diminué celle de *P53*. Après 17 jours de DEN, nous avons identifié l'arythmicité de l'expression d'*ATM*, *Wee1*, *Ccnb1*, et *c-Myc*, chez les souris *Per2^{m/m}*. Ainsi, les expressions hépatiques de *c-Myc* et de *Ccnb1* étaient plus élevées chez les souris ayant une mutation *Per2* par rapport aux souris sauvages. Les taux protéiques d'IL-6 et de TNF- α étaient augmentés dans le foie des souris *Per2^{m/m}*.

Ces résultats soulignent le rôle du contrôle circadien de la stabilité génomique, de la prolifération et de l'inflammation dans la cancérogénèse hépatique.

En 2000, Douglas Hanahan et Robert Weinberg ont réalisé une synthèse exhaustive de la littérature conduisant à conceptualiser les caractéristiques principales de la transformation cancéreuse, à savoir: l'échappement à l'apoptose, la division cellulaire non contrôlée, l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance, l'autosuffisance pour les facteurs de croissance, l'angiogénèse, l'invasion et la capacité à métastasier (Hanahan *et al.*, 2000). En 2011, quatre nouvelles caractéristiques des cellules cancéreuses ont été ajoutées à cette liste par les mêmes auteurs: la dérégulation métabolique, l'instabilité génomique, l'échappement au système immunitaire, et l'inflammation tumorale (Hanahan *et al.*, 2011). La figure 39 récapitule ces caractéristiques du cancer, et les met en relation avec les gènes et protéines pour lesquelles une dérégulation circadienne a été mise en évidence dans notre étude de la cancérogénèse hépatique.

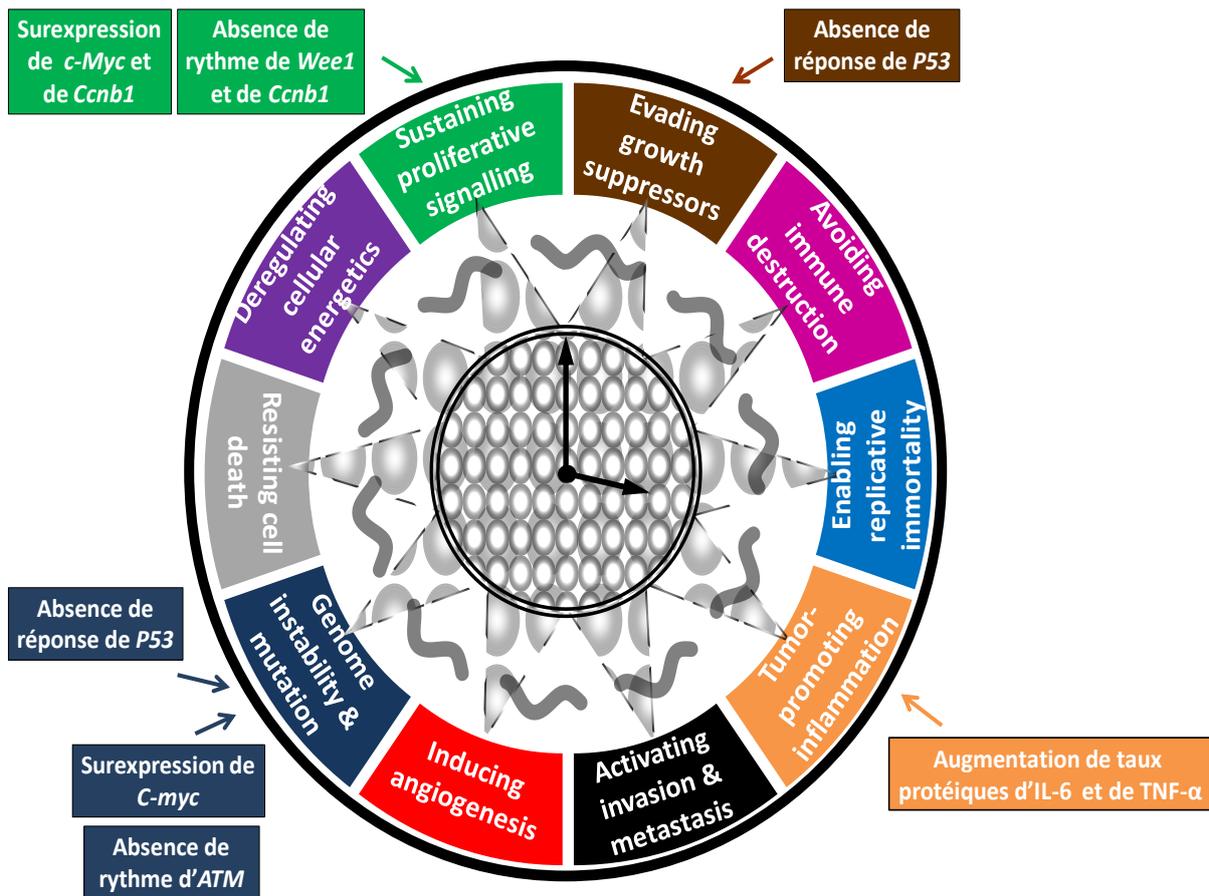


Figure 39 : Caractéristiques principales du cancer selon Hanahan et Weinberg (2011), et relations avec les principaux gènes et protéines dérégulés dans le modèle de la cancérogénèse hépatique Adapté d'après (Hanahan *et al.*, 2011).

Les résultats obtenus sont en cohérence avec les études *in vivo* et *in vitro*. Une dérégulation de *c-Myc* associée à une dérégulation de gènes du cycle cellulaire et de l'apoptose (*P53*, *Mdm2*, *Cyclin D1*, *Gadd45a*) a été trouvée dans le foie de souris mutantes du gène *Per2*. En effet, le gène de l'horloge *Bmal1* agit directement sur la boîte E du promoteur *c-Myc*, en réprimant son expression (Fu *et al.*, 2002). Chez les souris *Per2^{m/m}*, le rythme d'expression de *Bmal1* est dérégulé et son expression est réduite, ce qui peut expliquer l'augmentation de l'expression du proto-oncogène *c-Myc*. Des études précédentes réalisées chez des souris mâles B6D2F1 dans notre laboratoire ont montré que l'exposition de ces souris à un décalage horaire chronique dérégule les profils d'expression de gènes de l'horloge circadienne, et augmente le niveau moyen sur 24 heures de *c-Myc* et réduit celui de *P53* dans le foie (Filipski *et al.*, 2005). De plus, les études *in vitro* confirment le rôle de *Per2* dans l'inhibition de la prolifération cellulaire et l'induction de l'apoptose. La surexpression de *Per2* dans les cellules de la lignée leucémique humaine K562 entraîne un arrêt du cycle cellulaire et induit l'apoptose (Gery *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2010). En effet, la surexpression de *Per2* dans ces

cellules induit une augmentation de taux d'expression génique et protéique de *P53*, et une diminution de celle de *c-Myc* et de *Ccnb1* (Sun *et al.*, 2010). Ainsi, la surexpression de *Per2* dans des lignées tumorales murines mammaire (EMT6), pulmonaire (LLC), et sarcomateuses (S-180) inhibe la prolifération cellulaire, et induit l'apoptose (Hua *et al.*, 2006; Miyazaki *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2010). Dans les cellules tumorales de carcinome de Lewis (LLC), les taux d'ARNm et de protéines de *P53* et de *Bax* sont augmentés, tandis que ceux de *c-Myc*, et de *Bcl2* sont réduits (Hua *et al.*, 2006).

Le CHC humain survient fréquemment dans un contexte d'inflammation du tissu hépatique. Chez les souris, la diéthylnitrosamine induit le CHC en association à une inflammation chronique. En effet, l'activation de la voie de signalisation NF- κ B dans les cellules de Kupffer (macrophages de foie) par les corps apoptotiques et nécrotiques, augmente les concentrations de différentes cytokines pro-inflammatoires, et plus spécifiquement celles d'IL-6 et de TNF- α . Il a été montré que les souris mutantes pour l'*IL-6* présentent une diminution de fréquence du cancer hépatique induit par la diéthylnitrosamine (Naugler *et al.*, 2007). De plus, les souris *Per2^{m/m}* développent une cholestase suite à une ligature des canaux biliaires, et présentent un taux élevé de TNF- α (Chen *et al.*, 2013). Dans notre étude, nous avons mis en évidence que les concentrations hépatiques d'IL-6 et de TNF- α étaient significativement plus élevées chez les souris *Per2^{m/m}* exposées à la DEN en comparaison à des souris sauvages.

La DEN est un cancérigène hépatique métabolisé dans le foie par les cytochromes P450, principalement par CYP2E1 et CYP2A5. Son activation par ces deux enzymes aboutit à la formation des adduits à l'ADN qui sont mutagéniques (Verna *et al.*, 1996). Ces deux enzymes sont contrôlés par le système circadien. En effet, l'expression d'ARNm de *Cyp2E1* est rythmée avec un pic à la transition lumière/obscurité. De plus sa protéine suit un rythme circadien avec un maximum d'activité pendant la phase nocturne. La transcription du *Cyp2e1* est inhibée par les gènes *Per2* et *Cry1* (Matsunaga *et al.*, 2008). De même, l'expression de *Cyp2a5* est rythmée dans le foie de la souris, et son pic est situé dans la phase nocturne (Viitala *et al.*, 2001). En conséquence, chez les souris porteuses de la mutation *Per2*, l'augmentation de l'activation de DEN par *Cyp2e1* et par *CYP2a5* pourrait favoriser la cancérogénèse hépatique. Les résultats obtenus ont mis en évidence que le gène de l'horloge *Per2* fonctionne comme un suppresseur de tumeurs hépatiques.

Cependant, une publication récente a montré que les souris *Per2^{-/-}* mâles et femelles étaient moins susceptibles de développer des cancers spontanés ou radio-induits (Antoch *et al.*,

2013). Dans cette nouvelle étude, une expérience similaire à celle de Lee et collègues a été réalisée chez des souris de même fonds génétique. Cependant, dans l'étude de Lee, les souris ont été irradiées à ZT 10 (maximum d'activité mitotique dans la moelle osseuse), alors que dans l'étude d'Antoch, l'heure de l'irradiation n'a pas été précisée. La différence de la réponse des souris selon l'heure de l'irradiation pourrait rendre compte des différences rapportées entre ces études (Lee *et al.*, 2010; Antoch *et al.*, 2013). Le fonds génétique des souris présentant la mutation *Per2*, et le type moléculaire de cette mutation, pourraient aussi jouer un rôle important, tant dans le fonctionnement de l'horloge moléculaire, que dans ses conséquences pour les voies de signalisation dont la dérégulation peut conduire au cancer.

Afin de préciser le rôle plus général de l'horloge moléculaire dans la cancérogenèse hépatique, j'ai complété l'étude du rôle de la mutation de *Per2* par celle de la double délétion *Cry1/Cry2* dans la cancérogenèse hépatique induite par la DEN. Les gènes *Cry1* et *Cry2* sont deux gènes de la boucle de rétrocontrôle négatif de l'horloge circadienne. En DD, les souris porteuses de la double délétion *Cry1/Cry2* ne montrent pas de rythme circadien de l'activité-repos, de la température corporelle, et de la corticostérone plasmatique (van der Horst *et al.*, 1999; Lamia *et al.*, 2011). Cependant, l'activité-repos et la température corporelle sont rythmés chez ces souris, lorsqu'elles sont placées en LD12 : 12, résultat de l'effet de masque de la lumière. Nous avons mis en évidence un amortissement associé à une avance de phase des rythmes circadiens de la température corporelle et de l'activité-repos chez les souris *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* par rapport aux souris sauvages. Ainsi, l'administration de la DEN a perturbé ces rythmes chez les souris des deux génotypes, mais de façon plus importante chez les souris *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}*.

La perte de poids due à la toxicité de la DEN était plus sévère chez les souris sauvages que chez les *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}*. Ces résultats sont cohérents avec les données expérimentales qui montrent que la tolérance d'un médicament anticancéreux, le cyclophosphamide, est plus élevée chez les souris *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* par rapport aux souris contrôles. Cependant les activités des enzymes hépatiques circulantes ALAT et ASAT étaient supérieures chez les souris *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}*. Les taux sériques des transaminases reflètent habituellement la toxicité hépatique. Dans notre étude, tous les prélèvements ont été réalisés après la fin des injections de DEN, et le dernier dosage des transaminases a été fait juste avant le sacrifice des souris. Dans notre étude, les taux élevés des transaminases pourraient refléter le processus de cancérogenèse hépatique induite par DEN, plutôt que sa toxicité, compte tenu d'un moindre amaigrissement des souris *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* en comparaison des souris sauvages.

Plusieurs types de perturbation des cycles lumière/obscurité sont capables d'accélérer la cancérogénèse hépatique chez la Souris et le Rat, et conduire à la formation d'une majorité de carcinomes hépatocellulaires et de quelques rares cholangiocarcinomes (van den Heiligenberg *et al.*, 1999; Filipinski *et al.*, 2009). Selon une étude clinique, les gènes et/ou les protéines *Cry1* et/ou *Cry2* seraient dérégulés dans plusieurs cancers humains y compris le carcinome hépatocellulaire (Lin *et al.*, 2008), ce qui nous a conduit à étudier plus particulièrement leurs rôles dans la cancérogénèse hépatique.

Nous avons ainsi montré que la déficience en *Cry1* et *Cry2* quintuplait le taux de cancers hépatiques chimio-induits. La majorité des lésions identifiées chez les souris *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* étaient des cholangiocarcinomes.

Au niveau expérimental, il persiste plusieurs incertitudes et contradictions concernant le rôle de *Cry1* et *Cry2* dans la cancérogénèse. En effet, Lee et collègues ont trouvé que les souris *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* étaient plus susceptibles à développer des cancers spontanés et induits par le rayonnement γ . Des lymphomes ont été observés chez 13% des souris *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* (versus 5,5 % chez les souris sauvages). Ces pourcentages sont doublés pour les deux génotypes après irradiation. Des tumeurs hépatiques spontanées ont été observées chez ~ 6% de souris *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}*, mais seulement 1% des souris sauvages de même fonds génétique. L'exposition au rayonnement γ a augmenté la fréquence de cancers de foie à ~ 2% pour les souris sauvages et ~ 13% pour les souris mutantes (Lee *et al.*, 2010). Une autre étude a montré que la double délétion *Cry1/Cry2* accélérât la prolifération des fibroblastes embryonnaires murins. Ainsi les fibroblastes *Cry1^{+/-}Cry2^{-/-}* et *Cry1^{-/-}Cry2^{+/-}* proliféraient plus rapidement que les fibroblastes sauvages (Destici *et al.*, 2011).

Cependant, dans une autre étude, la double délétion *Cry1/Cry2* n'avait aucun effet sur la cancérogénèse radio-induite chez la souris. L'expression protéique de *c-Myc* était semblable dans le foie de souris sauvages et *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}*. De plus, la protéine *c-Myc* était exprimée à des niveaux comparables dans les fibroblastes sauvages ou *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}*. La double délétion *Cry1/Cry2* entraînait une perte de rythmicité de la kinase antimitotique *Wee1* et une augmentation de son taux protéique dans le foie de souris et dans les fibroblastes murins (Matsuo *et al.*, 2003; Gauger *et al.*, 2005). Les fibroblastes murins *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* proliféraient à des niveaux comparables aux fibroblastes sauvages. Ainsi, la double délétion *Cry1/Cry2* ne semblait pas affecter la survie des fibroblastes après l'exposition aux rayonnements γ ou UV (Gauger *et al.*, 2005).

Notre étude est la première qui montre que la disruption circadienne moléculaire accélère la cancérogénèse des voies biliaires. L'inflammation chronique des canaux biliaires constitue le principal facteur de risque de cholangiocarcinome (Zabron *et al.*, 2013). De plus, les cancers hépatiques induits par DEN sont associés à un état inflammatoire chronique. La DEN induit le développement de cholangiocarcinome chez des souris soumises à une ligature des canaux biliaires (Yang *et al.*, 2011; Ko *et al.*, 2013). La cytokine pro-inflammatoire IL-6 est activée dans les cellules de cholangiocarcinome en culture. La surexpression d'IL-6 active les voies de signalisations NF- κ B et JAK STAT. L'IL-6 inhibe l'apoptose des cellules cancéreuses des voies biliaires par induction de STAT3 (Kobayashi *et al.*, 2005; Isomoto *et al.*, 2007). De plus, l'IL-6 dérégule le cycle cellulaire en activant P38 MAPK (Tadlock *et al.*, 2001). La double délétion *Cry1/Cry2* augmente l'expression d'IL-6 dans les macrophages et les fibroblastes murins (Narasimamurthy *et al.*, 2012). Ainsi, l'induction de cancers des voies biliaires dans les souris mutantes de *Cry1* et *Cry2* pourrait résulter d'une inflammation chronique des voies biliaires.

Le tableau 5 présente les principales conditions expérimentales et résultats trouvés chez les souris *Per2^{m/m}* et *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}*

Tableau 5 : Principales conditions expérimentales et résultats trouvés chez les souris *Per2^{m/m}* et *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}*

Expérience	Sexe fond génétique	Dose de DEN (mg/k/j) Dose cumulé (mg/kg)	Principaux résultats
<i>Per2^{m/m}</i> vs sauvages	♂ 129SvEv ^{Brd} / C57BL/6-Tyrc-Brd	15 puis 12	Perte de poids : plus sévère chez les <i>Per2^{m/m}</i>
		402	Transaminases : plus élevés chez les <i>Per2^{m/m}</i>
			Mortalité : plus importante chez les <i>Per2^{m/m}</i>
			Cancérisation hépatique : plus importante chez les <i>Per2^{m/m}</i>
			Type principale de cancers : carcinome hépatocellulaire
<i>Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}</i> vs sauvages	♂ C57BL/6	12 puis 10	Perte de poids : plus sévère chez les sauvages
		406	Transaminases : plus élevés chez les <i>Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}</i>
			Mortalité : plus importante chez les <i>Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}</i>
			Cancérisation hépatique : plus importante chez les <i>Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}</i>
			Type principale de cancers : Cholangiocarcinome

Nous avons ensuite étudié l'effet d'une intervention ciblant l'horloge circadienne dans un but de prévention de la cancérogénèse hépatique chez des souris *Per2^{m/m}* et des souris sauvages.

Deux types d'intervention ont été testés : l'alimentation programmée et l'administration quotidienne de dexaméthasone.

Nous avons constaté que l'alimentation programmée induisait un amortissement des rythmes des gènes de l'horloge dans les deux génotypes soumis à la DEN, contrairement à l'effet rapporté dans la littérature et dans notre laboratoire chez des animaux non exposés à ce xénobiotique. D'une part, la synchronisation alimentaire entraînait une diminution de l'expression des oncogènes *c-Myc*, et *Kras*, mais d'autre part, elle diminuait aussi l'expression d'*ATM* et de *P53* chez les souris sauvages et *Per2^{m/m}*. Le rythme de *Wee1* était amplifié et son niveau moyen augmenté dans les 2 génotypes, alors que l'expression hépatique de *Ccnb1* était réduite seulement chez les souris *Per2^{m/m}*. De plus, l'alimentation programmée a supprimé les rythmes circadiens et diminué les taux protéiques moyens d'IL-6 et de TNF- α chez les souris sauvages et *Per2^{m/m}* soumis à la DEN. L'alimentation programmée a ainsi produit des effets contradictoires, favorisant l'instabilité génomique, mais diminuant la prolifération cellulaire, et l'inflammation. Cependant, la programmation de l'accès à l'alimentation a amplifié les rythmes circadiens de la température corporelle et de l'activité-repos et prévenu l'amortissement de ces deux rythmes pendant la phase d'initiation cancéreuse liée à l'exposition à la DEN.

Des études précédentes réalisées chez des souris mâles B6D2F1 dans notre laboratoire ont montré que l'alimentation programmée pendant la phase lumineuse ou nocturne des souris ralentissait la croissance tumorale de l'ostéosarcome de Glasgow implanté chez ces animaux. Cet effet était supérieur lorsque l'accès à la nourriture était restreint à la phase de lumière, plutôt que localisé pendant la phase d'obscurité. L'inhibition tumorale la plus prononcée était obtenue quand l'accès à la nourriture était limité à 4 heures (ZT2-ZT6) pendant la phase de la lumière. La synchronisation alimentaire pendant la phase de la lumière modifiait de façon importante la phase des rythmes d'activité et de température : le rythme d'activité devenait bimodal, avec un pic d'anticipation de la présentation de nourriture pendant la phase de lumière et un second pic pendant la phase d'obscurité ; le maximum du rythme thermique était avancé à la phase de lumière, contrairement aux souris en alimentation programmée pendant la phase nocturne, où ces deux rythmes conservaient leurs maxima pendant la phase d'obscurité (Wu *et al.*, 2004).

Une autre étude réalisée dans notre laboratoire a montré que l'alimentation programmée restreinte pendant la phase nocturne prévenait les altérations induites par un décalage horaire chronique de gènes de l'horloge *Per2* et *Rev-erba* dans le foie et la tumeur greffée, et de

Bmal1 dans la tumeur. Ainsi, cette synchronisation alimentaire ralentissait la progression tumorale, renforçait le rythme de *c-Myc* dans le foie, et altérait celui-ci dans la tumeur implantée (Filipski *et al.*, 2005). L'étude circadienne du transcriptome tumoral a révélé que les gènes tumoraux directement entraînés par l'alimentation programmée concernaient le cycle cellulaire, le métabolisme énergétique et l'immunité (Li *et al.*, 2010).

La dexaméthasone est un analogue de la corticostérone, qui possède un effet anti-inflammatoire et immunosuppresseur, et inhibe les cytokines pro-inflammatoires (Barnes, 1998). La dexaméthasone est souvent administrée en combinaison avec d'autres agents anticancéreux, dans un but d'amélioration de la tolérance aux chimiothérapies.

Dans mon étude, la dexaméthasone a été administrée quotidiennement à ZT14 pendant une semaine avant le début des injections de DEN et durant l'exposition à la DEN. L'administration de dexaméthasone a altéré les rythmes des ARNm de *Bmal1*, *Cry1*, et *Cry2* chez les souris sauvages, et a supprimé les rythmes circadiens des gènes de l'horloge chez les *Per2^{m/m}*. La dexaméthasone a aussi aboli les rythmes d'expression des gènes *P53*, *ATM*, *Wee1*, *Ccnb1*, et *Kras* chez les souris sauvages exposées à la DEN. Une diminution de l'expression des oncogènes *c-Myc* et *Kras* a été trouvée dans le foie des souris des deux génotypes en réponse à la dexaméthasone. De plus, ce traitement fait disparaître les rythmes d'IL-6 et de TNF- α hépatiques chez les souris sauvages et *Per2^{m/m}*, réduit les taux moyens d'IL-6 dans les 2 génotypes, et diminue ceux de TNF- α chez les souris *Per2^{m/m}*. La dexaméthasone amortit aussi les rythmes de la température corporelle et d'activité-repos. Ainsi, les injections chroniques de dexaméthasone à ZT14 provoquent des modifications génomiques compatibles avec un ralentissement de la prolifération cellulaire, secondaire à une inhibition du cycle cellulaire.

Les études *in vitro* montrent que la dexaméthasone n'aurait aucun effet sur la prolifération de cellules d'adénocarcinome pancréatique, mais inhiberait l'invasion cellulaire et l'activation de voie NF- κ B. L'administration de dexaméthasone semble réduire la croissance tumorale d'un adénocarcinome pancréatique implanté chez des souris immunodéprimées, ainsi que le nombre de métastases hépatiques (Egberts *et al.*, 2008). Chez les rats exposés à la DEN, l'administration chronique de corticostérone a inhibé la prolifération des cellules précancéreuses et augmenté la médiane de survie en comparaison d'animaux exposés à la DEN seule (Bouzahzah *et al.*, 1998).

Les résultats de nos études montrent que l'alimentation programmée et l'administration quotidienne de dexaméthasone ne renforcent pas les rythmes des gènes de l'horloge. De plus,

ces deux interventions provoquent des modifications d'expression génique en faveur d'un accroissement de l'instabilité génomique provoquée par la DEN. Cependant, elles provoquent d'autres modifications d'expression géniques, en faveur d'une diminution de la prolifération cellulaire et d'un blocage du cycle cellulaire, et de l'entrée en mitose. De plus, elles réduisent les taux protéiques des cytokines inflammatoires, qui jouent un rôle très important dans la cancérogénèse hépatique. L'inhibition de la prolifération cellulaire, et probablement la prévention de la cancérogénèse hépatique pourraient ainsi être indépendants de l'horloge circadienne moléculaire, tout en étant contrôlés par la physiologie circadienne. Cette altération majeure des rythmes de gènes de l'horloge pourrait résulter du fait que ces rythmes sont mesurés dans le foie, qui est l'organe cible de la DEN. On a remarqué que l'effet de dexaméthasone sur l'horloge moléculaire hépatique était plus marqué que celui de l'alimentation programmée, et chez les souris des deux génotypes. Cela pourrait refléter une toxicité hépatique de la dexaméthasone.

Afin d'évaluer le rôle de l'horloge circadienne dans la toxicité de la DEN, nous avons réalisé une étude chez des souris femelles sauvages et *Per2^{m/m}*. La DEN s'est révélée plus toxique chez les souris femelles sauvages que chez les souris femelles *Per2^{m/m}* à toutes les heures d'administration testées, à l'exception de ZT11, où la toxicité de la DEN s'est révélé comparable dans les souris des deux génotypes. Cette toxicité a été évaluée par plusieurs critères : perte de poids, taux de transaminases, mortalité, et lésions hépatiques induites par DEN. En comparant les résultats obtenus dans cette expérience avec l'étude de la cancérogénèse hépatique chez les souris mâles *Per2^{m/m}*, une première conclusion est que, malgré une toxicité similaire de DEN à ZT11 pour les deux génotypes, les souris *Per2^{m/m}* sont plus susceptibles à développer des cancers hépatiques. Cependant notre étude n'élimine pas une modification de la chronotoxicité de la DEN selon le sexe, ainsi que le montrent les études réalisées avec l'irinotécan.

PERSPECTIVES

VII. PERSPECTIVES

Dans mon projet de thèse, j'ai étudié la cancérogénèse hépatique induite par la diéthylnitrosamine chez des souris mutantes du gène *Per2* ou des gènes *Cry1/Cry2*. Ces deux types de mutation, qui concernent la boucle de rétrocontrôle négatif de l'horloge moléculaire accélèrent de façon considérable la cancérogénèse hépatique chimio-induite. Dans ces deux études, la DEN a été administrée à ZT11. Ce stade circadien correspond au pic circadien de la corticostérone plasmatique chez la souris, laquelle est impliquée dans la bioactivation de la DEN. Ainsi, la toxicité de la DEN, évaluée par la perte de poids, le taux des transaminases, et la mortalité, était similaire chez des souris femelles sauvages et *Per2^{m/m}* à ZT11. L'étude de la cancérogénicité hépatique de la DEN à d'autres horaires que ZT11, et chez des souris mâles et femelles sera nécessaire afin confirmer que la disruption circadienne résultante de la mutation *Per2* ou de la double délétion *Cry1/Cry2* accélère la cancérogénèse hépatique indépendamment de l'heure d'administration de DEN et que cet effet est indépendant du sexe des animaux.

La mutation *Per2* favorise la cancérisation hépatique, et induit principalement la formation de carcinomes hépatocellulaires, tandis que, la double délétion *Cry1/Cry2* accélère le développement de cancer du foie, et induit de façon prédominante la formation de cholangiocarcinomes. Ces données obtenues *in vivo* pourraient être confirmées dans des lignées cellulaires humaines de carcinome hépatocellulaire et de cholangiocarcinome. Nous proposons de mettre au silence ou de surexprimer le gène *Per2* dans des lignées tumorales de CHC, et les gènes *Cry1* et/ou *Cry2* dans des lignées cancéreuses humaines de cholangiocarcinome. Ensuite, on pourrait étudier les effets de ces modifications sur la prolifération cellulaire, l'apoptose, la migration cellulaire, et ainsi sur l'expression des différents gènes et protéines du cycle cellulaire, de l'instabilité génomique, et de l'apoptose. On pourra par la suite étudier le lien entre l'organisation moléculaire circadienne et la cancérisation des hépatocytes à l'échelle d'une population de cellules. Pour cela, une transformation des cellules par des vecteurs viraux permettrait de suivre l'expression des gènes de l'horloge circadienne et du cycle cellulaire par le biais de l'expression de la luciférase dans des hépatocytes murines sauvages ou mutées des gènes *Per2* ou *Cry1/Cry2* et dans des hépatocytes humains, obtenus au cours d'intervention chirurgicale.

L'expression de *Per2* et *Cry2* est diminuée dans le carcinome hépatocellulaire humain (Lin *et al.*, 2008). Une recherche des mutations et des polymorphismes du gène *Per2* dans des

biopsies de CHC humain et des *Cry1* et/ou *Cry2* dans des biopsies de CC humain sera une étape importante pour évaluer la pertinence clinique des gènes *Per2*, *Cry1*, et *Cry2* dans les cancers hépatiques.

L'alimentation programmée ou l'administration quotidienne de dexaméthasone inhibent la prolifération cellulaire, et diminuent les taux des cytokines inflammatoires pendant la phase d'initiation de la cancérogénèse hépatique. Une étude de la cancérogénèse hépatique induite par la DEN à long terme chez des souris sauvages et *Per2^{m/m}* soumises à une alimentation programmée ou à des injections quotidiennes de la dexaméthasone sera nécessaire. L'étude du rôle de la synchronisation alimentaire dans la prévention de la cancérogénèse hépatique à long terme est en cours dans notre laboratoire, où des souris mâles sauvages et *Per2^{m/m}* sont exposées à la DEN pour une dose cumulée de 402 mg/kg (la même dose que celle utilisée dans la deuxième partie de résultats). Un lot de ces souris est soumis à une alimentation programmée de ZT14 à ZT20, et un autre lot en alimentation *ad libitum*. Un suivi par imagerie ne fluorescence est prévu. Les souris seront euthanasiées à 6 mois pour quantifier les nodules tumoraux dans le foie de différents lots et génotypes des souris.

La DEN est un cancérogène largement utilisé pour induire le cancer du foie chez la Souris et le Rat. Chez les souris porteuses de la mutation *Per2*, on a trouvé que cette mutation accélérât l'hépatocarcinogénèse. Les principaux mécanismes moléculaires et hormonaux de la cancérisation hépatique ont ensuite été étudiés afin de préciser leur dérégulation pendant la phase d'initiation de la cancérogénèse, et le rôle du gène *Per2* dans cette dérégulation. Une étude similaire sera nécessaire chez des souris *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* afin de déterminer le rôle de *Cry1* et celui de *Cry2* au cours de la phase d'initiation de la cancérisation hépatique. Ainsi, on a observé que la majorité des lésions induites chez les souris *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* étaient des cholangiocarcinomes. Nous proposons d'étudier l'effet de la double délétion *Cry1/Cry2* sur les voies biliaires des souris non traitées par la DEN, et de vérifier si cette double délétion est responsable d'une dilatation des voies biliaires, et par conséquent, d'une augmentation de la sensibilité des canaux biliaires à l'exposition de DEN et à la cancérogénèse.

Enfin, on a étudié la chronotoxicité de la DEN chez des souris femelles sauvages et mutantes du gène *Per2*. Une étude similaire chez des souris mâles sera nécessaire afin d'aborder l'effet du temps d'administration de DEN sur la cancérogénèse hépatique chez ces souris, et ainsi d'étudier le rôle du sexe dans la chronotoxicité de DEN.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Akerstedt T, Nordin M, Alfredsson L, Westerholm P, Kecklund G (2010). Sleep and sleepiness: impact of entering or leaving shiftwork--a prospective study. *Chronobiology international* **27**(5): 987-996.

Akhtar RA, Reddy AB, Maywood ES, Clayton JD, King VM, Smith AG, *et al.* (2002). Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Current biology : CB* **12**(7): 540-550.

Akiyama T, Hasegawa T, Sejima T, Sahara H, Seto K, Saito H, *et al.* (1998). Serum and bile interleukin 6 after percutaneous transhepatic cholangio-drainage. *Hepato-gastroenterology* **45**(21): 665-671.

Albanis E, Friedman SL (2001). Hepatic fibrosis. Pathogenesis and principles of therapy. *Clinics in liver disease* **5**(2): 315-334, v-vi.

Albrecht U, Bordon A, Schmutz I, Ripperger J (2007). The multiple facets of Per2. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **72**: 95-104.

Albrecht U, Zheng B, Larkin D, Sun ZS, Lee CC (2001). MPer1 and mper2 are essential for normal resetting of the circadian clock. *Journal of biological rhythms* **16**(2): 100-104.

Antoch MP, Song EJ, Chang AM, Vitaterna MH, Zhao Y, Wilsbacher LD, *et al.* (1997). Functional identification of the mouse circadian Clock gene by transgenic BAC rescue. *Cell* **89**(4): 655-667.

Antoch MP, Toshkov I, Kuropatwinski KK, Jackson M (2013). Deficiency in PER proteins has no effect on the rate of spontaneous and radiation-induced carcinogenesis. *Cell cycle* **12**(23): 3673-3680.

Archer SN, Carpen JD, Gibson M, Lim GH, Johnston JD, Skene DJ, *et al.* (2010). Polymorphism in the PER3 promoter associates with diurnal preference and delayed sleep phase disorder. *Sleep* **33**(5): 695-701.

Arendt J (1998). Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Reviews of reproduction* **3**(1): 13-22.

Arendt J, Skene DJ, Middleton B, Lockley SW, Deacon S (1997). Efficacy of melatonin treatment in jet lag, shift work, and blindness. *Journal of biological rhythms* **12**(6): 604-617.

Asher G, Schibler U (2006). A CLOCK-less clock. *Trends in cell biology* **16**(11): 547-549.

Bae K, Jin X, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM, Weaver DR (2001). Differential functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN circadian clock. *Neuron* **30**(2): 525-536.

Barnes PJ (1998). Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clinical science* **94**(6): 557-572.

Bass J, Takahashi JS (2010). Circadian integration of metabolism and energetics. *Science* **330**(6009): 1349-1354.

Baturin DA, Alimova IN, Anisimov VN, Popovich IG, Zabezhinski MA, Provinciali M, *et al.* (2001). The effect of light regimen and melatonin on the development of spontaneous mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice is related to a downregulation of HER-2/neu gene expression. *Neuro endocrinology letters* **22**(6): 441-447.

Bhatti P, Mirick DK, Davis S (2012). Invited commentary: Shift work and cancer. *American journal of epidemiology* **176**(9): 760-763; discussion 764-765.

Bingham C, Arbogast B, Guillaume GC, Lee JK, Halberg F (1982). Inferential statistical methods for estimating and comparing cosinor parameters. *Chronobiologia* **9**(4): 397-439.

Blask DE, Brainard GC, Dauchy RT, Hanifin JP, Davidson LK, Krause JA, *et al.* (2005a). Melatonin-depleted blood from premenopausal women exposed to light at night stimulates growth of human breast cancer xenografts in nude rats. *Cancer research* **65**(23): 11174-11184.

Blask DE, Dauchy RT, Sauer LA (2005b). Putting cancer to sleep at night: the neuroendocrine/circadian melatonin signal. *Endocrine* **27**(2): 179-188.

Bosetti C, Levi F, Boffetta P, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C (2008). Trends in mortality from hepatocellular carcinoma in Europe, 1980-2004. *Hepatology* **48**(1): 137-145.

Bouvier AM, Remontet L, Jouglu E, Launoy G, Grosclaude P, Buemi A, *et al.* (2004). Incidence of gastrointestinal cancers in France. *Gastroenterologie clinique et biologique* **28**(10 Pt 1): 877-881.

Bouzahzah B, Pavier D, Barbason H (1998). The role of corticoids, adrenalectomy, phenobarbital and pentobarbital in the promotion of DEN-hepatocarcinogenesis. *In vivo* **12**(4): 411-419.

Brandi G, Calabrese C, Pantaleo MA, Morselli Labate A, Di Febo G, Hakim R, *et al.* (2004). Circadian variations of rectal cell proliferation in patients affected by advanced colorectal cancer. *Cancer letters* **208**(2): 193-196.

Buhr ED, Takahashi JS (2013). Molecular components of the Mammalian circadian clock. *Handbook of experimental pharmacology*(217): 3-27.

Buijs RM, Kalsbeek A (2001). Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nature reviews. Neuroscience* **2**(7): 521-526.

Buijs RM, Kalsbeek A, van der Woude TP, van Heerikhuize JJ, Shinn S (1993). Suprachiasmatic nucleus lesion increases corticosterone secretion. *The American journal of physiology* **264**(6 Pt 2): R1186-1192.

Bunger MK, Wilsbacher LD, Moran SM, Clendenin C, Radcliffe LA, Hogenesch JB, *et al.* (2000). Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell* **103**(7): 1009-1017.

Buttgereit F, Doering G, Schaeffler A, Witte S, Sierakowski S, Gromnica-Ihle E, *et al.* (2008). Efficacy of modified-release versus standard prednisone to reduce duration of morning stiffness of the joints in rheumatoid arthritis (CAPRA-1): a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* **371**(9608): 205-214.

Calvisi DF, Ladu S, Gorden A, Farina M, Lee JS, Conner EA, *et al.* (2007). Mechanistic and prognostic significance of aberrant methylation in the molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *The Journal of clinical investigation* **117**(9): 2713-2722.

Campbell SS, Dawson D, Anderson MW (1993). Alleviation of sleep maintenance insomnia with timed exposure to bright light. *Journal of the American Geriatrics Society* **41**(8): 829-836.

Cao Q, Gery S, Dashti A, Yin D, Zhou Y, Gu J, *et al.* (2009). A role for the clock gene *per1* in prostate cancer. *Cancer research* **69**(19): 7619-7625.

Cerea G, Vaghi M, Ardizzoia A, Villa S, Bucovec R, Mengo S, *et al.* (2003). Biomodulation of cancer chemotherapy for metastatic colorectal cancer: a randomized study of weekly low-dose irinotecan alone versus irinotecan plus the oncostatic pineal hormone melatonin in metastatic colorectal cancer patients progressing on 5-fluorouracil-containing combinations. *Anticancer research* **23**(2C): 1951-1954.

Cermakian N, Monaco L, Pando MP, Dierich A, Sassone-Corsi P (2001). Altered behavioral rhythms and clock gene expression in mice with a targeted mutation in the *Period1* gene. *The EMBO journal* **20**(15): 3967-3974.

Challet E (2013). Circadian clocks, food intake, and metabolism. *Progress in molecular biology and translational science* **119**: 105-135.

Chen P, Kakan X, Wang S, Dong W, Jia A, Cai C, *et al.* (2013). Deletion of clock gene *Per2* exacerbates cholestatic liver injury and fibrosis in mice. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie* **65**(4): 427-432.

Chen ST, Choo KB, Hou MF, Yeh KT, Kuo SJ, Chang JG (2005). Deregulated expression of the *PER1*, *PER2* and *PER3* genes in breast cancers. *Carcinogenesis* **26**(7): 1241-1246.

- Cheng HY, Papp JW, Varlamova O, Dziema H, Russell B, Curfman JP, *et al.* (2007). microRNA modulation of circadian-clock period and entrainment. *Neuron* **54**(5): 813-829.
- Cheng Y, Cai L, Jiang P, Wang J, Gao C, Feng H, *et al.* (2013). SIRT1 inhibition by melatonin exerts antitumor activity in human osteosarcoma cells. *European journal of pharmacology* **715**(1-3): 219-229.
- Chi C, He ZF, Liu Y, Lin XM, Sun CC (2013). [Expression and clinical significance of circadian gene Per2 in non-small cell lung cancer]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* **35**(2): 129-131.
- Cho H, Zhao X, Hatori M, Yu RT, Barish GD, Lam MT, *et al.* (2012). Regulation of circadian behaviour and metabolism by REV-ERB-alpha and REV-ERB-beta. *Nature* **485**(7396): 123-127.
- Chu C, Zhao Z (2013). MicroRNA in the molecular mechanism of the circadian clock in mammals. *Frontiers in bioscience* **18**: 441-446.
- Claustrat B, Brun J, Borson-Chazot F (2001). [Melatonin and circadian rhythm]. *Revue neurologique* **157**(11 Pt 2): S121-125.
- Claustrat B, Brun J, Chazot G (2005). The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep medicine reviews* **9**(1): 11-24.
- Cos S, Mediavilla D, Martinez-Campa C, Gonzalez A, Alonso-Gonzalez C, Sanchez-Barcelo EJ (2006). Exposure to light-at-night increases the growth of DMBA-induced mammary adenocarcinomas in rats. *Cancer letters* **235**(2): 266-271.
- Czeisler CA, Richardson GS, Coleman RM, Zimmerman JC, Moore-Ede MC, Dement WC, *et al.* (1981). Chronotherapy: resetting the circadian clocks of patients with delayed sleep phase insomnia. *Sleep* **4**(1): 1-21.
- Dahlitz M, Alvarez B, Vignau J, English J, Arendt J, Parkes JD (1991). Delayed sleep phase syndrome response to melatonin. *Lancet* **337**(8750): 1121-1124.
- Dai H, Zhang L, Cao M, Song F, Zheng H, Zhu X, *et al.* (2011). The role of polymorphisms in circadian pathway genes in breast tumorigenesis. *Breast cancer research and treatment* **127**(2): 531-540.
- Dardente H, Menet JS, Challet E, Tournier BB, Pevet P, Masson-Pevet M (2004). Daily and circadian expression of neuropeptides in the suprachiasmatic nuclei of nocturnal and diurnal rodents. *Brain research. Molecular brain research* **124**(2): 143-151.
- Dauchy RT, Blask DE, Sauer LA, Brainard GC, Krause JA (1999). Dim light during darkness stimulates tumor progression by enhancing tumor fatty acid uptake and metabolism. *Cancer letters* **144**(2): 131-136.

Dauchy RT, Dupepe LM, Ooms TG, Dauchy EM, Hill CR, Mao L, *et al.* (2011). Eliminating animal facility light-at-night contamination and its effect on circadian regulation of rodent physiology, tumor growth, and metabolism: a challenge in the relocation of a cancer research laboratory. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS* **50**(3): 326-336.

Davidson AJ, Castanon-Cervantes O, Leise TL, Molyneux PC, Harrington ME (2009). Visualizing jet lag in the mouse suprachiasmatic nucleus and peripheral circadian timing system. *The European journal of neuroscience* **29**(1): 171-180.

de La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, Renard CA, Buendia MA, Soubrane O, *et al.* (1998). Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**(15): 8847-8851.

De Minicis S, Kisseleva T, Francis H, Baroni GS, Benedetti A, Brenner D, *et al.* (2013). Liver carcinogenesis: rodent models of hepatocarcinoma and cholangiocarcinoma. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* **45**(6): 450-459.

DeBruyne JP, Noton E, Lambert CM, Maywood ES, Weaver DR, Reppert SM (2006). A clock shock: mouse CLOCK is not required for circadian oscillator function. *Neuron* **50**(3): 465-477.

DeBruyne JP, Weaver DR, Reppert SM (2007a). CLOCK and NPAS2 have overlapping roles in the suprachiasmatic circadian clock. *Nature neuroscience* **10**(5): 543-545.

DeBruyne JP, Weaver DR, Reppert SM (2007b). Peripheral circadian oscillators require CLOCK. *Current biology : CB* **17**(14): R538-539.

Deprés-Brummer P, Bourin P, Pages N, Metzger G, Lévi F (1997). Persistent T lymphocyte rhythms despite suppressed circadian clock outputs in rats. *Am J Physiol* **273**(6 Pt 2): R1891-1899.

Destici E, Oklejewicz M, Saito S, van der Horst GT (2011). Mammalian cryptochromes impinge on cell cycle progression in a circadian clock-independent manner. *Cell cycle* **10**(21): 3788-3797.

Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* **26**(22): 3279-3290.

Dibner C, Schibler U, Albrecht U (2010). The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annual review of physiology* **72**: 517-549.

Driesen K, Jansen NW, Kant I, Mohren DC, van Amelsvoort LG (2010). Depressed mood in the working population: associations with work schedules and working hours. *Chronobiology international* **27**(5): 1062-1079.

Dudley CA, Erbel-Sieler C, Estill SJ, Reick M, Franken P, Pitts S, *et al.* (2003). Altered patterns of sleep and behavioral adaptability in NPAS2-deficient mice. *Science* **301**(5631): 379-383.

Ebisawa T, Uchiyama M, Kajimura N, Mishima K, Kamei Y, Katoh M, *et al.* (2001). Association of structural polymorphisms in the human period3 gene with delayed sleep phase syndrome. *EMBO reports* **2**(4): 342-346.

Eckel-Mahan K, Sassone-Corsi P (2009). Metabolism control by the circadian clock and vice versa. *Nature structural & molecular biology* **16**(5): 462-467.

Eckel-Mahan KL, Patel VR, Mohny RP, Vignola KS, Baldi P, Sassone-Corsi P (2012). Coordination of the transcriptome and metabolome by the circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**(14): 5541-5546.

Egberts JH, Schniewind B, Patzold M, Kettler B, Tepel J, Kalthoff H, *et al.* (2008). Dexamethasone reduces tumor recurrence and metastasis after pancreatic tumor resection in SCID mice. *Cancer biology & therapy* **7**(7): 1044-1050.

Eisele L, Prinz R, Klein-Hitpass L, Nuckel H, Lowinski K, Thomale J, *et al.* (2009). Combined PER2 and CRY1 expression predicts outcome in chronic lymphocytic leukemia. *European journal of haematology* **83**(4): 320-327.

Everhart JE, Ruhl CE (2009). Burden of digestive diseases in the United States part I: overall and upper gastrointestinal diseases. *Gastroenterology* **136**(2): 376-386.

Facciorusso A, Nacchiero MC, Rosania R, Laonigro G, Giorgio F, Del Prete V, *et al.* (2012). Pathways and gene expression profiles in hepatocellular carcinoma. *Minerva gastroenterologica e dietologica* **58**(1): 35-48.

Fava G, Lorenzini I (2012). Molecular pathogenesis of cholangiocarcinoma. *International journal of hepatology* **2012**: 630543.

Filipski E, Delaunay F, King VM, Wu MW, Claustrat B, Grechez-Cassiau A, *et al.* (2004a). Effects of chronic jet lag on tumor progression in mice. *Cancer research* **64**(21): 7879-7885.

Filipski E, Innominato PF, Wu M, Li XM, Iacobelli S, Xian LJ, *et al.* (2005). Effects of light and food schedules on liver and tumor molecular clocks in mice. *Journal of the National Cancer Institute* **97**(7): 507-517.

Filipski E, King VM, Etienne MC, Li X, Claustrat B, Granda TG, *et al.* (2004b). Persistent twenty-four hour changes in liver and bone marrow despite suprachiasmatic nuclei ablation in mice. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **287**(4): R844-851.

Filipski E, King VM, Li X, Granda TG, Mormont MC, Claustrat B, *et al.* (2003). Disruption of circadian coordination accelerates malignant growth in mice. *Pathologie-biologie* **51**(4): 216-219.

Filipski E, King VM, Li X, Granda TG, Mormont MC, Liu X, *et al.* (2002). Host circadian clock as a control point in tumor progression. *Journal of the National Cancer Institute* **94**(9): 690-697.

Filipski E, Li XM, Levi F (2006). Disruption of circadian coordination and malignant growth. *Cancer causes & control : CCC* **17**(4): 509-514.

Filipski E, Subramanian P, Carriere J, Guettier C, Barbason H, Levi F (2009). Circadian disruption accelerates liver carcinogenesis in mice. *Mutation research* **680**(1-2): 95-105.

Fu L, Kettner NM (2013). The circadian clock in cancer development and therapy. *Progress in molecular biology and translational science* **119**: 221-282.

Fu L, Pelicano H, Liu J, Huang P, Lee C (2002). The circadian gene *Period2* plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *Cell* **111**(1): 41-50.

Fujioka A, Takashima N, Shigeyoshi Y (2006). Circadian rhythm generation in a glioma cell line. *Biochemical and biophysical research communications* **346**(1): 169-174.

Fustin JM, Doi M, Yamada H, Komatsu R, Shimba S, Okamura H (2012). Rhythmic nucleotide synthesis in the liver: temporal segregation of metabolites. *Cell reports* **1**(4): 341-349.

Gauger MA, Sancar A (2005). Cryptochrome, circadian cycle, cell cycle checkpoints, and cancer. *Cancer research* **65**(15): 6828-6834.

Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, *et al.* (1998). Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* **280**(5369): 1564-1569.

Gery S, Gombart AF, Yi WS, Koeffler C, Hofmann WK, Koeffler HP (2005). Transcription profiling of C/EBP targets identifies *Per2* as a gene implicated in myeloid leukemia. *Blood* **106**(8): 2827-2836.

Gery S, Komatsu N, Baldjyan L, Yu A, Koo D, Koeffler HP (2006). The circadian gene *per1* plays an important role in cell growth and DNA damage control in human cancer cells. *Mol Cell* **22**(3): 375-382.

Gery S, Komatsu N, Kawamata N, Miller CW, Desmond J, Virk RK, *et al.* (2007a). Epigenetic silencing of the candidate tumor suppressor gene *Per1* in non-small cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **13**(5): 1399-1404.

- Gery S, Virk RK, Chumakov K, Yu A, Koeffler HP (2007b). The clock gene Per2 links the circadian system to the estrogen receptor. *Oncogene* **26**(57): 7916-7920.
- Goldbeter A, Gérard C, Gonze D, Leloup JC, Dupont G (2012). Systems biology of cellular rhythms. *FEBS Lett* **586**(18): 2955-2965.
- Goldbeter A, Gerard C, Leloup JC (2010). [Circadian rhythms and systems biology]. *Medecine sciences : M/S* **26**(1): 49-56.
- Gooley JJ (2008). Treatment of circadian rhythm sleep disorders with light. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore* **37**(8): 669-676.
- Gorbacheva VY, Kondratov RV, Zhang R, Cherukuri S, Gudkov AV, Takahashi JS, *et al.* (2005). Circadian sensitivity to the chemotherapeutic agent cyclophosphamide depends on the functional status of the CLOCK/BMAL1 transactivation complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(9): 3407-3412.
- Grundy A, Schuetz JM, Lai AS, Janoo-Gilani R, Leach S, Burstyn I, *et al.* (2013). Shift work, circadian gene variants and risk of breast cancer. *Cancer epidemiology* **37**(5): 606-612.
- Gu X, Xing L, Shi G, Liu Z, Wang X, Qu Z, *et al.* (2012). The circadian mutation PER2(S662G) is linked to cell cycle progression and tumorigenesis. *Cell death and differentiation* **19**(3): 397-405.
- Guo H, Brewer JM, Champhekar A, Harris RB, Bittman EL (2005). Differential control of peripheral circadian rhythms by suprachiasmatic-dependent neural signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(8): 3111-3116.
- Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**(1): 57-70.
- Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**(5): 646-674.
- Hansen KF, Sakamoto K, Obrietan K (2011). MicroRNAs: a potential interface between the circadian clock and human health. *Genome medicine* **3**(2): 10.
- Haus EL, Smolensky MH (2013). Shift work and cancer risk: potential mechanistic roles of circadian disruption, light at night, and sleep deprivation. *Sleep medicine reviews* **17**(4): 273-284.
- Heindryckx F, Colle I, Van Vlierberghe H (2009). Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research. *International journal of experimental pathology* **90**(4): 367-386.
- Hernandez-Ruiz J, Cano A, Arnao MB (2004). Melatonin: a growth-stimulating compound present in lupin tissues. *Planta* **220**(1): 140-144.

Hoffman AE, Zheng T, Ba Y, Stevens RG, Yi CH, Leaderer D, *et al.* (2010). Phenotypic effects of the circadian gene Cryptochrome 2 on cancer-related pathways. *BMC cancer* **10**: 110.

Hoffman AE, Zheng T, Ba Y, Zhu Y (2008). The circadian gene NPAS2, a putative tumor suppressor, is involved in DNA damage response. *Molecular cancer research : MCR* **6**(9): 1461-1468.

Hogenesch JB, Gu YZ, Jain S, Bradfield CA (1998). The basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**(10): 5474-5479.

Hoshida Y, Toffanin S, Lachenmayer A, Villanueva A, Minguez B, Llovet JM (2010). Molecular classification and novel targets in hepatocellular carcinoma: recent advancements. *Seminars in liver disease* **30**(1): 35-51.

Hsu CM, Lin SF, Lu CT, Lin PM, Yang MY (2012). Altered expression of circadian clock genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **33**(1): 149-155.

Hsu HC, Jeng YM, Mao TL, Chu JS, Lai PL, Peng SY (2000). Beta-catenin mutations are associated with a subset of low-stage hepatocellular carcinoma negative for hepatitis B virus and with favorable prognosis. *The American journal of pathology* **157**(3): 763-770.

Hu TH, Huang CC, Lin PR, Chang HW, Ger LP, Lin YW, *et al.* (2003). Expression and prognostic role of tumor suppressor gene PTEN/MMAC1/TEP1 in hepatocellular carcinoma. *Cancer* **97**(8): 1929-1940.

Hua H, Wang Y, Wan C, Liu Y, Zhu B, Yang C, *et al.* (2006). Circadian gene mPer2 overexpression induces cancer cell apoptosis. *Cancer science* **97**(7): 589-596.

Huang H, Fujii H, Sankila A, Mahler-Araujo BM, Matsuda M, Cathomas G, *et al.* (1999). Beta-catenin mutations are frequent in human hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C virus infection. *The American journal of pathology* **155**(6): 1795-1801.

Hughes ME, DiTacchio L, Hayes KR, Vollmers C, Pulivarthy S, Baggs JE, *et al.* (2009). Harmonics of circadian gene transcription in mammals. *PLoS Genet* **5**(4): e1000442.

Ibata Y, Okamura H, Tanaka M, Tamada Y, Hayashi S, Iijima N, *et al.* (1999). Functional morphology of the suprachiasmatic nucleus. *Frontiers in neuroendocrinology* **20**(3): 241-268.

Illnerova H, Vanecek J, Hoffmann K (1987). Adjustment of the rat pineal N-acetyltransferase rhythm to eight-hour shifts of the light-dark cycle: advance of the cycle disturbs the rhythm more than delay. *Brain research* **417**(1): 167-171.

Im JS, Jung BH, Kim SE, Lee KH, Lee JK (2010). Per3, a circadian gene, is required for Chk2 activation in human cells. *FEBS Lett* **584**(23): 4731-4734.

Innominato PF, Giacchetti S, Bjarnason GA, Focan C, Garufi C, Coudert B, *et al.* (2012). Prediction of overall survival through circadian rest-activity monitoring during chemotherapy for metastatic colorectal cancer. *International journal of cancer. Journal internationale du cancer* **131**(11): 2684-2692.

Innominato PF, Mormont MC, Rich TA, Waterhouse J, Levi FA, Bjarnason GA (2009). Circadian disruption, fatigue, and anorexia clustering in advanced cancer patients: implications for innovative therapeutic approaches. *Integrative cancer therapies* **8**(4): 361-370.

Ioannou GN, Bryson CL, Weiss NS, Miller R, Scott JD, Boyko EJ (2013). The prevalence of cirrhosis and hepatocellular carcinoma in patients with human immunodeficiency virus infection. *Hepatology* **57**(1): 249-257.

Isomoto H, Mott JL, Kobayashi S, Werneburg NW, Bronk SF, Haan S, *et al.* (2007). Sustained IL-6/STAT-3 signaling in cholangiocarcinoma cells due to SOCS-3 epigenetic silencing. *Gastroenterology* **132**(1): 384-396.

Ito A, Ando K, Hayakawa T, Iwata T, Kayukawa Y, Ohta T, *et al.* (1993). Long-term course of adult patients with delayed sleep phase syndrome. *The Japanese journal of psychiatry and neurology* **47**(3): 563-567.

Ito Y, Takeda T, Sasaki Y, Sakon M, Yamada T, Ishiguro S, *et al.* (2001). Expression and clinical significance of the erbB family in intrahepatic cholangiocellular carcinoma. *Pathology, research and practice* **197**(2): 95-100.

Itoi T, Isayama H, Sofuni A, Itokawa F, Tamura M, Watanabe Y, *et al.* (2012). Evaluation of effects of a novel endoscopically applied radiofrequency ablation biliary catheter using an ex-vivo pig liver. *Journal of hepato-biliary-pancreatic sciences* **19**(5): 543-547.

Jaiswal M, LaRusso NF, Burgart LJ, Gores GJ (2000). Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. *Cancer research* **60**(1): 184-190.

Jasper MS, Engeland WC (1994). Splanchnic neural activity modulates ultradian and circadian rhythms in adrenocortical secretion in awake rats. *Neuroendocrinology* **59**(2): 97-109.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, *et al.* (2008). Cancer statistics, 2008. *CA: a cancer journal for clinicians* **58**(2): 71-96.

Johnson CH (2010). Circadian clocks and cell division: what's the pacemaker? *Cell Cycle* **9**(19): 3864-3873.

Jones CR, Campbell SS, Zane SE, Cooper F, DeSano A, Murphy PJ, *et al.* (1999). Familial advanced sleep-phase syndrome: A short-period circadian rhythm variant in humans. *Nature medicine* **5**(9): 1062-1065.

Jung-Hynes B, Huang W, Reiter RJ, Ahmad N (2010). Melatonin resynchronizes dysregulated circadian rhythm circuitry in human prostate cancer cells. *Journal of pineal research* **49**(1): 60-68.

Jung-Hynes B, Schmit TL, Reagan-Shaw SR, Siddiqui IA, Mukhtar H, Ahmad N (2011). Melatonin, a novel Sirt1 inhibitor, imparts antiproliferative effects against prostate cancer in vitro in culture and in vivo in TRAMP model. *Journal of pineal research* **50**(2): 140-149.

Jung CH, Kim EM, Park JK, Hwang SG, Moon SK, Kim WJ, *et al.* (2013). Bmal1 suppresses cancer cell invasion by blocking the phosphoinositide 3-kinase-Akt-MMP-2 signaling pathway. *Oncology reports* **29**(6): 2109-2113.

Kannen V, Marini T, Zanette DL, Frajacomio FT, Silva GE, Silva WA, Jr., *et al.* (2011). The melatonin action on stromal stem cells within pericryptal area in colon cancer model under constant light. *Biochemical and biophysical research communications* **405**(4): 593-598.

Karin M, Greten FR (2005). NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature reviews. Immunology* **5**(10): 749-759.

Keller-Wood ME, Dallman MF (1984). Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocrine reviews* **5**(1): 1-24.

Keller M, Mazuch J, Abraham U, Eom GD, Herzog ED, Volk HD, *et al.* (2009). A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(50): 21407-21412.

Khan SA, Davidson BR, Goldin RD, Heaton N, Karani J, Pereira SP, *et al.* (2012). Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: an update. *Gut* **61**(12): 1657-1669.

Kim KS, Kim YC, Oh IJ, Kim SS, Choi JY, Ahn RS (2012). Association of worse prognosis with an aberrant diurnal cortisol rhythm in patients with advanced lung cancer. *Chronobiology international* **29**(8): 1109-1120.

Kloog I, Haim A, Stevens RG, Portnov BA (2009). Global co-distribution of light at night (LAN) and cancers of prostate, colon, and lung in men. *Chronobiology international* **26**(1): 108-125.

Knutsson A, Alfredsson L, Karlsson B, Akerstedt T, Fransson EI, Westerholm P, *et al.* (2013). Breast cancer among shift workers: results of the WOLF longitudinal cohort study. *Scandinavian journal of work, environment & health* **39**(2): 170-177.

Ko CH, Takahashi JS (2006). Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human molecular genetics* **15 Spec No 2**: R271-277.

Ko KS, Peng J, Yang H (2013). Animal models of cholangiocarcinoma. *Current opinion in gastroenterology* **29**(3): 312-318.

Kobayashi S, Werneburg NW, Bronk SF, Kaufmann SH, Gores GJ (2005). Interleukin-6 contributes to Mcl-1 up-regulation and TRAIL resistance via an Akt-signaling pathway in cholangiocarcinoma cells. *Gastroenterology* **128**(7): 2054-2065.

Kojima S, Shingle DL, Green CB (2011). Post-transcriptional control of circadian rhythms. *Journal of cell science* **124**(Pt 3): 311-320.

Konopka RJ, Benzer S (1971). Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **68**(9): 2112-2116.

Kornmann B, Schaad O, Bujard H, Takahashi JS, Schibler U (2007a). System-driven and oscillator-dependent circadian transcription in mice with a conditionally active liver clock. *PLoS biology* **5**(2): e34.

Kornmann B, Schaad O, Reinke H, Saini C, Schibler U (2007b). Regulation of circadian gene expression in liver by systemic signals and hepatocyte oscillators. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **72**: 319-330.

Kostoglou-Athanassiou I (2013). Therapeutic applications of melatonin. *Therapeutic advances in endocrinology and metabolism* **4**(1): 13-24.

Krieger DT, Hauser H (1978). Comparison of synchronization of circadian corticosteroid rhythms by photoperiod and food. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**(3): 1577-1581.

Kronauer RE, Czeisler CA, Pilato SF, Moore-Ede MC, Weitzman ED (1982). Mathematical model of the human circadian system with two interacting oscillators. *The American journal of physiology* **242**(1): R3-17.

Kubo T, Ozasa K, Mikami K, Wakai K, Fujino Y, Watanabe Y, *et al.* (2006). Prospective cohort study of the risk of prostate cancer among rotating-shift workers: findings from the Japan collaborative cohort study. *American journal of epidemiology* **164**(6): 549-555.

Kume K, Zylka MJ, Sriram S, Shearman LP, Weaver DR, Jin X, *et al.* (1999). mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* **98**(2): 193-205.

Kuo SJ, Chen ST, Yeh KT, Hou MF, Chang YS, Hsu NC, *et al.* (2009). Disturbance of circadian gene expression in breast cancer. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* **454**(4): 467-474.

Lahti TA, Partonen T, Kyronen P, Kauppinen T, Pukkala E (2008). Night-time work predisposes to non-Hodgkin lymphoma. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **123**(9): 2148-2151.

Lamia KA, Papp SJ, Yu RT, Barish GD, Uhlenhaut NH, Jonker JW, *et al.* (2011). Cryptochromes mediate rhythmic repression of the glucocorticoid receptor. *Nature* **480**(7378): 552-556.

Laothong U, Pinlaor P, Boonsiri P, Pairojkul C, Priprem A, Johns NP, *et al.* (2013). Melatonin inhibits cholangiocarcinoma and reduces liver injury in *Opisthorchis viverrini*-infected and N-nitrosodimethylamine-treated hamsters. *Journal of pineal research* **55**(3): 257-266.

Lee JH, Sancar A (2011). Circadian clock disruption improves the efficacy of chemotherapy through p73-mediated apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**(26): 10668-10672.

Lee JS, Chu IS, Mikaelyan A, Calvisi DF, Heo J, Reddy JK, *et al.* (2004). Application of comparative functional genomics to identify best-fit mouse models to study human cancer. *Nature genetics* **36**(12): 1306-1311.

Lee JS, Grisham JW, Thorgeirsson SS (2005). Comparative functional genomics for identifying models of human cancer. *Carcinogenesis* **26**(6): 1013-1020.

Lee S, Donehower LA, Herron AJ, Moore DD, Fu L (2010). Disrupting circadian homeostasis of sympathetic signaling promotes tumor development in mice. *PloS one* **5**(6): e10995.

Lengyel Z, Lovig C, Kommedal S, Keszthelyi R, Szekeres G, Battyani Z, *et al.* (2013). Altered expression patterns of clock gene mRNAs and clock proteins in human skin tumors. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **34**(2): 811-819.

Leone F, Cavalloni G, Pignochino Y, Sarotto I, Ferraris R, Piacibello W, *et al.* (2006). Somatic mutations of epidermal growth factor receptor in bile duct and gallbladder carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **12**(6): 1680-1685.

Lerner AB, Case JD, Takahashi Y (1960). Isolation of melatonin and 5-methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands. *The Journal of biological chemistry* **235**: 1992-1997.

- Levi F, Okyar A, Dulong S, Innominato PF, Clairambault J (2010). Circadian timing in cancer treatments. *Annual review of pharmacology and toxicology* **50**: 377-421.
- Levi F, Schibler U (2007). Circadian rhythms: mechanisms and therapeutic implications. *Annual review of pharmacology and toxicology* **47**: 593-628.
- Lewintre EJ, Martin CR, Ballesteros CG, Montaner D, Rivera RF, Mayans JR, *et al.* (2009). Cryptochrome-1 expression: a new prognostic marker in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* **94**(2): 280-284.
- Lewy AJ (2007). Melatonin and human chronobiology. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **72**: 623-636.
- Lewy AJ, Emens J, Jackman A, Yuhas K (2006). Circadian uses of melatonin in humans. *Chronobiology international* **23**(1-2): 403-412.
- Li XM, Delaunay F, Dulong S, Claustrat B, Zampera S, Fujii Y, *et al.* (2010). Cancer inhibition through circadian reprogramming of tumor transcriptome with meal timing. *Cancer research* **70**(8): 3351-3360.
- Li XM, Levi F (2007). Circadian physiology is a toxicity target of the anticancer drug gemcitabine in mice. *Journal of biological rhythms* **22**(2): 159-166.
- Lim IK, Park TJ, Jee JW, Lee MS, Paik WK (1999). Differential expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase during diethylnitrosamine-induced carcinogenesis and liver regeneration in Sprague-Dawley male rats. *Journal of cancer research and clinical oncology* **125**(8-9): 493-499.
- Lin YM, Chang JH, Yeh KT, Yang MY, Liu TC, Lin SF, *et al.* (2008). Disturbance of circadian gene expression in hepatocellular carcinoma. *Molecular carcinogenesis* **47**(12): 925-933.
- Lissoni P, Chilelli M, Villa S, Cerizza L, Tancini G (2003). Five years survival in metastatic non-small cell lung cancer patients treated with chemotherapy alone or chemotherapy and melatonin: a randomized trial. *Journal of pineal research* **35**(1): 12-15.
- Llovet JM, Bruix J (2008). Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008. *Journal of hepatology* **48 Suppl 1**: S20-37.
- Logan RW, Zhang C, Murugan S, O'Connell S, Levitt D, Rosenwasser AM, *et al.* (2012). Chronic shift-lag alters the circadian clock of NK cells and promotes lung cancer growth in rats. *Journal of immunology* **188**(6): 2583-2591.

Lombardi DA, Folkard S, Willetts JL, Smith GS (2010). Daily sleep, weekly working hours, and risk of work-related injury: US National Health Interview Survey (2004-2008). *Chronobiology international* **27**(5): 1013-1030.

Lowrey PL, Takahashi JS (2004). Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Annual review of genomics and human genetics* **5**: 407-441.

Luedde T, Schwabe RF (2011a). NF-kappaB in the liver--linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* **8**(2): 108-118.

Luedde T, Schwabe RF (2011b). NF-κB in the liver--linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **8**(2): 108-118.

Luo Y, Wang F, Chen LA, Chen XW, Chen ZJ, Liu PF, *et al.* (2012). Deregulated expression of cry1 and cry2 in human gliomas. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* **13**(11): 5725-5728.

Maeda S, Kamata H, Luo JL, Leffert H, Karin M (2005). IKKbeta couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell* **121**(7): 977-990.

Maier B, Kramer A (2013). A NONO-gate times the cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**(5): 1565-1566.

Mancuso A (2013). Management of hepatocellular carcinoma: Enlightening the gray zones. *World journal of hepatology* **5**(6): 302-310.

Martinez-Nicolas A, Ortiz-Tudela E, Madrid JA, Rol MA (2011). Crosstalk between environmental light and internal time in humans. *Chronobiology international* **28**(7): 617-629.

Matsunaga N, Ikeda M, Takiguchi T, Koyanagi S, Ohdo S (2008). The molecular mechanism regulating 24-hour rhythm of CYP2E1 expression in the mouse liver. *Hepatology* **48**(1): 240-251.

Matsuo T, Yamaguchi S, Mitsui S, Emi A, Shimoda F, Okamura H (2003). Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. *Science* **302**(5643): 255-259.

Mazzoccoli G, Piepoli A, Carella M, Panza A, Paziienza V, Benegiamo G, *et al.* (2012). Altered expression of the clock gene machinery in kidney cancer patients. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* **66**(3): 175-179.

Michaud DS (2002). The epidemiology of pancreatic, gallbladder, and other biliary tract cancers. *Gastrointestinal endoscopy* **56**(6 Suppl): S195-200.

Miyazaki K, Wakabayashi M, Hara Y, Ishida N (2010). Tumor growth suppression in vivo by overexpression of the circadian component, PER2. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **15**(4): 351-358.

Mohawk JA, Green CB, Takahashi JS (2012). Central and peripheral circadian clocks in mammals. *Annual review of neuroscience* **35**: 445-462.

Mohawk JA, Takahashi JS (2011). Cell autonomy and synchrony of suprachiasmatic nucleus circadian oscillators. *Trends in neurosciences* **34**(7): 349-358.

Moore RY (1997). Circadian rhythms: basic neurobiology and clinical applications. *Annual review of medicine* **48**: 253-266.

Moore RY, Eichler VB (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain research* **42**(1): 201-206.

Mormont MC, Waterhouse J, Bleuzen P, Giacchetti S, Jami A, Bogdan A, *et al.* (2000). Marked 24-h rest/activity rhythms are associated with better quality of life, better response, and longer survival in patients with metastatic colorectal cancer and good performance status. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **6**(8): 3038-3045.

Mostafaie N, Kallay E, Sauerzapf E, Bonner E, Kriwanek S, Cross HS, *et al.* (2009). Correlated downregulation of estrogen receptor beta and the circadian clock gene Per1 in human colorectal cancer. *Molecular carcinogenesis* **48**(7): 642-647.

Muzio G, Marengo B, Salvo R, Semeraro A, Canuto RA, Tessitore L (1999). Liver cancer is induced by a subnecrogenic dose of DENA when associated with fasting/refeeding: role of glutathione-transferase and lipid peroxidation. *Free radical biology & medicine* **26**(9-10): 1314-1320.

Nagoshi E, Saini C, Bauer C, Laroche T, Naef F, Schibler U (2004). Circadian gene expression in individual fibroblasts: cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells. *Cell* **119**(5): 693-705.

Nagtegaal JE, Kerkhof GA, Smits MG, Swart AC, Van Der Meer YG (1998). Delayed sleep phase syndrome: A placebo-controlled cross-over study on the effects of melatonin administered five hours before the individual dim light melatonin onset. *Journal of sleep research* **7**(2): 135-143.

Nakatani T, Roy G, Fujimoto N, Asahara T, Ito A (2001). Sex hormone dependency of diethylnitrosamine-induced liver tumors in mice and chemoprevention by leuprorelin. *Japanese journal of cancer research : Gann* **92**(3): 249-256.

- Narasimamurthy R, Hatori M, Nayak SK, Liu F, Panda S, Verma IM (2012). Circadian clock protein cryptochrome regulates the expression of proinflammatory cytokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**(31): 12662-12667.
- Naugler WE, Sakurai T, Kim S, Maeda S, Kim K, Elsharkawy AM, *et al.* (2007). Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science* **317**(5834): 121-124.
- Nelson W, Tong YL, Lee JK, Halberg F (1979). Methods for cosinor-rhythmometry. *Chronobiologia* **6**(4): 305-323.
- Nikolaou K, Sarris M, Talianidis I (2013). Molecular pathways: the complex roles of inflammation pathways in the development and treatment of liver cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **19**(11): 2810-2816.
- Oda A, Katayose Y, Yabuuchi S, Yamamoto K, Mizuma M, Shirasou S, *et al.* (2009). Clock gene mouse period2 overexpression inhibits growth of human pancreatic cancer cells and has synergistic effect with cisplatin. *Anticancer research* **29**(4): 1201-1209.
- Oginska H, Pokorski J, Oginski A (1993). Gender, ageing, and shiftwork intolerance. *Ergonomics* **36**(1-3): 161-168.
- Oishi K, Miyazaki K, Kadota K, Kikuno R, Nagase T, Atsumi G, *et al.* (2003). Genome-wide expression analysis of mouse liver reveals CLOCK-regulated circadian output genes. *The Journal of biological chemistry* **278**(42): 41519-41527.
- Okamura H, Miyake S, Sumi Y, Yamaguchi S, Yasui A, Muijtjens M, *et al.* (1999). Photic induction of mPer1 and mPer2 in cry-deficient mice lacking a biological clock. *Science* **286**(5449): 2531-2534.
- Ondze B, Espa F, Ming LC, Chakkar B, Besset A, Billiard M (2001). [Advanced sleep phase syndrome]. *Revue neurologique* **157**(11 Pt 2): S130-134.
- Ong CK, Subimerb C, Pairojkul C, Wongkham S, Cutcutache I, Yu W, *et al.* (2012). Exome sequencing of liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Nature genetics* **44**(6): 690-693.
- Ortiz-Tudela E, Mteyrek A, Ballesta A, Innominato PF, Levi F (2013). Cancer chronotherapeutics: experimental, theoretical, and clinical aspects. *Handbook of experimental pharmacology*(217): 261-288.
- Oster H, Damerow S, Kiessling S, Jakubcakova V, Abraham D, Tian J, *et al.* (2006). The circadian rhythm of glucocorticoids is regulated by a gating mechanism residing in the adrenal cortical clock. *Cell metabolism* **4**(2): 163-173.

Oster H, van der Horst GT, Albrecht U (2003). Daily variation of clock output gene activation in behaviorally arrhythmic mPer/mCry triple mutant mice. *Chronobiology international* **20**(4): 683-695.

Oster H, Yasui A, van der Horst GT, Albrecht U (2002). Disruption of mCry2 restores circadian rhythmicity in mPer2 mutant mice. *Genes & development* **16**(20): 2633-2638.

Ozturk N, Lee JH, Gaddameedhi S, Sancar A (2009). Loss of cryptochrome reduces cancer risk in p53 mutant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**(8): 2841-2846.

Palmer CR, Kripke DF, Savage HC, Jr., Cindrich LA, Loving RT, Elliott JA (2003). Efficacy of enhanced evening light for advanced sleep phase syndrome. *Behavioral sleep medicine* **1**(4): 213-226.

Panda S, Antoch MP, Miller BH, Su AI, Schook AB, Straume M, *et al.* (2002). Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* **109**(3): 307-320.

Partch CL, Green CB, Takahashi JS (2013). Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends in cell biology*.

Patel AH, Harnois DM, Klee GG, LaRusso NF, Gores GJ (2000). The utility of CA 19-9 in the diagnoses of cholangiocarcinoma in patients without primary sclerosing cholangitis. *The American journal of gastroenterology* **95**(1): 204-207.

Pegoraro M, Tauber E (2008). The role of microRNAs (miRNA) in circadian rhythmicity. *Journal of genetics* **87**(5): 505-511.

Perreau-Lenz S, Kalsbeek A, Pevet P, Buijs RM (2004). Glutamatergic clock output stimulates melatonin synthesis at night. *The European journal of neuroscience* **19**(2): 318-324.

Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, *et al.* (2004). NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* **431**(7007): 461-466.

Pogue-Geile KL, Lyons-Weiler J, Whitcomb DC (2006). Molecular overlap of fly circadian rhythms and human pancreatic cancer. *Cancer letters* **243**(1): 55-57.

Prasad S, Ravindran J, Aggarwal BB (2010). NF-kappaB and cancer: how intimate is this relationship. *Mol Cell Biochem* **336**(1-2): 25-37.

Qin LX, Tang ZY (2002). The prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma. *World journal of gastroenterology : WJG* **8**(3): 385-392.

Quay WB (1964). Circadian and Estrous Rhythms in Pineal Melatonin and 5-Hydroxy Indole-3-Acetic Acid. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine* **115**: 710-713.

Rafnsson V, Tulinius H, Jonasson JG, Hrafnkelsson J (2001). Risk of breast cancer in female flight attendants: a population-based study (Iceland). *Cancer causes & control : CCC* **12**(2): 95-101.

Rajaratnam SM, Arendt J (2001). Health in a 24-h society. *Lancet* **358**(9286): 999-1005.

Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M (1990). Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* **247**(4945): 975-978.

Ramage JK, Donaghy A, Farrant JM, Iorns R, Williams R (1995). Serum tumor markers for the diagnosis of cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* **108**(3): 865-869.

Reddy AB, Field MD, Maywood ES, Hastings MH (2002). Differential resynchronisation of circadian clock gene expression within the suprachiasmatic nuclei of mice subjected to experimental jet lag. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**(17): 7326-7330.

Reddy AB, Karp NA, Maywood ES, Sage EA, Deery M, O'Neill JS, *et al.* (2006). Circadian orchestration of the hepatic proteome. *Current biology : CB* **16**(11): 1107-1115.

Relles D, Sendekci J, Chipitsyna G, Hyslop T, Yeo CJ, Arafat HA (2013). Circadian gene expression and clinicopathologic correlates in pancreatic cancer. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* **17**(3): 443-450.

Reppert SM, Weaver DR (2001). Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annual review of physiology* **63**: 647-676.

Reppert SM, Weaver DR (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* **418**(6901): 935-941.

Rizvi S, Gores GJ (2013). Pathogenesis, diagnosis, and management of cholangiocarcinoma. *Gastroenterology* **145**(6): 1215-1229.

Roberts LR, Gores GJ (2005). Hepatocellular carcinoma: molecular pathways and new therapeutic targets. *Seminars in liver disease* **25**(2): 212-225.

Romagnuolo J, Bardou M, Rahme E, Joseph L, Reinhold C, Barkun AN (2003). Magnetic resonance cholangiopancreatography: a meta-analysis of test performance in suspected biliary disease. *Annals of internal medicine* **139**(7): 547-557.

Rosengarten H, Meller E, Friedhoff AJ (1972). In vitro enzymatic formation of melatonin by human erythrocytes. *Research communications in chemical pathology and pharmacology* **4**(2): 457-465.

Rosenthal NE (1991). Plasma melatonin as a measure of the human clock. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **73**(2): 225-226.

Sack RL (2010). Clinical practice. Jet lag. *The New England journal of medicine* **362**(5): 440-447.

Sack RL, Auckley D, Auger RR, Carskadon MA, Wright KP, Jr., Vitiello MV, *et al.* (2007). Circadian rhythm sleep disorders: part II, advanced sleep phase disorder, delayed sleep phase disorder, free-running disorder, and irregular sleep-wake rhythm. An American Academy of Sleep Medicine review. *Sleep* **30**(11): 1484-1501.

Sahar S, Sassone-Corsi P (2009). Metabolism and cancer: the circadian clock connection. *Nature reviews. Cancer* **9**(12): 886-896.

Sahasrabudde VV, Shiels MS, McGlynn KA, Engels EA (2012). The risk of hepatocellular carcinoma among individuals with acquired immunodeficiency syndrome in the United States. *Cancer* **118**(24): 6226-6233.

Schernhammer ES, Laden F, Speizer FE, Willett WC, Hunter DJ, Kawachi I, *et al.* (2001). Rotating night shifts and risk of breast cancer in women participating in the nurses' health study. *Journal of the National Cancer Institute* **93**(20): 1563-1568.

Schernhammer ES, Laden F, Speizer FE, Willett WC, Hunter DJ, Kawachi I, *et al.* (2003). Night-shift work and risk of colorectal cancer in the nurses' health study. *Journal of the National Cancer Institute* **95**(11): 825-828.

Schmutz I, Albrecht U, Ripperger JA (2012). The role of clock genes and rhythmicity in the liver. *Molecular and cellular endocrinology* **349**(1): 38-44.

Schroeder AM, Colwell CS (2013). How to fix a broken clock. *Trends in pharmacological sciences* **34**(11): 605-619.

Sephton SE, Sapolsky RM, Kraemer HC, Spiegel D (2000). Diurnal cortisol rhythm as a predictor of breast cancer survival. *Journal of the National Cancer Institute* **92**(12): 994-1000.

Shanahan TL, Czeisler CA (1991). Light exposure induces equivalent phase shifts of the endogenous circadian rhythms of circulating plasma melatonin and core body temperature in men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **73**(2): 227-235.

Shanware NP, Hutchinson JA, Kim SH, Zhan L, Bowler MJ, Tibbetts RS (2011). Casein kinase 1-dependent phosphorylation of familial advanced sleep phase syndrome-associated residues controls PERIOD 2 stability. *The Journal of biological chemistry* **286**(14): 12766-12774.

Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, Maywood ES, Chaves I, Zheng B, *et al.* (2000). Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* **288**(5468): 1013-1019.

Shih MC, Yeh KT, Tang KP, Chen JC, Chang JG (2006). Promoter methylation in circadian genes of endometrial cancers detected by methylation-specific PCR. *Molecular carcinogenesis* **45**(10): 732-740.

Shiraha H, Yamamoto K, Namba M (2013). Human hepatocyte carcinogenesis (review). *International journal of oncology* **42**(4): 1133-1138.

Sia D, Hoshida Y, Villanueva A, Roayaie S, Ferrer J, Tabak B, *et al.* (2013). Integrative molecular analysis of intrahepatic cholangiocarcinoma reveals 2 classes that have different outcomes. *Gastroenterology* **144**(4): 829-840.

Sirica AE (2005). Cholangiocarcinoma: molecular targeting strategies for chemoprevention and therapy. *Hepatology* **41**(1): 5-15.

Sirica AE (2008). Role of ErbB family receptor tyrosine kinases in intrahepatic cholangiocarcinoma. *World journal of gastroenterology : WJG* **14**(46): 7033-7058.

Sirica AE, Lai GH, Endo K, Zhang Z, Yoon BI (2002). Cyclooxygenase-2 and ERBB-2 in cholangiocarcinoma: potential therapeutic targets. *Seminars in liver disease* **22**(3): 303-313.

Spoelstra K, Oklejewicz M, Daan S (2002). Restoration of self-sustained circadian rhythmicity by the mutant clock allele in mice in constant illumination. *Journal of biological rhythms* **17**(6): 520-525.

Steel AW, Postgate AJ, Khorsandi S, Nicholls J, Jiao L, Vlavianos P, *et al.* (2011). Endoscopically applied radiofrequency ablation appears to be safe in the treatment of malignant biliary obstruction. *Gastrointestinal endoscopy* **73**(1): 149-153.

Steinlechner S, Jacobmeier B, Scherbarth F, Dernbach H, Kruse F, Albrecht U (2002). Robust circadian rhythmicity of Per1 and Per2 mutant mice in constant light, and dynamics of Per1 and Per2 gene expression under long and short photoperiods. *Journal of biological rhythms* **17**(3): 202-209.

Stephan FK, Zucker I (1972). Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **69**(6): 1583-1586.

Stevens RG, Hansen J, Costa G, Haus E, Kauppinen T, Aronson KJ, *et al.* (2011). Considerations of circadian impact for defining 'shift work' in cancer studies: IARC Working Group Report. *Occupational and environmental medicine* **68**(2): 154-162.

Stokkan KA, Yamazaki S, Tei H, Sakaki Y, Menaker M (2001). Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science* **291**(5503): 490-493.

Straif K, Baan R, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, *et al.* (2007). Carcinogenicity of shift-work, painting, and fire-fighting. *The lancet oncology* **8**(12): 1065-1066.

Sun B, Karin M (2013). Inflammation and liver tumorigenesis. *Frontiers of medicine* **7**(2): 242-254.

Sun CM, Huang SF, Zeng JM, Liu DB, Xiao Q, Tian WJ, *et al.* (2010). Per2 inhibits k562 leukemia cell growth in vitro and in vivo through cell cycle arrest and apoptosis induction. *Pathology oncology research : POR* **16**(3): 403-411.

Suzuki T, Sato F, Kondo J, Liu Y, Kusumi T, Fujimoto K, *et al.* (2008). Period is involved in the proliferation of human pancreatic MIA-PaCa2 cancer cells by TNF-alpha. *Biomedical research* **29**(2): 99-103.

Tadlock L, Patel T (2001). Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signaling in transformed growth of a cholangiocarcinoma cell line. *Hepatology* **33**(1): 43-51.

Tahara Y, Kuroda H, Saito K, Nakajima Y, Kubo Y, Ohnishi N, *et al.* (2012). In vivo monitoring of peripheral circadian clocks in the mouse. *Current biology : CB* **22**(11): 1029-1034.

Takahashi JS (2004). Finding new clock components: past and future. *Journal of biological rhythms* **19**(5): 339-347.

Taniguchi H, Fernandez AF, Setien F, Ropero S, Ballestar E, Villanueva A, *et al.* (2009). Epigenetic inactivation of the circadian clock gene BMAL1 in hematologic malignancies. *Cancer research* **69**(21): 8447-8454.

Thoennissen NH, Thoennissen GB, Abbasi S, Nabavi-Nouis S, Sauer T, Doan NB, *et al.* (2012). Transcription factor CCAAT/enhancer-binding protein alpha and critical circadian clock downstream target gene PER2 are highly deregulated in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* **53**(8): 1577-1585.

Thorgerirsson SS, Grisham JW (2002). Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nature genetics* **31**(4): 339-346.

Toh KL, Jones CR, He Y, Eide EJ, Hinz WA, Virshup DM, *et al.* (2001). An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science* **291**(5506): 1040-1043.

- Tokunaga H, Takebayashi Y, Utsunomiya H, Akahira J, Higashimoto M, Mashiko M, *et al.* (2008). Clinicopathological significance of circadian rhythm-related gene expression levels in patients with epithelial ovarian cancer. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica* **87**(10): 1060-1070.
- Tompkins RK, Thomas D, Wile A, Longmire WP, Jr. (1981). Prognostic factors in bile duct carcinoma: analysis of 96 cases. *Annals of surgery* **194**(4): 447-457.
- Touitou Y (2001). Human aging and melatonin. Clinical relevance. *Experimental gerontology* **36**(7): 1083-1100.
- Touitou Y, Levi F, Bogdan A, Benavides M, Bailleul F, Misset JL (1995). Rhythm alteration in patients with metastatic breast cancer and poor prognostic factors. *Journal of cancer research and clinical oncology* **121**(3): 181-188.
- Touitou Y, Selmaoui B, Zhao ZY, San Martin M, Bogdan A (1996). [Melatonin and biological rhythms: various aspects in human physiopathology]. *Annales pharmaceutiques francaises* **54**(6): 241-250.
- Turek FW (1985). Circadian neural rhythms in mammals. *Annual review of physiology* **47**: 49-64.
- Ueda HR (2007). Systems biology of mammalian circadian clocks. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **72**: 365-380.
- Ukai H, Ueda HR (2010). Systems biology of mammalian circadian clocks. *Annual review of physiology* **72**: 579-603.
- van den Heiligenberg S, Depres-Brummer P, Barbason H, Claustrat B, Reynes M, Levi F (1999). The tumor promoting effect of constant light exposure on diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Life sciences* **64**(26): 2523-2534.
- van der Horst GT, Muijtjens M, Kobayashi K, Takano R, Kanno S, Takao M, *et al.* (1999). Mammalian *Cry1* and *Cry2* are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* **398**(6728): 627-630.
- Verna L, Whysner J, Williams GM (1996). N-nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. *Pharmacology & therapeutics* **71**(1-2): 57-81.
- Viitala P, Posti K, Lindfors A, Pelkonen O, Raunio H (2001). cAMP mediated upregulation of CYP2A5 in mouse hepatocytes. *Biochemical and biophysical research communications* **280**(3): 761-767.
- Vinogradova IA, Anisimov VN, Bukalev AV, Ilyukha VA, Khizhkin EA, Lotosh TA, *et al.* (2010). Circadian disruption induced by light-at-night accelerates aging and promotes tumorigenesis in young but not in old rats. *Aging* **2**(2): 82-92.

Vinogradova IA, Anisimov VN, Bukalev AV, Semenchenko AV, Zabezhinski MA (2009). Circadian disruption induced by light-at-night accelerates aging and promotes tumorigenesis in rats. *Aging* **1**(10): 855-865.

Vinogradova IA, Bukalev AV, Zabezhinskii MA, Semenchenko AV, Anisimov VN (2008). [Effect of light regimens and melatonin on homeostasis, life span and spontaneous tumorigenesis in male rats]. *Voprosy onkologii* **54**(1): 70-77.

Viswanathan AN, Hankinson SE, Schernhammer ES (2007). Night shift work and the risk of endometrial cancer. *Cancer research* **67**(21): 10618-10622.

Vitaterna MH, King DP, Chang AM, Kornhauser JM, Lowrey PL, McDonald JD, *et al.* (1994). Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior. *Science* **264**(5159): 719-725.

Vitaterna MH, Selby CP, Todo T, Niwa H, Thompson C, Fruechte EM, *et al.* (1999). Differential regulation of mammalian period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**(21): 12114-12119.

Vollmers C, Gill S, DiTacchio L, Pulivarthy SR, Le HD, Panda S (2009). Time of feeding and the intrinsic circadian clock drive rhythms in hepatic gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**(50): 21453-21458.

Vollmers C, Schmitz RJ, Nathanson J, Yeo G, Ecker JR, Panda S (2012). Circadian oscillations of protein-coding and regulatory RNAs in a highly dynamic mammalian liver epigenome. *Cell metabolism* **16**(6): 833-845.

Wang F, Yeung KL, Chan WC, Kwok CC, Leung SL, Wu C, *et al.* (2013). A meta-analysis on dose-response relationship between night shift work and the risk of breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **24**(11): 2724-2732.

Wang Y, Hua L, Lu C, Chen Z (2011). Expression of circadian clock gene human Period2 (hPer2) in human colorectal carcinoma. *World J Surg Oncol* **9**: 166.

Waterhouse J, Reilly T, Atkinson G (1997). Jet-lag. *Lancet* **350**(9091): 1611-1616.

Waterhouse J, Reilly T, Atkinson G, Edwards B (2007). Jet lag: trends and coping strategies. *Lancet* **369**(9567): 1117-1129.

Weibel L, Follenius M, Brandenberger G (1999). [Biologic rhythms: their changes in night-shift workers]. *Presse medicale* **28**(5): 252-258.

Weitzman ED, Czeisler CA, Coleman RM, Spielman AJ, Zimmerman JC, Dement W, *et al.* (1981). Delayed sleep phase syndrome. A chronobiological disorder with sleep-onset insomnia. *Archives of general psychiatry* **38**(7): 737-746.

Welsh DK, Logothetis DE, Meister M, Reppert SM (1995). Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* **14**(4): 697-706.

Welsh DK, Takahashi JS, Kay SA (2010). Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annual review of physiology* **72**: 551-577.

Welsh DK, Yoo SH, Liu AC, Takahashi JS, Kay SA (2004). Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of clock gene expression. *Current biology : CB* **14**(24): 2289-2295.

Winter SL, Bosnoyan-Collins L, Pinnaduwa D, Andrulis IL (2007). Expression of the circadian clock genes Per1 and Per2 in sporadic and familial breast tumors. *Neoplasia* **9**(10): 797-800.

Wise J (2009). Danish night shift workers with breast cancer awarded compensation. *Bmj* **338**: b1152.

Wolff G, Duncan MJ, Esser KA (2013). Chronic phase advance alters circadian physiological rhythms and peripheral molecular clocks. *Journal of applied physiology* **115**(3): 373-382.

Wood PA, Yang X, Taber A, Oh EY, Ansell C, Ayers SE, *et al.* (2008). Period 2 mutation accelerates ApcMin/+ tumorigenesis. *Molecular cancer research : MCR* **6**(11): 1786-1793.

Wu HS, Davis JE, Natavio T (2012a). Fatigue and disrupted sleep-wake patterns in patients with cancer: a shared mechanism. *Clinical journal of oncology nursing* **16**(2): E56-68.

Wu M, Zeng J, Chen Y, Zeng Z, Zhang J, Cai Y, *et al.* (2012b). Experimental chronic jet lag promotes growth and lung metastasis of Lewis lung carcinoma in C57BL/6 mice. *Oncology reports* **27**(5): 1417-1428.

Wu MW, Li XM, Xian LJ, Levi F (2004). Effects of meal timing on tumor progression in mice. *Life sciences* **75**(10): 1181-1193.

Xia HC, Niu ZF, Ma H, Cao SZ, Hao SC, Liu ZT, *et al.* (2010). Deregulated expression of the Per1 and Per2 in human gliomas. *The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques* **37**(3): 365-370.

Xiang S, Coffelt SB, Mao L, Yuan L, Cheng Q, Hill SM (2008). Period-2: a tumor suppressor gene in breast cancer. *Journal of circadian rhythms* **6**: 4.

Xu X, Kobayashi S, Qiao W, Li C, Xiao C, Radaeva S, *et al.* (2006). Induction of intrahepatic cholangiocellular carcinoma by liver-specific disruption of Smad4 and Pten in mice. *The Journal of clinical investigation* **116**(7): 1843-1852.

Xu YQ, Zhang D, Jin T, Cai DJ, Wu Q, Lu Y, *et al.* (2012). Diurnal variation of hepatic antioxidant gene expression in mice. *PLoS One* **7**(8): e44237.

Yagita K, Tamanini F, van Der Horst GT, Okamura H (2001). Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts. *Science* **292**(5515): 278-281.

Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, *et al.* (2000). Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* **288**(5466): 682-685.

Yang H, Li TW, Peng J, Tang X, Ko KS, Xia M, *et al.* (2011). A mouse model of cholestasis-associated cholangiocarcinoma and transcription factors involved in progression. *Gastroenterology* **141**(1): 378-388, 388 e371-374.

Yang MY, Chang JG, Lin PM, Tang KP, Chen YH, Lin HY, *et al.* (2006). Downregulation of circadian clock genes in chronic myeloid leukemia: alternative methylation pattern of hPER3. *Cancer science* **97**(12): 1298-1307.

Yang S, Liu A, Weidenhammer A, Cooksey RC, McClain D, Kim MK, *et al.* (2009). The role of mPer2 clock gene in glucocorticoid and feeding rhythms. *Endocrinology* **150**(5): 2153-2160.

Yang WS, Stockwell BR (2008). Inhibition of casein kinase 1-epsilon induces cancer-cell-selective, PERIOD2-dependent growth arrest. *Genome biology* **9**(6): R92.

Yasuniwa Y, Izumi H, Wang KY, Shimajiri S, Sasaguri Y, Kawai K, *et al.* (2010). Circadian disruption accelerates tumor growth and angiogenesis through a Wnt signaling pathway. *PLoS one* **5**(12): e15330.

Yoo SH, Yamazaki S, Lowrey PL, Shimomura K, Ko CH, Buhr ED, *et al.* (2004). PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(15): 5339-5346.

Zabron A, Edwards RJ, Khan SA (2013). The challenge of cholangiocarcinoma: dissecting the molecular mechanisms of an insidious cancer. *Disease models & mechanisms* **6**(2): 281-292.

Zeh HJ, Lotze MT (2005). Addicted to death: invasive cancer and the immune response to unscheduled cell death. *J Immunother* **28**(1): 1-9.

Zeng ZL, Wu MW, Sun J, Sun YL, Cai YC, Huang YJ, *et al.* (2010). Effects of the biological clock gene Bmal1 on tumour growth and anti-cancer drug activity. *Journal of biochemistry* **148**(3): 319-326.

Zhang EE, Kay SA (2010). Clocks not winding down: unravelling circadian networks. *Nature reviews. Molecular cell biology* **11**(11): 764-776.

Zhang X, Xu HJ, Murakami Y, Sachse R, Yashima K, Hirohashi S, *et al.* (1994). Deletions of chromosome 13q, mutations in Retinoblastoma 1, and retinoblastoma protein state in human hepatocellular carcinoma. *Cancer research* **54**(15): 4177-4182.

Zhang Z, Lai GH, Sirica AE (2004). Celecoxib-induced apoptosis in rat cholangiocarcinoma cells mediated by Akt inactivation and Bax translocation. *Hepatology* **39**(4): 1028-1037.

Zheng B, Albrecht U, Kaasik K, Sage M, Lu W, Vaishnav S, *et al.* (2001). Nonredundant roles of the mPer1 and mPer2 genes in the mammalian circadian clock. *Cell* **105**(5): 683-694.

Zheng B, Larkin DW, Albrecht U, Sun ZS, Sage M, Eichele G, *et al.* (1999). The mPer2 gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock. *Nature* **400**(6740): 169-173.

Zhou F, He X, Liu H, Zhu Y, Jin T, Chen C, *et al.* (2012). Functional polymorphisms of circadian positive feedback regulation genes and clinical outcome of Chinese patients with resected colorectal cancer. *Cancer* **118**(4): 937-946.

Zhu Y, Leaderer D, Guss C, Brown HN, Zhang Y, Boyle P, *et al.* (2007). Ala394Thr polymorphism in the clock gene NPAS2: a circadian modifier for the risk of non-Hodgkin's lymphoma. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **120**(2): 432-435.

Zhu Y, Stevens RG, Hoffman AE, Fitzgerald LM, Kwon EM, Ostrander EA, *et al.* (2009). Testing the circadian gene hypothesis in prostate cancer: a population-based case-control study. *Cancer research* **69**(24): 9315-9322.

IX. LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure 1 : Paramètres caractérisant un rythme biologique	17
Figure 2 : Exemple d'enregistrement de l'activité locomotrice d'une souris d'activité nocturne	19
Figure 3 : Schéma d'organisation du système circadien	20
Figure 4 : Les noyaux suprachiasmatiques.....	21
Figure 5 : Organisation moléculaire de l'horloge circadienne chez les mammifères	25
Figure 6 : Enregistrements en temps réel de la bioluminescence émise par divers tissus de souris mutantes PER2-Luciférase.....	26
Figure 7 : Représentation schématique des voies de synchronisation des NSC et des différents biomarqueurs impliqués dans la coordination des horloges périphériques ..	28
Figure 8 : Rythme circadien de la température centrale enregistré chez la souris.	29
Figure 9 : Rythme de la température corporelle centrale chez l'homme	30
Figure 10 : Enregistrement téléométriques du rythme d'activité-repos chez la souris	30
Figure 11 : Voie de la biosynthèse de la mélatonine par la glande pinéale	31
Figure 12 : Rythme circadien de la mélatonine en fonction de l'heure du jour	32
Figure 13 : Voie de la biosynthèse de la corticostérone.....	33
Figure 14 : Rythme circadien de la corticostérone plasmatique chez les souris Balb/c en fonction de ZT du temps	34
Figure 15 : Double représentation du rythme d'activité-repos d'un patient atteint de syndrome d'avance de phase du sommeil.....	38
Figure 16 : Rythme de la mélatonine circulante chez des sujets contrôles et chez un sujet atteint de syndrome d'avance de phase du sommeil	38
Figure 17 : Rythme circadien de la mélatonine circulante chez des sujets contrôles et un sujet atteint de syndrome de retard de phase du sommeil.....	39
Figure 18 : Effets de la destruction par électrocoagulation sous repérage stéréotaxique des noyaux suprachiasmatiques sur trois biomarqueurs circadiens physiologiques chez des souris ♂ B6D2F1	41
Figure 19 : Disruption circadienne des rythmes physiologiques et moléculaires chez des souris exposées à un décalage horaire chronique (DHC).....	43

Figure 20 : Unité structurelle et fonctionnelle du foie humain	49
Figure 21 : Trois principales voies de signalisation identifiées dans le carcinome hépatocellulaire	56
Figure 22 : Transformation de la diéthylnitrosamine dans le foie par les cytochromes P450 et formation d'adduits à l'ADN	59
Figure 23 : Transformation de DEN dans le foie et induction du CHC	60
Figure 24 : Croissance tumorale chez des souris témoins (NSC+) ou après destruction des noyaux suprachiasmatiques (NSC-)	67
Figure 25 : Perte relative de poids corporel chez les souris sauvages et <i>Per2^{m/m}</i> exposées à la DEN avec alimentation <i>ad libitum</i> (rouge), ou DEN associée à l'alimentation programmée (orange) ou à la dexaméthasone avec alimentation <i>ad libitum</i> (violet).....	171
Figure 26 : Expression de gènes de l'horloge circadienne <i>Clock</i> , <i>Bmal1</i> , <i>Rev-erba</i> , <i>Cry1</i> , et <i>Cry2</i> dans le foie des souris sauvages (gauche) et <i>Per2^{m/m}</i> (droite) exposées à la DEN dans deux conditions d'alimentation : <i>ad libitum</i> (rouge) ou programmée (orange).	173
Figure 27 : Expression de gènes de la prolifération, du cycle cellulaire et de l'apoptose dans le foie de souris sauvages (gauche) et <i>Per2^{m/m}</i> (droite) exposées à la DEN dans deux conditions d'alimentation : <i>ad libitum</i> (rouge) ou programmée (orange).....	175
Figure 28 : Concentrations protéiques hépatique d'IL-6 (A) et de TNF- α (B) chez des souris sauvages (gauche) et <i>Per2^{m/m}</i> (droite) exposées à la DEN dans deux conditions d'alimentation : <i>ad libitum</i> (rouge) ou programmée (orange).....	176
Figure 29 : Expression circadienne de gènes de l'horloge <i>Clock</i> , <i>Bmal1</i> , <i>Rev-erba</i> , <i>Cry1</i> , et <i>Cry2</i> dans le foie des souris sauvages (gauche) et <i>Per2^{m/m}</i> (droite) exposées à la DEN seule (rouge) ou associée à la dexaméthasone (violet).....	178
Figure 30 : Expression de gènes de la prolifération, du cycle cellulaire et de l'apoptose dans le foie de souris sauvages (gauche) et <i>Per2^{m/m}</i> (droite) exposées à la DEN seule (rouge) ou associée à la dexaméthasone (violet)	180
Figure 31 : Concentrations protéiques hépatique d'IL-6 (A) et de TNF- α (B) chez des souris sauvages (gauche) et <i>Per2^{m/m}</i> (droite) exposées à la DEN avec alimentation <i>ad libitum</i> (rouge) ou associée à la dexaméthasone (violet)	181
Figure 32 : Variations de l'amplitude et de la phase de la température corporelle chez les souris sauvages (A) et <i>Per2^{m/m}</i> (B) exposées à la DEN seule (rouge), ou associée à l'alimentation programmée (orange) ou à la dexaméthasone (violet).....	183
Figure 33 : Variations de l'amplitude et de l'acrophase de l'activité-repos chez les souris sauvages (A) et <i>Per2^{m/m}</i> (B) exposées à la DEN seule (rouge), ou associée à l'alimentation programmée (orange) ou à la dexaméthasone (violet)	185

Figure 34: Rythme de la sécrétion de corticostérone chez des souris sauvages et <i>Per2^{m/m}</i> exposées à la DEN dans deux conditions d'alimentation : <i>ad libitum</i> (rouge) et programmée (orange)	186
Figure 35: Rythme de la sécrétion de corticostérone chez des souris sauvages et <i>Per2^{m/m}</i> exposées à la DEN seules (rouge) ou associée à la dexaméthasone (violet).....	187
Figure 36 : Perte maximale de poids corporel en fonction de l'heure d'administration de la diéthylnitrosamine chez des souris ♀ sauvages et <i>Per2^{m/m}</i>	190
Figure 37 : Taux de mortalité en fonction de l'heure d'administration chez des souris ♀ sauvages et <i>Per2^{m/m}</i> exposées à la diéthylnitrosamine	191
Figure 38 : Concentrations sériques d'ALAT et d'ASAT chez des souris ♀ sauvages et <i>Per2^{m/m}</i> exposées à la diéthylnitrosamine	192
Figure 39 : Caractéristiques principales du cancer selon <i>Hanahan et Weinberg (2011)</i> , et relations avec les principaux gènes et protéines dérégulés dans le modèle de la cancérogénèse hépatique	222
Tableau 1 : Principaux rythmes biologiques	18
Tableau 2 : Gènes de l'horloge génétique circadienne des mammifères	23
Tableau 3 : Dérégulation des gènes circadiens dans les cancers humains	66
Tableau 4 : tableau récapitulatif de la conduite générale de thèse	82
Tableau 5 : Principaux conditions expérimentales et résultats trouvés chez les souris <i>Per2^{m/m}</i> et <i>Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}</i>	226