



HAL
open science

Analyse mathématique de la dynamique du cycle et de la synchronisation des horloges circadiennes périphériques des mammifères

Odile Burckard

► **To cite this version:**

Odile Burckard. Analyse mathématique de la dynamique du cycle et de la synchronisation des horloges circadiennes périphériques des mammifères. Optimisation et contrôle [math.OC]. Université Côte d'Azur, 2024. Français. NNT : 2024COAZ4046 . tel-04942599

HAL Id: tel-04942599

<https://theses.hal.science/tel-04942599v1>

Submitted on 12 Feb 2025

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

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

THÈSE DE DOCTORAT

Analyse mathématique de la dynamique du cycle et de la synchronisation des horloges circadiennes périphériques des mammifères

Odile Burckard

Centre Inria d'Université Côte d'Azur, équipe projet MACBES

**Présentée en vue de l'obtention du
grade de docteur en** Automatique,
Traitement du Signal
et des Images d'Université Côte
d'Azur

Dirigée par : Madalena Chaves

Soutenue le : 27 novembre 2024

Devant le jury, composé de :

Annabelle Ballesta, Junior PI - Chargée de recherche, Institut
Curie-INSERM U900

Madalena Chaves, Directrice de recherche, Centre Inria d'Université
Côte d'Azur

Franck Delaunay, Professeur, Institut de Biologie Valrose (iBV)

Etienne Farcot, Professeur associé, University of Nottingham

Didier Gonze, Chargé de Cours, Université Libre de Bruxelles

Jean-Luc Gouzé, Directeur de recherche, Centre Inria d'Université
Côte d'Azur

Elisabeth Remy, Directrice de recherche, Institut de Mathématiques
de Marseille

Inria

Analyse mathématique de la dynamique du cycle et de la synchronisation des horloges circadiennes périphériques des mammifères

Jury :

Présidente du jury

Elisabeth Remy, Directrice de recherche, Institut de Mathématiques de Marseille

Directrice de thèse

Madalena Chaves, Directrice de recherche, Centre Inria d'Université Côte d'Azur

Rapporteurs

Etienne Farcot, Professeur associé, University of Nottingham

Didier Gonze, Chargé de Cours, Université Libre de Bruxelles

Examineurs

Annabelle Ballesta, Junior PI - Chargée de recherche, Institut Curie-INSERM U900

Franck Delaunay, Professeur, Institut de Biologie Valrose (iBV)

Jean-Luc Gouzé, Directeur de recherche, Centre Inria d'Université Côte d'Azur

Analyse mathématique de la dynamique du cycle et de la synchronisation des horloges circadiennes périphériques des mammifères

Odile Burckard

Résumé

Les horloges circadiennes, présentes dans les cellules de pratiquement tous les êtres vivants, sont essentielles dans la régulation rythmique de nombreux processus biologiques. Le bon fonctionnement des organismes dépend de la cohérence de phase de ces oscillateurs génétiques. Pourtant, chez les mammifères, les mécanismes sous-jacents à la synchronisation des horloges périphériques demeurent méconnus. Cette thèse se concentre sur l'étude de la synchronisation des horloges circadiennes périphériques des mammifères et sur l'analyse de la dynamique du cycle circadien. Dans un premier temps, nous supposons que les horloges périphériques sont capables d'assurer leur synchronisation grâce à des mécanismes de couplage, comparables à ceux observés entre les cellules de l'horloge centrale. Nous étudions cette hypothèse numériquement, à l'aide d'un modèle d'un réseau d'horloges périphériques couplées, construit avec des équations différentielles ordinaires. Nos simulations nous permettent d'identifier des facteurs favorisant la synchronisation des oscillateurs circadiens.

Dans un second temps, nous nous focalisons sur la dynamique d'un unique cycle circadien, que nous caractérisons théoriquement via la construction d'un modèle affine par morceaux approximant un modèle continu construit avec des termes d'action de masse. Notre approche repose sur l'identification d'une séquence de transitions périodique entre les régions de l'espace de phases discrétisé du modèle continu et sur le développement d'un algorithme calculant des valeurs réelles de seuils qui garantissent une trajectoire périodique aux oscillateurs du modèle affine par morceaux et la reproduction des principales propriétés qualitatives des cycles circadiens.

Nous proposons ensuite une méthode générale et automatisée pour caractériser la dynamique de n'importe quel cycle circadien dont les séries temporelles des (complexes de) protéines CLOCK:BMAL1, REV-ERB et PER:CRY sont connues. Notre méthode sert d'outil pour tester et comparer les dynamiques de différents cycles circadiens, tout en mettant en évidence des propriétés qu'ils partagent. Ces méthodes nous permettent finalement de mieux comprendre l'influence du couplage sur la dynamique des cycles d'un réseau d'horloges périphériques.

Mots clés : horloges circadiennes périphériques, synchronisation, dynamique du cycle, système affine par morceaux, caractérisation du cycle circadien, couplage, méthode computationnelle

Mathematical analysis of cycle dynamics and synchronization of mammalian peripheral circadian clocks

Odile Burckard

Abstract

Circadian clocks, present in the cells of virtually all living beings, are essential for the rhythmic regulation of many biological processes. The healthy functioning of organisms depends on the phase coherence of these genetic oscillators. However, in mammals, the mechanisms underlying the synchronization of peripheral clocks remain poorly understood. This thesis focuses on the study of the synchronization of mammalian peripheral circadian clocks and on the analysis of circadian cycle dynamics. First, we hypothesize that peripheral clocks can achieve synchronization through coupling mechanisms, comparable to those observed between central clock cells. We investigate this hypothesis numerically, using a model of a network of coupled peripheral clocks, constructed with ordinary differential equations. Our simulations lead to the identification of factors promoting the synchronization of circadian oscillators.

Secondly, we focus on the dynamics of a single circadian cycle, which we characterize theoretically through the construction of a piecewise affine model approximating a continuous model including mass action terms. Our approach is based on the identification of a sequence of periodic transitions between regions of the discretized phase space of the continuous model, and on the development of an algorithm generating real threshold values that guarantee a periodic trajectory for the oscillators of the piecewise affine model and the reproduction of the main qualitative properties of circadian cycles.

We then propose a general and automated method for characterizing the behaviour of any circadian cycle whose time series of CLOCK:BMAL1, REV-ERB and PER:CRY protein (complexes) are known. Our method provides a benchmark for testing and comparing the dynamics of different circadian cycles, while highlighting properties they share. Finally, these methods allow us to better understand the influence of coupling on the cycle dynamics of a network of peripheral clocks.

Keywords : peripheral circadian clocks, synchronization, cycle dynamic, piecewise affine system, circadian cycle characterization, coupling, computational method

Remerciements

Au travers de ces quelques mots, je souhaiterais remercier sincèrement toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à rendre ces trois années de thèse (et de stage) inoubliables.

Mes remerciements vont en priorité à Madalena, ma directrice de thèse. Madalena, je te suis profondément reconnaissante du temps que tu as pris pour moi, pour toutes les discussions, les relectures constructives de mes manuscrits, pour ta disponibilité, ta bienveillance, et tes encouragements. Ta confiance et tes conseils m'ont permis d'acquérir une certaine autonomie pour explorer et développer mes idées par moi-même. C'est un réel plaisir d'avoir pu travailler avec toi ces trois dernières années.

Je tiens également à remercier chaleureusement Franck Delaunay, pour toutes les connaissances biologiques que tu as pu m'apporter, mais également pour avoir accepté de collaborer, de relire mes articles et de faire partie de mon jury. C'est une grande chance que de pouvoir discuter, en tant que "modélisatrice", avec un biologiste. J'en profite pour remercier les autres membres de l'Institut de Biologie de Valrose, Michèle et Inès, pour vos contributions scientifiques à mes papiers. Mes remerciements se portent également aux autres membres du projet InSync, à Paris, à Laurent, Mathieu et Anastasia.

Je remercie également Etienne Farcot et Didier Gonze, mes rapporteurs de thèse, pour la lecture de mon manuscrit. Vos retours m'ont, d'une part, permis d'apporter des précisions à ce manuscrit et ont, d'autre part, permis d'envisager de nouvelles pistes de recherches. Mes remerciements vont également à Elisabeth Rémy, pour avoir accepté d'être présidente de mon jury de thèse, ainsi qu'à Annabelle Ballesta et Jean-Luc Gouzé, pour votre suivi de ma thèse au travers du CSI, puis pour avoir accepté le rôle d'examinatrice/examineur lors de ma soutenance.

Cette thèse n'aurait pas été possible sans le Centre Inria d'Université Côte d'Azur, qui a financé ma thèse et m'a apporté un cadre de travail idéal, et que je remercie vivement.

En outre, ces trois années de thèse ont été marquées par une multitude de belles rencontres.

Remerciements spéciaux à Ignacio et David pour nos pauses café du matin au soleil (parfois un peu trop tôt), pour nos aventures (qui ne font que commencer) et pour votre bonne humeur tout simplement ; à Marielle, Sister de thèse, pour ton accueil, ta motivation, et tous les moments partagés au bureau ; et à Ben, petit (grand ?) frère de sujet de thèse, pour toutes les discussions circadiennes et autres que nous ayons pu avoir.

Immense merci à tous les autres membres de la grande équipe "McCore et al.", de ceux qui m'ont accueillie lorsque j'étais petite stagiaire, en passant par ceux qui ne sont restés que quelques mois, à ceux qui étaient présents au dernier jour de thèse. Au risque d'en oublier, merci à Agustin, Nicolas, Bruno, Clotilde, Yan, Liudi, Jan-Luka, Azouaou, Felipe, Lucile, Ki-

lian, Juan-Carlos, Jineth, Francesca, Alesia, Nicolás, Ali, Joseph, Hannah, Yanis, Frank, Adel, Antonin, Javier, Pauline, Giada, et à tous les autres croisés au détour d'un couloir, au café, à la cantine, ou à vélo.. ! Merci à vous pour votre enthousiasme, votre bonne humeur et pour tous les beaux moments partagés, vous avoir autour a été inspirant et a rendu cette expérience unique.

Merci également à toutes les personnes rencontrées lors d'écoles ou de conférences, en Crête, à Porquerolles, au Luxembourg ou encore à Paris pour avoir enrichi ces voyages.

En dehors du cadre de la thèse, mes remerciements vont à tous ceux qui ont contribué à rendre la vie à la Côte d'Azur unique. Mes pensées vont en particulier aux grimpeurs assidus du COV, Cyril, Gildas, Adri et Corentin et à tous les autres croisés à la salle, ainsi qu'à tous ceux qui m'ont accompagnée dans mes péripéties en falaise, Guillaume, George, Kiki, Attila, Vadim, Véro, Yann, Nico, Côme... Merci pour ces belles aventures !

Je terminerai par remercier profondément mes parents, d'avoir toujours été présents pour moi, et de m'avoir encouragée dans mes différents projets. Merci aussi à Soline, Irène et Emile, pour tous les bons moments partagés, et, malgré la distance augmentant au fil des années, d'être toujours là.

Table des matières

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Introduction | 1 |
| 1.1 | Les rythmes circadiens, de leur découverte aux connaissances actuelles | 2 |
| 1.2 | Modéliser la dynamique de l’horloge circadienne | 9 |
| 1.3 | Plan du manuscrit | 20 |
| 2 | Synchronisation d’un réseau d’horloges circadiennes périphériques couplées | 23 |
| 2.1 | Modèle de couplage entre horloges circadiennes périphériques | 24 |
| 2.2 | Synchronisation d’un système de deux horloges circadiennes couplées | 26 |
| 2.3 | Synchronisation d’un cluster d’horloges circadiennes en réponse à un régime alimentaire spécifique | 31 |
| 2.4 | Conclusion et discussion | 39 |
| 3 | Analytic solutions for the circadian oscillator characterize cycle dynamics and its robustness | 43 |
| 3.1 | Introduction | 43 |
| 3.2 | Numerical and mathematical characterization of circadian cycle | 46 |
| 3.3 | A piecewise affine clock model | 55 |
| 3.4 | Continuous and PWA models share qualitative properties | 60 |
| 3.5 | Cycle robustness : quantitative analysis and critical elements | 63 |
| 3.6 | Discussion | 69 |
| 4 | Benchmark for quantitative characterization of circadian clock cycles | 71 |
| 4.1 | Introduction | 71 |
| 4.2 | Characterization of circadian cycles | 74 |
| 4.3 | Cycle segmentation as a benchmark for circadian clock models | 78 |
| 4.4 | Knockdown impacts on oscillator dynamics | 84 |
| 4.5 | Discussion | 88 |
| 5 | Caractérisation des cycles d’horloges circadiennes couplées | 90 |
| 5.1 | Étude de l’influence du couplage sur la dynamique de deux oscillateurs circadiens | 90 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 5.2 | Synchronisation de clusters d'oscillateurs | 98 |
| 5.3 | Conclusion | 102 |
| 6 | Conclusion générale et Perspectives | 104 |
| 6.1 | Conclusion générale | 104 |
| 6.2 | Perspectives | 106 |
| A | Informations supplémentaires du Chapitre 2 | 110 |
| B | Supplementary Information of Chapter 3 | 112 |
| B.1 | Analytical solutions of the piecewise affine model | 112 |
| B.2 | Illustration of Assumptions A.6-A.8 | 114 |
| B.3 | Proofs of Propositions 1 to 4 | 115 |
| B.4 | Transitions from refuted stages | 117 |
| C | Supplementary Information of Chapter 4 | 122 |

Table des figures

| | | |
|-----|--|----|
| 1.1 | Schéma des mécanismes de base de l'horloge circadienne des souris au sein d'une unique cellule. Les ARNm sont écrits en minuscules et leurs protéines correspondantes en majuscule et représentées dans des ellipses. Le grand oval à fond bleu clair délimite le noyau de la cellule. Les flèches pleines représentent des interactions d'activation et les flèches à tête plate des interactions d'inhibition. Les flèches en pointillés serrés représentent la formation des protéines depuis leurs ARNm associés et les flèches en pointillés espacés le déplacement des protéines depuis le cytoplasme dans le noyau. | 4 |
| 1.2 | Fonctions de Hill croissantes pour différents degrés de coopérativité (courbes pleines), et approximation par une fonction <i>step</i> croissante (courbe en pointillés noirs). | 12 |
| 1.3 | Domaines réguliers divisant l'espace de phases du modèle 1.4. Les points focaux de chaque domaine sont indiqués par les cercles pleins bleus. Les flèches rouges représentent les transitions entre chaque domaine. | 15 |
| 1.4 | Séries temporelles du modèle réduit de l'horloge circadienne proposé par Almeida <i>et al.</i> [3]. Ce modèle reproduit certaines caractéristiques des horloges circadiennes telles que des oscillations périodiques, une opposition de phase entre CLOCK:BMAL1 et PER:CRY, ou encore l'ordre des pics de protéines CLOCK:BMAL1, REV-ERB puis PER:CRY. | 17 |
| 2.1 | Schéma des interactions entre les entités de deux horloges circadiennes couplées, tel que décrit par les Equations 2.1. Les flèches pleines représentent une activation, les flèches à tête plate une inhibition et les flèches en pointillés le couplage. Le couplage est diffusif, et via le complexe PER:CRY. | 25 |
| 2.2 | Séries temporelles et projection sur le plan (PER:CRY,REV-ERB) des portraits de phase de deux oscillateurs couplés, avec $\varepsilon_1 = 1$ et $\varepsilon_2 = 0.6$ et (a,c) $k = 0.04$ et (b,d) $k = 0.3$ | 26 |
| 2.3 | Maximum de la différence totale $ r(t) = \sqrt{r_B(t)^2 + r_D(t)^2 + r_R(t)^2 + r_P(t)^2}$ en fonction de ε , pour un système de deux oscillateurs couplés (2.1). Les paramètres sont ceux listés dans 2.2. | 27 |

| | | |
|------|---|----|
| 2.4 | (a,b) Périodes de l'oscillateur 1 ($\varepsilon_1 = 1$, ligne pleine) et de l'oscillateur 2 ($\varepsilon_2 = \varepsilon$, ligne pointillée) lorsqu'ils ne sont pas couplés (bleu), ou couplés avec $k = 0.04$ (orange, figure (a) uniquement), $k = 0.09$ (rouge) ou $k = 0.3$ (vert, figure (b) uniquement). La courbe noire de (b) représente la moyenne des périodes des deux oscillateurs lorsqu'ils ne sont pas couplés. | 28 |
| 2.5 | (a) Différence de phase entre le pic (valeur maximale) de P de l'oscillateur 2 ($\varepsilon \neq 1$) par rapport à celui l'oscillateur 1 ($\varepsilon = 1$) pour des oscillateurs synchronisés en périodes, avec un couplage de $k = 0.04$ en orange, $k = 0.09$ en rouge et $k = 0.3$ en vert. (b) Différences de phase entre les valeurs maximales (courbes pleines) et minimales (courbes en pointillés) de B , R et P de l'oscillateur 2 par rapport à l'oscillateur 1, lorsqu'ils sont couplés avec $k = 0.09$ | 29 |
| 2.6 | Nombre de cycles nécessaires pour (a) désynchroniser ou (b) synchroniser deux oscillateurs selon plusieurs différences de phase initiales, suite au retrait ou à l'ajout d'un terme de couplage (la force de couplage est $k = 0.04$ pour les courbes fines et $k = 0.09$ pour celles épaisses). | 30 |
| 2.7 | Schéma représentant l'organisation au sein du foie, venant de [14]. | 33 |
| 2.8 | Différentes topologies de communication intercellulaires envisagées. (a) All-to-all (b) Etoile (c) Anneau (d) Chaîne (e) Rangées. Chaque cercle représente une cellule communiquant de manière directe et diffusive avec une ou plusieurs autres cellules, tel que symbolisé par chaque flèche. | 33 |
| 2.9 | Concentration moyenne de PER:CRY au cours du temps selon un régime alimentaire à volonté (bandes noires) ou restreint (bandes blanches), au sein d'un réseau de huit cellules avec différentes périodes initiales ($T_1 = 24.11h$, $T_2 = 23.48h$, $T_3 = 23.55h$, $T_4 = 26.29h$, $T_5 = 26.17h$, $T_6 = 26.15h$, $T_7 = 24.95h$ et $T_8 = 24.58h$). (a) Sans couplage et (b) topologie en étoile avec $k = 0.04$ | 35 |
| 2.10 | Impact du régime alimentaire et de la force de couplage sur les oscillations d'un réseau d'horloges organisées en étoile. Les pointillés noirs indiquent le moment du pulse. | 36 |
| 2.11 | FFT des séries temporelles de la moyenne de PER:CRY d'un réseau de huit horloges couplées selon 5 schémas topologiques différents, en réponse à un régime de nourriture à volonté ($I(t) = 2$, constant) et un restreint ($I(t) = 13$ par pulse de 2h toutes les 24h), en présence ou non de couplage (courbes bleues, oranges et vertes pour $k = 0$, $k = 0.04$ et $k = 0.3$ respectivement). | 38 |
| 2.12 | Amplitude du pic principal des FFT de séries temporelles de réseaux de huit horloges selon différentes topologies, forces de couplage, régimes alimentaires et différentes valeurs d'insuline. Observations similaires à celles de la Figure 2.11, mais pour plus de valeurs de paramètres. | 40 |
| 3.1 | Protein concentrations over time and $\gamma_B BP$ and $f(R)$ curves. | 47 |

| | | |
|-----|---|----|
| 3.2 | Protein concentrations over time and stage durations, for the piecewise affine model. The stages are represented by the black straight lines. | 50 |
| 3.3 | Ideal physiological order of stages followed by an oscillator as it performs one cycle | 54 |
| 3.4 | Network representation of the circadian clock ODE model. The two negative feedback loops are highlighted by blue and red backgrounds. Activating interactions are shown by green arrows, and are described by linear terms in the model. CLOCK:BMAL1 inhibition by REV :ERB is represented by a red flat-head arrow and is described, in the ODE model, by the decreasing Hill function $h^-(R) = \frac{k_{Rr}^4}{k_{Rr}^4 + R^4}$. Complex formation of PER:CRY and CLOCK:BMAL1 is shown by blue arrows and is described, in the model, by a mass action term, $g(B, P) = \gamma_B BP$. The piecewise affine model is based on this ODE model and has the same basic structure. The nonlinear functions f and g are approximated by affine terms whose definitions depend on the position of variables relative to their thresholds. See Table 3.2 for more details. | 55 |
| 3.5 | Oscillations and cycle segmentation for (a) one oscillator generated by Algorithm 1 with $\delta = 12.55$, $B_{high} = 0.10$, $R_{int} = 45.21$, $P_{low} = 71.28$ and $P_{high} = 290.55$ and (b) for the continuous model (3.1). | 63 |
| 3.6 | Phase portrait projection on the planes : (a) B and P and (b) R and P for the continuous model (dashed black line) and for the PWA model (with different threshold parameters and one color stands for one δ value). Curves are normalized between 0 and 1 for comparison. | 64 |
| 3.7 | (a),(b) Sets of threshold values computed by Algorithm 1 ensuring a correct representation of circadian clocks oscillations relatively to the amplitude of their corresponding variable (in %), and their associated period (T). One hexagon corresponds to one oscillator and its associated set of threshold and scaling parameters. One color for each δ | 65 |
| 3.8 | Duration of protein peaks (a) and stage durations (b) in hours. One hexagon corresponds to one set of parameters. One color for each δ | 66 |
| 3.9 | (a) Minimal and maximal possible duration of stage 6 over δ according to conditions of Proposition 1 (lines in blue tones for $d_{6_{min}}$ and in orange tones for $d_{6_{max}}$). In each color, a darker line corresponds to a bigger P_{low} . (b) Durations of stage 7 over δ according to the minimal (lines in blue tones) and maximal (lines in orange tones) duration of stage 6. (c) Minimal and maximal possible duration of stage 8 over δ according to conditions of Proposition 2 (dashed lines for $d_{8_{min}}$ and solid lines for $d_{8_{max}}$) and according to the minimal and maximal duration of stage 6. (d-h) Durations of stages 1 to 5 are computed based on the minimal and maximal durations of stages 6 and 8. The lines use the same color and style code as for (a-c). | 67 |

- 4.1 **Representation of the core circadian clock mechanism of the mouse liver in the nucleus and temporal expression levels of the core clock components at the mRNA level (dashed line) and at the DNA binding level (solid line).** White and light grey coloring background represent respectively subjective day (CT0-CT12) and night (CT12-CT24). REV-ERB, CRY and PER refer respectively to REV-ERB α/β , CRY1/2 and PER1/2. This figure combines a collection of data from various articles [1], [7], [10], [22], [26], [32], [33], [51], [57], [59], [71], [83], [92], [94], [110], [127], [130], [131], [139], [141], [144]–[146], [151], [155]. 72
- 4.2 **Illustration of circadian cycles segmentation.** (a) Cycle segmentation with data (see points) from Narumi *et al.* (times series are the result of data interpolation with a spline). Temporal representation (scaled to a period of 24h) of maximums of B , R and P (respectively in red, green and blue) and segmentation into stages (delimited between two orange lines) for (b) Narumi *et al.* dataset, (c) Almeida *et al.* model (reduced), (d) Almeida *et al.* model (original), (e) Relógio *et al.* model, (f) Hesse *et al.* model, (g) Brown *et al.* model and (h) Brown *et al.* model with $P := \text{PER} + \text{CRY} + \text{PER}:\text{CRY}$. The maximum of B is set at CT6.4 for models segmentation (since observed at CT8 in [139] and at CT4.7 in our reference experimental dataset [114]) and maximums of R and P and stages are represented relatively to the maximum of B . (i) Duration and timing of B , R and P peaks and (j) stage durations associated to each segmentation. 81
- 4.3 **Temporal analogy between the phases described by Takahashi in [139] and our cycle segmentation stages.** The dashed line approximates the temporal expression of each stage. 83
- 4.4 **Stage durations as a function of ε .** (a) Almeida *et al.* (reduced), (b) Almeida *et al.* (original), (c) Relógio *et al.* and (d) Hesse *et al.* models. The range of ε in each model corresponds to a change of 1.3 hours in the total period (except in case (b), where only a small period variation is observed with ε). 85
- 4.5 **Phase difference curves between a long-period oscillator and the reference oscillator for B (dotted curves), R (dashed curves) and P (tri-star curves).** (a) Almeida *et al.* (reduced) (b) Almeida *et al.* (original) (c) Relógio *et al.* (d) Hesse *et al.* models. The marker color indicates the stage of the long-period oscillator at the time where a given variable of this oscillator reaches the same amplitude point as the same variable of the reference oscillator. Dashed vertical lines correspond to the time at which oscillator 2 transitions from one stage to another according to P_2 87

| | | |
|-----|---|----|
| 5.1 | Durée des étapes de deux oscillateurs synchronisés en termes de périodes et couplés avec (a) $k = 0.09$ et (b) $k = 1.0$. Les courbes pleines représentent l'oscillateur 1 ($\varepsilon = 1$) et les courbes en pointillés l'oscillateur 2 ($\varepsilon \neq 1$). | 92 |
| 5.2 | Séries temporelles de deux oscillateurs synchronisés en terme de périodes mais dont l'ordre et la durée des étapes varient d'un oscillateur à l'autre. L'oscillateur 1 est en traits pleins, le 2 en pointillés. Les courbes sont normalisées entre 0 et 1. Les cycles de chaque oscillateur sont découpés en étapes, représentées par la courbe orange. L'ordonnée des courbes oranges correspond à l'étape dans laquelle se trouve l'oscillateur : 0.1 pour l'étape 1, 0.2 pour l'étape 2, 0.1 <i>n</i> pour l'étape <i>n</i> | 92 |
| 5.3 | (a,b) Durée des pics de protéines de deux oscillateurs avant couplage (courbes fines) et après couplage (courbes épaisses) avec (a) $k = 0.09$ et (b) $k = 1.0$. Les courbes pleines représentent l'oscillateur 1 ($\varepsilon = 1$) et les courbes en pointillés l'oscillateur 2 ($\varepsilon \neq 1$). (c,d) Zoom des courbes de (c) $\tau_{R_{int}}$ et (d) $\tau_{P_{high}}$ la figure (b). La courbe orangée représente la moyenne de la durée des pics des deux oscillateurs avant couplage (moyenne des deux courbes fines). | 93 |
| 5.4 | Courbes de différences de phase au cours d'un cycle entre les variables <i>B</i> (points rouges), <i>R</i> (traits verts) et <i>P</i> (marqueurs "Y" bleu) de deux oscillateurs couplés avec $k = 0.09$, $k = 1$ ou $k = 10$ (les courbes plus foncées correspondent à des valeurs de k plus grandes). $\varepsilon_1 = 1$ et (a) $\varepsilon_2 = 0.9$ et (b) $\varepsilon = 1.1$ | 95 |
| 5.5 | (a) Courbes de différences de phases au cours d'un cycle entre les variables <i>B</i> (cercles pleins), <i>R</i> (traits fins) et <i>P</i> (marqueurs "Y") de deux oscillateurs couplés avec $k = 10$, et tel que $\varepsilon_1 = 1$ et $\varepsilon_2 = 0.9$. Même code couleur que Figure 5.6. Les courbes de B_1 et P_1 normalisées sont aussi représentées. (b) Zoom de (a). | 95 |
| 5.6 | Courbes de différences de phase au cours d'un cycle entre les variables <i>B</i> (cercles pleins) et <i>P</i> (marqueurs "Y") de deux oscillateurs couplés avec $k = 1$, et tels que $\varepsilon_1 = 1$ et $\varepsilon_2 = 0.9$. Les couleurs indiquent la position de B_2 et P_2 par rapport à leurs seuils B_{high} et P_{high} au moment où une variable donnée de l'oscillateur 2 atteint le même point d'amplitude que la même variable de l'oscillateur 1. Les étapes exactes par lesquelles passe chaque oscillateur au cours de son cycle sont indiquées en haut de la figure, en noir. | 96 |
| 5.7 | Périodes et moyennes des périodes d'oscillateurs pour 10 réseaux d'oscillateurs. Les réseaux sont indépendants les uns des autres. Chaque réseau est composé de 8 horloges qui, lorsqu'elles sont couplées, le sont en étoile avec $k = 1$. La courbe orange reliant les différents réseaux n'est là que pour faciliter la lecture, les réseaux sont bien indépendants. | 99 |

- 5.8 Intervalles de durée des étapes pour les oscillateurs de chaque réseau. Chaque bâton correspond à l'intervalle de temps passé dans une étape donnée (définie par la couleur du bâton) par l'ensemble des oscillateurs d'un réseau : de l'oscillateur qui y passe le moins de temps (valeur de la base du bâton), à l'oscillateur qui y passe le plus de temps (valeur du sommet du bâton). 99
- 5.9 Durées relatives à (a) P et (b) B , pour 10 réseaux d'horloges indépendants, constitués chacun de 8 horloges couplées en étoile avec $k = 1$. Plus précisément, la large courbe orange a été calculée selon la définition du point 2, les ronds pleins selon la définition du point 3, et les croix violettes selon la définition du point 4. Bien que la courbe orange lie les différents réseaux entre eux, les réseaux sont indépendants les uns des autres. Cette courbe ne sert qu'à faciliter la lecture de la figure. 100
- 5.10 PDCs individuelles de huit oscillateurs couplés en étoile avec $k = 3$. Haut de la figure : étapes successives traversées par chacun des huit oscillateurs, dont chacun a une valeur différente de ε 102
- A.1 Amplitude du pic principal des FFT de séries temporelles de réseaux de 8 horloges selon différents ensembles de périodes initiales (numérotés de 0 à 5), différentes topologies, forces de couplage et régimes alimentaires. 111
- B.1 Numerical simulations justifying Assumptions A.6-A.8 (see Section 3.3.2). (a-e) Values of $D(t_i)$, $i \in \{2, 3, 5, 6, 7\}$ to compare with $\frac{V_R}{V_D}$: illustration of Assumptions A.6 and A.7. (f) $R(t_8) - R(t_7)$ to compare with 0 : illustration of Assumption A.8. Each ending stage value depends on δ , P_{low} (a darker line corresponds to a bigger P_{low}), the duration of stage 6 (lines in blue tones for $d_{6_{min}}$ and in orange tones for $d_{6_{max}}$) and the duration of stage 8 (dashed lines for $d_{8_{min}}$ and solid lines for $d_{8_{max}}$). See caption of Figure 3.9 for more details. 114
- B.2 Considering that the starting point of the cycle is at the boundary between stages 5 and stage 6 (in red) : green arrows show the healthy cycle, black arrows show the unexpected transitions from the healthy cycle but which are prevented by conditions from Propositions 1 to 4. Otherwise, other possible transitions from the healthy cycle are excluded by definition of the model equations and by Assumptions A.1-A.8. Considering that the starting point is in a biologically refuted stage (stages 9 to 12) : grey arrows show transitions from these stages. . . . 121
- B.3 Time series for oscillators starting from (a) stage 9, (b) stage 10, (c) stage 11 and (d) stage 12. Horizontal lines represent the thresholds associated to each variable (same color code). Stages are represented by the orange line : stage 1 has 100 as ordinate, stage 2 has 200, etc. 121

- C.1 Illustration of Step 10 of Algorithm 1.** Each row corresponds to time series values of respectively B , R and P (in bold when the variable is above its threshold), with $dt = 0.5$. Dashed vertical lines represent the times of thresholds crossing and thus mark the transition between two stages. Down (resp. up) arrow means that a given threshold is crossed while the corresponding variable is decreasing (resp. increasing). Figures (d), (e) and (f) illustrate respectively tables (a), (b) and (c). (a) Stage 6 is followed by stage 9 instead of stage 7, because B_{high} is crossed instead of R_{int} : the values of these two thresholds are updated according to Eq. 4.2 and 4.3, and shown in (b). (b) Stage 7 is followed by stage 10 instead of stage 8, because B_{high} is crossed instead of P_{low} : the values of these two thresholds are updated according to Eq. 4.2 and 4.3, and shown in (c). (c) The expected order of stages on this time period is reached. . . 123
- C.2 Illustration of a phase difference computation at one time point between oscillator 1 (solid line) and oscillator 2 (dashed line) for the Hesse *et al.* model.** 124

Liste des acronymes et définitions

BMAL1 : Brain and muscle ARNT-like 1

CLOCK : Circadian locomotor output cycles protein kaput

CRY : Cryptochrome

E-box : Enhancer box

PER : Period

ROR : Retinoic acid-related orphan receptor

RRE : Rev Response Element

SCN : Suprachiasmatic nuclei (Noyaux suprachiasmatiques)

CT : *Circadian Time*. Unité utilisée pour décrire la phase d'un cycle circadien lorsqu'il n'est soumis à aucun synchroniseur extérieur (c'est-à-dire en conditions constantes). 1 CT (ou une heure circadienne) est égal à la période du cycle (approximativement 24h) divisée par 24. Par convention, CT0 marque le début du jour subjectif, ou de l'activité des animaux diurnes tandis que CT12 le début de la nuit subjective, ou de l'activité des animaux nocturnes.

ZT : *Zeitgeber Time*. Unité utilisée pour décrire la phase d'un cycle entraîné par un *Zeitgeber* -"donneur du temps"-, dont le plus important est le cycle jour/nuit, de période 24h. Par convention, ZT0 marque le début du jour ou de la lumière et correspond à la phase d'activité des animaux diurnes, tandis que ZT12 marque le début de la nuit ou de l'obscurité et correspond à la phase d'activité des animaux nocturnes.

Chapitre 1

Introduction

Depuis l'apparition de la vie sur Terre, les rythmes biologiques gouvernent le quotidien des organismes. En particulier, la plupart des êtres vivants possèdent une horloge interne qui contrôle une multitude de processus biologiques et physiologiques et qui leur impose, en l'absence de synchroniseur extérieur, un rythme périodique d'approximativement 24h. Ce mécanisme endogène est appelé "horloge circadienne" : le mot "circadien", composé des termes latins *circa* (autour) et *dies* (jour), signifie "environ un jour". Les organismes utilisent leur horloge circadienne pour s'adapter aux contraintes liées à leur environnement, anticiper les changements quotidiens et synchroniser leur physiologie et comportements en conséquence. L'alternance rythmique de phases de lumières et d'obscurité induite par la rotation de la Terre autour de son axe est le principal synchroniseur des horloges circadiennes et les entraîne sur une période de 24h.

Il est désormais bien établi que des horloges circadiennes désynchronisées sont étroitement liées à l'émergence de diverses maladies, et que, réciproquement, de nombreux facteurs de la vie quotidiennes, incluant les maladies, perturbent les rythmes circadiens. Une bonne compréhension des mécanismes et des rôles/fonctions des horloges circadiennes aiderait donc au développement de stratégies de prévention et de traitement de diverses maladies.

Cette thèse se consacre au développement d'outils et de méthodes numériques et mathématiques afin d'aider à la compréhension du fonctionnement et des mécanismes de synchronisation des horloges circadiennes, avec un accent mis sur les horloges périphériques des souris.

Afin de mieux appréhender la complexité, les enjeux, l'état actuel de la recherche, et les défis futurs liés à ce sujet, nous revenons en détail dans ce Chapitre sur les points suivants :

1. Les rythmes circadiens, de leur découverte aux connaissances actuelles 1.1
2. Modéliser la dynamique de l'horloge circadienne 1.2
3. Plan du manuscrit 1.3

1.1 Les rythmes circadiens, de leur découverte aux connaissances actuelles

1.1.1 Retour aux origines de la découverte des rythmes circadiens

Alors que les origines des horloges circadiennes remontent à l'apparition des premières formes de vie sur Terre, il y a plusieurs milliards d'années, la découverte des rythmes circadiens, et en particulier l'identification des molécules responsables de ces rythmes, est une histoire récente. Une frise chronologique retraçant les points clés des découvertes liées aux rythmes circadiens est donnée dans [132].

La chronobiologie -ou l'étude des rythmes biologiques- naît en 1729, alors que Jean-Jacques d'Ortous de Mairan observe que les feuilles de la plante *Mimosa pudica* s'ouvrent et se ferment rythmiquement, en cohérence avec le cycle jour/nuit [90]. De plus, Mairan rapporte que même lorsque la plante est placée dans l'obscurité totale, les mouvements réguliers des feuilles persistent tout au long de la journée, mais de manière moins prononcée. Il suggère alors que l'influence du soleil est toujours présente. En raison de cette "sensitivité" au soleil remarquée, cette plante a originellement été nommée "Sensitive".

Les travaux successifs d'Augustin Pyramus de Candolle et de Wilhelm Pfeffer, respectivement au début des XIXe et XXe siècles, confirment que les plantes privées du cycle jour/nuit restent périodiques, mais que leur période n'est plus exactement à 24h, et qu'elle dépend de chaque individu [90]. Ces résultats révèlent le caractère endogène des horloges circadiennes.

S'en sont ensuivi de nombreuses études, démontrant la présence d'horloges circadiennes au sein des cellules de pratiquement tous les êtres vivants, incluant les plantes, les bactéries, les champignons, les poissons, les amphibiens, les reptiles, les insectes et les mammifères [118]. Néanmoins, certains organismes, telle que la bactérie *Escherichia coli*, demeurent dépourvus d'horloge circadienne [30].

D'un point de vue moléculaire, les premiers pas vers la découverte des gènes à l'origine des rythmes circadiens datent de 1971 et sont le résultat des travaux de Ronald Konopka et Seymour Benzer [89]. Par mutagenèse, ils réussissent à isoler chez le *Drosophila melanogaster* trois lignées différentes de mutants, dont les mutations touchent toutes au même gène [95]. En utilisant l'activité locomotrice et l'heure d'éclosion (moment où le drosophile sort du stade de pupa et devient adulte) comme marqueurs temporels, ils observent que la première lignée est devenue arythmique, la seconde a désormais une période de 19h tandis que la troisième une période de 28h. Pour la première fois, la mutation d'un gène a des répercussions sur le comportement périodique d'un organisme. Ils attribuent le nom de *Period* (ou *Per*) à ce premier gène circadien identifié.

Les découvertes s'accroissent dans la fin des années 1990, en particulier grâce à JC. Hall, M

Rosbach et MW. Young [89], dont leurs travaux seront récompensés par le prix Nobel de médecine en 2017. Remarquant qu'à la fois la transcription du gène *Per*, son ARNm et sa protéine sont rythmiques, et que la quantité de protéine est à son maximum quand la transcription de son propre gène est à son minimum, ils émettent l'hypothèse d'un rétrocontrôle négatif [157]. Ils identifient également d'autres gènes circadiens chez la drosophile tels que *Timeless* [125] ou *Cry* [47].

Le premier gène circadien identifié chez les mammifères, *Clock*, est le résultat des travaux menés par le laboratoire de Takahashi sur les souris vers la fin des années 1990. La protéine CLOCK s'avère quant à elle être un facteur de transcription (elle contient un domaine PERIOD-ARNT-SIM ou PAS, qui lui permet de se lier à d'autres protéines, et de faciliter sa fixation sur l'ADN) [6], [88] de gènes circadiens comme *Per*.

L'identification de ces gènes circadiens et la découverte de boucles de rétroaction ont permis, dans les années 1990, de poser les bases des principes fondamentaux de la dynamique des rythmes circadiens.

1.1.2 Les mécanismes des horloges circadiennes des souris au niveau moléculaire

Dans cette thèse, notre intérêt se portant particulièrement sur les horloges des souris, les paragraphes suivants développent uniquement les mécanismes et molécules relatifs à ces horloges, qui, de manière schématique/simplifiée, consistent en une boucle de rétroaction positive et deux boucles de rétroaction négative interconnectées (voir figure 1.1).

Au sein de la première boucle de rétroaction négative, les transcrits des gènes de *Clock* et *Bmal1*, traduits chacun en protéine dimérisent et forment le complexe CLOCK:BMAL1. Ce complexe est un facteur de transcription qui va venir se lier aux Ebox (élément de réponse de l'ADN, qui facilite la transcription du gène associé) de nombreux gènes, dont, entre autres, les gènes de l'horloge *Per* et *Cry*. Ces gènes codent les protéines PER et CRY, qui s'associent, forment le complexe PER:CRY, et viennent inhiber leur propre transcription en bloquant l'activité transcriptionnelle de CLOCK:BMAL1. Un délai entre la transcription, la traduction et l'autorépression de PER et de CRY est engendré par des modifications post-transcriptionnelles (transport, stabilité, traduction de l'ARN) et post-traductionnelles (phosphorylation, formation de complexes de protéines, translocation des protéines dans le noyau) nécessaires pour générer des oscillations durables [78], [148].

Le complexe CLOCK:BMAL1 se lie également aux promoteurs des gènes *Rev-Erb* et *Ror* et favorise leur transcription. Les protéines REV-ERB et ROR régulent de manière compétitive la transcription des gènes *Clock* et *Bmal1* [75], en se liant au RRE (élément de réponse de Rev-Erb) : ROR favorise leur transcription, tandis que REV-ERB l'inhibe, donnant lieu à une boucle de rétroaction positive et à une seconde boucle de rétroaction négative.

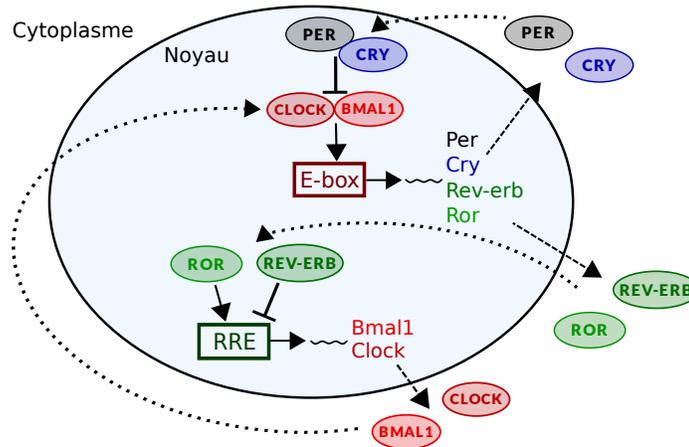


FIGURE 1.1 – Schéma des mécanismes de base de l’horloge circadienne des souris au sein d’une unique cellule. Les ARNm sont écrits en minuscules et leurs protéines correspondantes en majuscule et représentées dans des ellipses. Le grand oval à fond bleu clair délimite le noyau de la cellule. Les flèches pleines représentent des interactions d’activation et les flèches à tête plate des interactions d’inhibition. Les flèches en pointillés serrés représentent la formation des protéines depuis leurs ARNm associés et les flèches en pointillés espacés le déplacement des protéines depuis le cytoplasme dans le noyau.

Finalement, le complexe CLOCK:BMAL1 est aussi impliqué dans l’activation de nombreux autres gènes contrôlés par l’horloge circadienne.

Une description moléculaire plus complète, et incluant la temporalité des différents événements du cycle circadien (pour des horloges d’hépatocytes de souris) est donnée dans l’introduction du Chapitre 4.

Ainsi, un petit groupe de gènes, dont les principaux sont *Bmal1*, *Clock*, *Per*, *Cry*, *Ror* et *Rev-Erb*, se trouve à l’origine des rythmes circadiens chez les mammifères. L’horloge circadienne contrôle rythmiquement la transcription de nombreux gènes, entraînant des oscillations que l’on retrouve à différentes échelles -moléculaire, cellulaire, subcellulaire, physiologique et comportemental-, et rythmant de nombreux processus biologiques tels que des modifications de chromatine, le cycle cellulaire, les cycles veille/sommeil, la température du corps, les sécrétions hormonales, des fonctions du système immunitaire, etc.

1.1.3 Le système circadien

Chez les mammifères, les horloges circadiennes sont présentes dans pratiquement chaque cellule et sont organisées hiérarchiquement avec au sommet l’horloge centrale située dans les

noyaux supra-chiasmatiques (SCN), au niveau de l'hypothalamus. L'horloge du SCN est souvent décrite comme un chef d'orchestre contrôlant et synchronisant les rythmes de l'ensemble des horloges, tel un "chef d'orchestre dirigeant un ensemble de musiciens, dont chacun a sa propre partition et son propre rôle, et coordonnant l'ensemble de manière harmonisée". A l'échelle de l'organisme, cette organisation hiérarchique est appelée système circadien. Cette vision du système circadien a beaucoup évolué au cours des vingt dernières années, et continue à être remise en question par les découvertes successives.

Les recherches visant à déterminer la localisation de l'horloge circadienne étaient initialement focalisées sur le cerveau. Diverses études ont démontré que des lésions du SCN de rats menaient à la désynchronisation de leur activité locomotrice, tandis que des greffes de SCN de souris de type "sauvage" ("wildtype") dans l'hypothalamus de souris mutantes permettaient de restaurer leur rythmicité [137], mettant en évidence le rôle central de l'horloge du SCN dans le contrôle des rythmes circadiens.

L'hypothèse selon laquelle l'horloge du SCN est l'unique horloge à l'origine de tous les rythmes physiologiques [20] a longtemps été acceptée. Cependant, les progrès expérimentaux ont entre autre permis à des chercheurs de créer des drosophiles transgéniques exprimant une protéine fluorescente dont l'expression est pilotée par le promoteur du gène circadien *Per* [19]. Cette nouvelle technique leur a permis de regarder l'activité de *Per* dans différentes parties du corps des drosophiles, et de découvrir des rythmes circadiens dans pratiquement tous les cellules de tous les tissus [123], incluant la tête, l'abdomen, le thorax, les antennes, les pattes et les ailes.

Soupçonnant l'existence d'horloges circadiennes dans les organes périphériques des mammifères [159], Yamazaki *et al.* [154] mènent dans les années 2000 des expériences sur des rats similaires à celles réalisées sur les drosophiles. Ils créent des rats transgéniques au sein desquels le promoteur de *Per1* contrôle l'expression de la luciférase et observent que les cultures de cellules de différents tissus (muscles, foie, poumons) montrent des rythmes circadiens, mais qui s'amortissent avec le temps. Ces résultats démontrent l'existence d'horloges dans les organes périphériques, mais suggèrent que le SCN est requis pour les entraîner et leur assurer des oscillations durables.

1.1.4 Synchronisation des horloges circadiennes

Chez les mammifères, les horloges circadiennes du SCN oscillent en harmonie, de sorte qu'une seule phase est observée à l'échelle du tissu. L'horloge centrale, entraînée par les signaux lumineux perçus par la rétine et transmis jusqu'aux neurones du SCN via le tractus rétinohypothalamique [82], [128], s'aligne quotidiennement sur le cycle jour/nuit, soit sur une période de 24h. En l'absence de synchroniseurs extérieurs, la période des horloges n'est plus de 24h mais varie selon les individus (par exemple, elle est proche de 24,1h ou 24,2h en ce qui concerne, respectivement, les femmes ou les hommes [42]).

Par ailleurs, la synchronisation des 20 000 neurones du SCN est favorisée par des mécanismes de communication intercellulaire incluant des jonctions communicantes, des neurotransmetteurs (comme GABA -acide gamma-aminobutyrique- [41]) et des neuropeptides sécrétés par des neurones du SCN [107], [111], [116], (tels que AVP -l'arginine-vasopressine- ou VIP -polypeptide intestinal vasoactif- [5]). Le couplage intercellulaire renforce les rythmes circadiens du SCN face au bruit ou aux mutations génétiques [87], leur garantissant des oscillations robustes et de grande amplitude.

L'horloge centrale entraîne les horloges périphériques [128] en leur transmettant des signaux hormonaux, neuronaux ou comportementaux (relatifs à la lumière, ou à d'autres *Zeitgeber* -"donneurs du temps"-, comme l'apport de nourriture ou l'activité sportive [119]). Ces signaux, qui varient selon les organes destinataires [76], influencent la phase des horloges et favorisent leur synchronisation à l'échelle d'un tissu. Les horloges du foie sont par exemple entraînées par un ensemble de signaux relatifs à l'apport de nourriture, incluant l'insuline [35] ou le glucose, mais dont les molécules régulatrices sous-jacentes sont encore peu connues [29], [31]. Dans certains cas, l'ajustement de la phase des horloges périphériques par le régime alimentaire peut se faire indépendamment de l'horloge centrale, menant alors à un découplage entre horloges périphériques et horloge du SCN [38], [147]. Généralement, la phase des horloges du SCN est observée comme étant avancée de 4 à 8h par rapport à celle des horloges du foie [9], [105], [117], [155]

L'idée que l'horloge centrale du SCN contrôle hiérarchiquement les horloges circadiennes périphériques [53], et que ces dernières fonctionnent principalement comme des oscillateurs "esclaves", dont les oscillations s'amortissent en l'absence de synchroniseurs systémiques internes, est largement acceptée. Cependant, cette vision a été récemment remise en question par des expériences réalisées *in vivo* sur des souris par le laboratoire de Schibler [135]. Grâce à une technologie sophistiquée permettant des enregistrements longitudinaux de bioluminescence à long terme chez des animaux vivant librement en conditions constantes (nourriture à volonté, obscurité permanente), les auteurs ont démontré que la cohérence de phase d'un gène principal de l'horloge, *Rev-Erba*, persiste dans le foie d'animaux dépourvus de SCN fonctionnel, en l'absence de signaux environnementaux ou provenant d'horloges circadiennes d'organes extra-hépatiques. Par conséquent, il semble que la synchronisation entre les horloges hépatiques puisse être obtenue indépendamment de *Zeitgeber* externes, au travers d'un mécanisme encore peu connu, mais dont une hypothèse sous-jacente implique la présence de couplage.

Une autre étude s'intéressant à l'impact des régimes alimentaires sur la rythmicité des gènes de souris a révélé qu'un apport alimentaire arhythmique impactait l'expression de 70% des gènes du foie, sans toutefois altérer la rythmicité des gènes de l'horloge hépatique [72], [98], ce qui suggère que les horloges du foie possèdent d'autres mécanismes robustes de synchronisation.

En 2014, Guenther *et al.* [74] ont réalisé des expériences *in vitro* sur des hépatocytes de

souris en culture pour déterminer si la synchronisation des cellules du foie était favorisée par une communication intercellulaire. Leur étude des périodes et phases d'hépatocytes "wildtype" en culture révèle la présence d'un couplage faible et localisé au sein de clusters d'environ 7 hépatocytes. Néanmoins, au sein de cultures mixtes composées de cellules "wildtype" et *Cry2^{-/-}* (l'inactivation de ce gène provoque une augmentation de la période des oscillations, entraînant une différence de période par rapport aux cellules "wildtype" pouvant aller jusqu'à 3 ou 4h), le couplage semble trop faible pour synchroniser l'ensemble des oscillateurs sur une même période. L'étude suggère que, bien que le couplage ne soit pas suffisant pour assurer une synchronisation globale, il assurerait néanmoins une synchronisation locale, favorisant la stabilisation des rythmes circadiens contre des bruits dans les signaux extérieurs. De plus, les auteurs mettent en avant le fait que l'expérience a été réalisée *in vitro* sur des hépatocytes cultivés en 2D, et émettent l'hypothèse que le couplage pourrait être en réalité plus fort dans le foie, *in vivo*, où les cellules sont disposées en 3D et où des facteurs physiologiques pourraient renforcer le couplage.

De récents résultats expérimentaux provenant du laboratoire de Kramer [52] renforcent l'hypothèse du couplage intercellulaire entre cellules périphériques. En utilisant la lignée cellulaire humaine d'ostéosarcome U2OS, les auteurs démontrent que les oscillateurs cellulaires périphériques se couplent *in vitro* via des signaux paracrines, et identifient le facteur de croissance transformant β (TGF β) comme une molécule de signalisation probable contribuant au couplage intercellulaire, bien que cela reste à être confirmé *in vivo*.

1.1.5 Comprendre les rythmes circadiens, une nécessité pour améliorer la qualité de vie et la santé/bien-être des humains

La chronobiologie est la discipline à la base de l'étude des rythmes circadiens. Au cours de ces dernières années, des avancées majeures dans ce domaine ont permis de mettre en évidence la nécessité du bon fonctionnement des horloges circadiennes pour maintenir une bonne santé mais aussi avoir une espérance de vie plus élevée. Cependant, les organismes, et en particulier les humains, sont quotidiennement confrontés à des événements susceptibles de perturber leurs horloges circadiennes, qu'ils soient d'ordre moléculaire (gènes de l'horloge, régulateurs métaboliques) [17], métabolique (alimentation riche en graisse [93], stress oxydatif), ou physiologique (travail de nuit, décalage horaire, alimentation irrégulière, contraintes sociales).

Un désalignement entre l'horloge interne et le temps extérieur mène à un dysfonctionnement des rythmes circadiens, et est directement lié à un risque plus élevé de développer des pathologies [113], [156] (tels que des troubles du sommeil, de l'obésité, des maladies cardiovasculaires, des désordres métaboliques, des cancers, du diabète, des désordres psychiatriques, des troubles de la reproduction [112] etc.). De manière réciproque, certaines maladies perturbent les horloges, menant alors à un cercle vicieux.

Les quelques exemples suivants illustrent l'impact des activités quotidiennes sur les horloges circadiennes et sur la santé.

Le "jetlag social", qui correspond au fait de changer ses heures de coucher et de lever en fonction des jours pour s'adapter aux contraintes sociales (dues au travail, à l'école, aux événements sociaux qui ont souvent lieu le soir...), conduit à un décalage entre l'horloge interne, l'horloge sociale, et l'horloge solaire. Les personnes présentant un "jetlag social" sont deux fois plus susceptibles de développer du diabète [96], des maladies cardiovasculaires ou encore des désordres psychologiques [147]. Or, 75% de la population active des pays industrialisés travaille en dehors des horaires "du jour" [142].

Dans le même ordre d'idées, la lumière bleue est la lumière la plus efficace pour synchroniser une horloge, et, si elle est utilisée dans certaines thérapies pour resynchroniser les horloges de patients présentant des décalages de phase [68], elle peut être néfaste dans certaines situations. En effet, cette lumière bleue est également celle rejetée par les écrans (de téléphone, de tablette, de liseuse,...). Une exposition tardive et prolongée à cette lumière conduit à une "remise à l'heure" du SCN à un horaire inattendu, décalant la phase ou inhibant la sécrétion de la mélatonine [86], [142] (hormone favorisant le sommeil) et augmentant l'état de vigilance. Le décalage de phase provoqué altère la qualité du sommeil et réduit les performances cognitives du lendemain [28], [84].

Finalement, dans un autre cas de figure, de nombreuses fonctions hépatiques contrôlées par l'horloge circadienne, comme le métabolisme des lipides, sont directement impactées en cas de dérèglement de celle-ci. Par exemple, la maladie la plus commune du foie, la stéatose hépatique non alcoolique [17], [113] (nonalcoholic fatty liver disease - NAFLD en anglais), se caractérise par un surplus de graisse dans le foie qui est directement associé à des dysfonctionnements circadiens. Réciproquement, des études ont montré que les lipides eux-mêmes avaient un rôle dans le contrôle des rythmes circadiens [2].

La chronothérapie est une discipline dérivant de la chronobiologie, dont le but est de déterminer le moment optimal pour l'administration de médicaments, de manière à maximiser leur effet tout en minimisant les effets secondaires. Bien que le dosage d'un médicament soit important, l'heure de son administration pourrait permettre de maximiser son efficacité.

Par exemple, l'administration de médicaments anticancéreux à un moment optimal peut considérablement augmenter leur efficacité, tandis qu'une mauvaise administration peut multiplier leur toxicité par un facteur 2 à plus de 10 [102]. La chronothérapie a aussi révélé son efficacité dans le traitement de l'asthme [138]. Différentes études ont montré qu'une prise de stéroïdes (médicament utilisé pour diminuer les effets de l'asthme) inhalés à 3h ou 5h30 de l'après-midi était au moins aussi efficace que 4 prises réparties dans la journée [121], mais qu'une prise unique à 8h du matin ne permettait pas une amélioration des symptômes comparables à celle obtenue à d'autres moments d'administration [120]. Une revue de diverses maladies (asthme, arthrite, rhinites allergiques, désordres cardiovasculaires...) avec le moment

auquel le médicament associé doit être administré pour tenir compte des rythmes biologiques est donnée par [134].

Une bonne compréhension des horloges circadiennes -aussi bien d'un point de vue de leurs mécanismes, de leurs fonctions, des entités avec lesquelles elles interagissent ou de leurs éléments perturbateurs- est donc primordiale pour avoir les clés d'une bonne hygiène de vie, et pour permettre le développement de chronothérapies visant à renforcer les rythmes circadiens.

1.2 Modéliser la dynamique de l'horloge circadienne

La modélisation et l'analyse mathématique et numérique sont des outils permettant de compléter, soutenir, renforcer les expériences faites par les biologistes : les modèles mathématiques ont en effet la capacité d'intégrer de nombreuses données, et peuvent représenter, décrire et prédire différents phénomènes/comportements complexes de manière simplifiée mais plus rapide et moins coûteuse que les expériences faites en laboratoire. Ce sont de puissants outils permettant d'épauler et de guider les biologistes dans leurs recherches expérimentales.

Les manières de modéliser les horloges circadiennes ou n'importe quel phénomène biologique donné sont diverses [39]. Le choix du formalisme dépend du système biologique étudié, des données disponibles, des hypothèses faites, des propriétés étudiées etc. Par exemple, les réseaux booléens sont adaptés pour modéliser des systèmes à grande échelle dans lesquels de nombreuses données manquent, tandis que les modèles stochastiques, qui permettent de prendre en compte l'aléatoire et le non-déterminisme des interactions moléculaires, seront appropriés pour l'étude de systèmes ayant peu de molécules.

Dans cette thèse, nous utilisons des modèles construits à partir d'équations différentielles ordinaires non linéaires et développons un modèle basé sur des équations différentielles affines par morceaux. Ainsi, dans les sections suivantes, nous ne présentons que les systèmes d'équations différentielle ordinaires (Section 1.2.1) et affines par morceaux classiques (Section 1.2.2) utilisés dans les modèles de réseaux de régulation géniques.

1.2.1 Équations différentielles ordinaires non linéaires

Les systèmes d'équations différentielles ordinaires (EDOs) offrent un cadre de modélisation pertinent pour représenter la dynamique de systèmes biologiques dans des milieux homogènes (comme c'est le cas pour les horloges circadiennes). Connaissant un temps et un état initial, l'évolution de l'ensemble des variables (représentant des ARNm, des protéines, des complexes de protéines...) au cours du temps est donnée de manière continue par des équations de la forme

$$\frac{dx_i}{dt} = f_i(x), \quad 1 \leq i \leq n$$

Construites suivant des lois de la cinétique chimique, ces équations décrivent les réactions dans lesquelles sont impliquées chaque entité du système. Elles se composent alors de termes de synthèse, de dégradation, de liaison, de dissociation, d'activation, d'inhibition, de phosphorylation, etc.

La vitesse de dégradation d'une entité x_i est souvent représentée via un terme de dégradation linéaire de la forme $-\gamma_i x_i(t)$.

Les réactions de liaison ou de dissociation sont quant à elles généralement modélisés suivant la loi d'action de masse. Cette loi, introduite par Guldberg et Waage en 1864, stipule que la vitesse d'une réaction (v) est proportionnelle à la probabilité de collision entre tous les réactifs, qui est elle-même proportionnelle au produit de la concentration des réactifs élevé à une puissance égale à leur coefficient stoechiométrique [91]. Ainsi, la vitesse d'une réaction entre p molécules d'un réactif A et q molécules d'un réactif B s'écrit :

$$v = k \cdot [A]^p \cdot [B]^q,$$

avec p et q les ordres partiels (égaux aux coefficients stoechiométriques) respectifs des réactifs A et B et k la constante de vitesse.

L'équation de Michaelis et Menten, conçue pour décrire la vitesse à laquelle une enzyme catalyse une réaction chimique, est fortement utilisée dans les modèles de systèmes de régulation biologique (elle peut aussi s'appliquer pour décrire la vitesse à laquelle une bactérie consomme un nutriment, ou bien la vitesse à laquelle un facteur de transcription transcrit un gène, etc.).

Pour obtenir cette équation [43], [91], la première étape consiste à établir les équations différentielles décrivant l'évolution de la concentration de chaque entité du système (c'est-à-dire de l'enzyme $[E]$, du substrat $[S]$, du complexe enzyme-substrat $[ES]$ et du produit $[P]$) en utilisant la loi d'action de masse. Ensuite, ces équations se simplifient (i) en observant que la concentration totale d'enzymes reste constante (les enzymes ne sont ni produites ni consommées), soit $[E]+[ES]=E_{total}$ et (ii) en considérant que la concentration en substrats initiale est largement supérieure à celle en enzymes, ce qui revient à considérer qu'une grande quantité d'enzymes est en permanence en complexe avec un substrat et donc que la concentration du complexe enzyme-substrat reste constante, soit $\frac{d[ES]}{dt} = 0$ (hypothèse de l'état quasi-stationnaire). Finalement, suite à ces simplifications, et à des substitutions de différents termes dans les équations, l'équation de Michaelis et Menten s'écrit :

$$v = V_{max} \frac{[S]}{[S] + K_m}, \quad (1.1)$$

avec v la vitesse à laquelle l'enzyme convertit le substrat en produit, V_{max} la vitesse maximale

(atteinte lorsque l'enzyme est saturée par le substrat), $[S]$ la concentration du substrat et K_m la constante de Michaelis, dont la valeur est égale à la concentration de substrat nécessaire pour atteindre une vitesse égale à la moitié de la vitesse maximale.

Dans les réseaux de régulation géniques, certaines protéines régulent leur propre expression ou l'expression de d'autres gènes en favorisant leur activation ou leur inhibition, comme ce peut être le cas pour les horloges circadiennes, avec par exemple le complexe de protéines CLOCK:BMAL1 qui favorise la transcription de nombreux gènes (voir Section 1.1.2). Les fonctions de Hill sont couramment utilisées dans les systèmes d'EDOs pour représenter ce type de dynamique non linéaire.

La fonction de Hill est une représentation de l'équation de Michaelis et Menten 1.1 plus complexe, qui permet de prendre en compte la coopérativité entre ligands (ou substrats) et protéines (ou enzymes). Une protéine qui a plusieurs sites de liaison agit de façon coopérative (positivement) quand la fixation d'un ligand à un de ses sites renforce l'affinité des autres sites pour le ligand. La fonction de Hill s'obtient [43] en représentant les fixations successives des ligands aux récepteurs en plusieurs étapes (autant d'étapes que de ligands). L'évolution de la concentration des ligands et des récepteurs en fonction de leur état d'occupation se décrit avec des équations différentielles qui suivent la loi d'action de masse. Différentes simplifications, comme des approximations à l'état quasi-stationnaire des concentrations des récepteurs à chaque étape, ou encore l'hypothèse qu'une fois qu'un ligand est lié, le second ligand se liera plus facilement, ce qui permet de négliger l'étape intermédiaire pendant laquelle un seul ligand est lié, mènent à la fonction de Hill.

Les formes courantes de la fonction de Hill croissante (utilisée pour modéliser une activation d'une entité sur une autre), et de la fonction de Hill décroissante (utilisée pour décrire une inhibition), sont décrites respectivement par les Équations 1.2 et 1.3 :

$$h^+(x, \theta, n) = \frac{x^n}{\theta^n + x^n}, \quad (1.2)$$

$$h^-(x, \theta, n) = 1 - h^+(x, \theta, n) = \frac{\theta^n}{\theta^n + x^n}, \quad (1.3)$$

avec θ un paramètre décrivant la concentration nécessaire de l'entité x pour que l'activation (Équation 1.2) ou l'inhibition (Équation 1.3) par x soit effective. Le paramètre n représente le degré de coopérativité, et sa valeur influence la raideur de la courbe de Hill, qui est de forme sigmoïdale.

Dans les systèmes d'EDOs, les taux de synthèse des protéines sont souvent représentés par des combinaisons de fonctions de Hill.

1.2.2 Équations différentielles affines par morceaux

L'étude de systèmes de régulation génique construits avec des EDOs présentant des non linéarités peut rapidement devenir compliqué et coûteux. Ainsi, pour faciliter leur étude, la classe de modèles d'équations différentielles affines par morceaux introduite par Glass et Kauffman [60], [62] est couramment utilisée. Dans ce formalisme de modélisation, basé sur le constat de la nature binaire de nombreuses interactions au sein des réseaux de régulation géniques, les fonctions de Hill peuvent être approximées par des fonctions *step* [27], [61]. Lorsque le coefficient de Hill n tend vers l'infini, la fonction de Hill croissante (resp. décroissante), de forme sigmoïdale, tend vers deux états en fonction de la valeur de x par rapport à son seuil θ (voir Figure 1.2) : l'un tend vers 0 (resp. 1) si $x < \theta$ et l'autre tend vers 1 (resp. 0) si $x > \theta$.

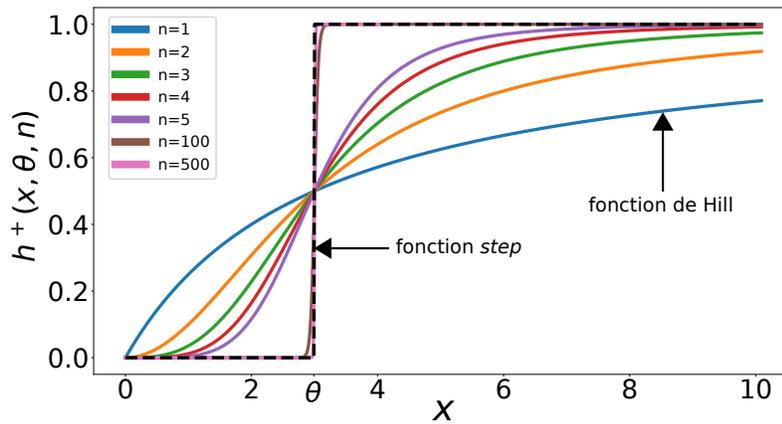


FIGURE 1.2 – Fonctions de Hill croissantes pour différents degrés de coopérativité (courbes pleines), et approximation par une fonction *step* croissante (courbe en pointillés noirs).

La fonction *step* croissante $s^+ : \mathbb{R}_+ \times \mathbb{R}_+ \rightarrow \{0, 1\}$ est définie par :

$$s^+(x, \theta) = \begin{cases} 1, & x > \theta, \\ 0, & x < \theta. \end{cases}$$

et la fonction *step* décroissante $s^- : \mathbb{R}_+ \times \mathbb{R}_+ \rightarrow \{0, 1\}$, $s^-(x, \theta) = 1 - s^+(x, \theta)$.

Pour $x = \theta$, on suppose que $s^+(x) \in [0, 1]$ et $s^-(x) \in [0, 1]$.

La forme générale des équations différentielles affines par morceaux décrivant la dynamique au sein de réseaux de régulation géniques est donnée par [39], [62] :

$$\frac{dx_i}{dt} = g_i(x) - \gamma_i x_i, 1 \leq i \leq n$$

avec x_i la concentration de l'entité i et γ_i le taux de dégradation de x_i . La fonction g_i décrit

le taux de synthèse de x_i et sa forme générale s'écrit :

$$g_i(x) = \sum_{l \in L} \kappa_{il} b_{il},$$

avec κ_{il} des taux de synthèse (positifs) et b_{il} une fonction de régulation composée de sommes et de multiplications de fonctions *step* et prenant comme valeurs 0 ou 1. A noter que le terme de dégradation, bien que généralement décrit par une fonction linéaire, peut également s'écrire en termes de fonctions *step*, similairement à g_i .

Les systèmes d'équations différentielles affines par morceaux étant construits avec des équations dépendantes de seuils, qui permettent de faire basculer le système d'un état à un autre en fonction de la valeur des variables par rapport à leur(s) seuil(s), l'espace de phases du système peut être subdivisé en domaines [27] définis en fonction de la valeur de chaque variable par rapport à son seuil (ou leurs seuils). Un domaine est appelé régulier si aucune des variables x_i n'a de seuil dans ce domaine. Un domaine est dit *switching* si au moins une variable a un seuil dans ce domaine.

Les équations du système étant linéaires au sein de chaque domaine régulier, leurs solutions peuvent être calculées en fonction des points focaux (points d'équilibre), et l'on peut montrer que les trajectoires au sein de chaque domaine tendent vers le point focal associé au domaine, jusqu'à ce qu'elles quittent le domaine si le point focal est dans un autre domaine. Si un point focal est localisé dans son propre domaine, alors ce point focal est un équilibre du système.

Les graphes de transition permettent de représenter l'ensemble des transitions entre les différents domaines, et ainsi d'obtenir qualitativement la dynamique globale d'un système donné [108]. Selon la définition du système d'équations différentielles affines par morceaux, différentes dynamiques peuvent être observées, comme la multistabilité, ou la présence de solutions périodiques.

Pour illustrer ces propos, prenons l'exemple d'une boucle de rétroaction négative entre deux protéines x_1 et x_2 tel que définit par les équations 1.4. x_1 active x_2 tandis que x_2 inhibe x_1 .

$$\begin{aligned} \dot{x}_1 &= \kappa_1 s^-(x_2, \theta_2) - \gamma_1 x_1 \\ \dot{x}_2 &= \kappa_2 s^+(x_1, \theta_1) - \gamma_2 x_2 \end{aligned} \quad (1.4)$$

On suppose, dans cet exemple, que :

$$\forall i \in \{1, 2\}, \theta_i < \kappa_i / \gamma_i \quad (1.5)$$

Comme les variables x_1 et x_2 ont un seuil chacune, l'espace de phases du système 1.4 peut être divisé en quatre domaines réguliers [27] (D_{00} , D_{01} , D_{10} et D_{11}), définis en fonction de la

position des variables par rapport à leurs seuils (voir Figure 1.3). Par exemple, dans le domaine D_{00} , les deux variables x_1 et x_2 sont au-dessous de leurs seuils ($x_1 < \theta_1$ et $x_2 < \theta_2$), et le domaine D_{00} est défini par :

$$D_{00} = \{x = (x_1, x_2) \in \mathbb{R}_+^2 \mid 0 < x_1 < \theta_1, 0 < x_2 < \theta_2\}$$

Le système d'équations 1.4 dans D_{00} se réécrit :

$$\begin{aligned} \dot{x}_1 &= \kappa_1 - \gamma_1 x_1 \\ \dot{x}_2 &= -\gamma_2 x_2 \end{aligned} \tag{1.6}$$

Similairement à 1.6 les systèmes d'équations au sein de chaque domaine régulier sont linéaires, et leurs solutions convergent vers leurs points focaux, à moins qu'elles ne quittent le domaine. Représentés en bleu sur la Figure 1.3, les points focaux associés à chaque domaine sont :

$$\begin{aligned} \phi_{00} &= (\kappa_1/\gamma_1, 0) \\ \phi_{01} &= (0, 0) \\ \phi_{10} &= (\kappa_1/\gamma_1, \kappa_2/\gamma_2) \\ \phi_{11} &= (0, \kappa_2/\gamma_2) \end{aligned} \tag{1.7}$$

Dans notre exemple, les solutions du domaine D_{00} vont tendre vers $\phi_{00} \in D_{10}$ jusqu'à ce qu'elles quittent D_{00} et entrent dans D_{10} . Les solutions vont alors être dictées par les équations de D_{10} , et tendre vers $\phi_{10} \in D_{11}$, et ainsi de suite. De manière générale, les trajectoires de ce système vont être obtenues en suivant la séquence de transitions entre les domaines, guidées par les points focaux, et conduisent à un cycle (tel que représenté par les flèches rouges de la Figure 1.3).

L'exemple du système 1.4 est relativement simple, puisque les points focaux se trouvent tous dans des domaines réguliers. Des difficultés émergent dans le cas où une solution quitte un domaine régulier pour entrer dans un domaine *switching* : la fonction *step* n'étant pas définie quand $x_i = \theta_i$, le champ de vecteurs n'a pas de solution dans le domaine *switching*. Pour résoudre ce problème, une approche consiste à utiliser une méthode initialement proposée par Filippov [27], [40], [70]. Une autre méthode consiste à éliminer les discontinuités dues aux fonctions *step*, en remplaçant les fonctions *step* par des fonctions "logoïdes", qui sont des fonctions augmentant de manière monotone entre 0 et 1 dans un intervalle autour du seuil θ_i [122].

Une question récurrente dans l'étude de cette classe de systèmes est celle de la preuve de l'existence et de la stabilité de solutions périodiques. Ce problème a d'abord été abordé

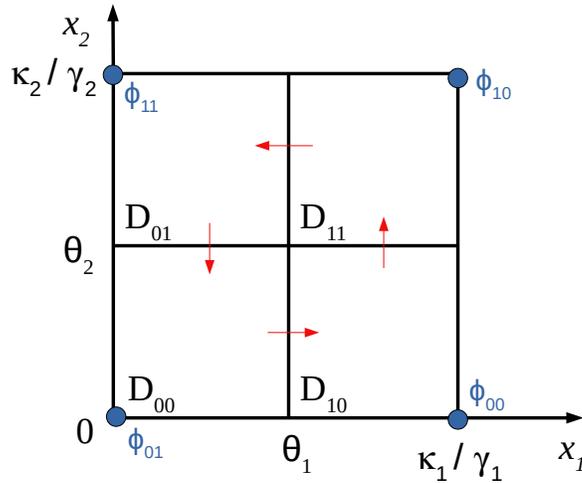


FIGURE 1.3 – Domaines réguliers divisant l’espace de phases du modèle 1.4. Les points focaux de chaque domaine sont indiqués par les cercles pleins bleus. Les flèches rouges représentent les transitions entre chaque domaine.

par la formulation de différentes suppositions sur la structure du système, comme la présence d’un unique seuil par variable [64] ou bien de taux de dégradation identiques pour chaque variable [44], [109]. L’étude de solutions périodiques pour des systèmes avec plusieurs seuils par variable (c’est-à-dire qu’une variable donnée régulant plusieurs variables le fait à des seuils différents) a été étudié dans [45], [48]. Dans [49], des taux de dégradation différents sont considérés, et, selon l’hypothèse d’un alignement des points focaux, les auteurs montrent que l’existence et l’unicité d’un cycle limite d’un système avec des boucles de rétroaction négatives dépend du nombre de variables. La recherche de solutions périodiques a aussi été étudiée dans des systèmes décrits avec des fonctions sigmoïdes de pente raides [46].

Finalement, ce formalisme a récemment conduit à des méthodes pour caractériser l’ensemble des comportements qualitatifs d’un système donné et identifier les régions de paramètres pour lesquelles le comportement qualitatif reste le même [36], [37], dans le but de valider ou rejeter des modèles en faisant correspondre modèles et données expérimentales [55].

Dans le Chapitre 3, nous construisons un modèle d’horloge circadienne avec des équations différentielles affines par morceaux, mais qui diffère des modèles par morceaux classiques présentés précédemment. En effet, notre modèle approxime un modèle d’EDOs continu non linéaire (présenté dans la Section 1.2.3, Équations 1.9), dont les termes non linéaires sont une fonction de Hill et un terme dérivant de la loi d’action de masse, de la forme xy . Si la simplification de la fonction de Hill par une fonction *step* est bien établie, l’approximation du terme d’action de masse par une fonction linéaire ne l’est pas. Notre approche repose sur l’identifica-

tion d'une séquence de transitions périodique entre les régions de l'espace de phase discrétisé, consistante avec des données expérimentales et sur l'exploration de l'espace des paramètres de seuils qui permettent d'avoir des solutions périodiques. Le terme d'action de masse est défini nul, constant ou linéaire selon les régions.

1.2.3 Modèles d'horloges circadiennes

Au fil du temps, la littérature s'est enrichie de nombreux modèles d'EDOs relatifs aux horloges circadiennes des mammifères [4], [21], [67], [73], [80], [97], [100], [101], [127], -incluant des modèles développés spécifiquement pour l'horloge du SCN [54], ou pour d'autres organes comme le foie [151] ou les cellules bêta pancréatiques [152]-, dont une revue comparative des modèles antérieurs à 2016 est prodiguée par [124].

Les quelques lignes suivantes ont pour but d'introduire le modèle de Goodwin [67], publié en 1965, qui est le modèle précurseur dans le domaine de la modélisation de systèmes biologiques avec des EDOs. Ce modèle à 3 variables modélise une boucle de rétroaction négative entre un gène et sa protéine [67], et est décrit par les équations différentielles suivantes 1.8 :

$$\begin{aligned}\dot{X}_1 &= \frac{a_1}{A_1 + k_1 Z_1} - b_1 X_1 \\ \dot{Y}_1 &= a_1 X_1 - \beta_1 Y_1 \\ \dot{Z}_1 &= \gamma_1 Y_1 - \delta_1 Z_1\end{aligned}\tag{1.8}$$

Chaque variables est décrite par un terme de synthèse et par un terme de dégradation linéaire. X_1 active linéairement Y_1 qui active lui-même linéairement Z_1 , formant alors une cascade d'activation linéaire entre ces 3 variables : $X_1 \rightarrow Y_1 \rightarrow Z_1$. De plus, une boucle de contrôle rétroactif a lieu entre X_1 et Z_1 : le taux de synthèse de X_1 est régulé négativement par Z_1 via un terme non linéaire.

Les paragraphes qui suivent sont consacrés à la présentation détaillée de cinq modèles qui seront au centre d'une analyse quantitative développée au cours de cette thèse (voir Chapitre 4). Il est important de noter que tous ces modèles sont construits suivant les boucles de rétrocontrôle au coeur de la dynamique des horloges circadiennes.

Le modèle à 8 variables de Almeida *et al.* [4] publié en 2020 se veut être un modèle réduit capable de représenter qualitativement certaines caractéristiques du cycle circadien telles que l'ordre temporel des pics de protéines (à savoir le pic de CLOCK:BMAL1 suivi de celui de REV-ERB et puis celui de PER:CRY) ou bien l'opposition de phase entre CLOCK:BMAL1 et PER:CRY. Basé sur la dynamique des horloges au niveau transcriptionnel, et construit suivant

les lois d'action de masse, et avec des fonctions de Hill et Michaelis et Menten, il modélise les interactions entre les protéines au travers des deux boucles de rétroaction négative et de la boucle de rétroaction positive caractéristiques des mécanismes circadiens des mammifères. Simpliste, ses variables représentent uniquement des protéines ou complexes de protéines. De plus, les protéines paralogues sont regroupées en une seule variable : par exemple, la variable REV-ERB regroupe REV-ERB α et REV-ERB β . Calibré à partir de données sur REV-ERB α provenant de fibroblastes de souris élevées en milieu standard [50], il a permis une étude sur la mutation *tau* (qui affecte *Per*).

Dans le but d'étudier les interactions entre le cycle cellulaire et l'horloge circadienne, Almeida *et al.* [3] ont davantage simplifié leur modèle en faisant des approximations à l'état quasi-stationnaire de plusieurs variables, donnant alors naissance à un modèle réduit à 4 variables (représentant les protéines DBP et REV-ERB et les complexes de protéines CLOCK:BMAL1 et PER:CRY) décrivant la dynamique imposée par les deux boucles de rétroaction négative au niveau transcriptionnel. Ce modèle présente les mêmes caractéristiques que le modèle original, à savoir l'ordre des pics de protéines et le caractère antiphasique entre CLOCK:BMAL1 et PER:CRY (voir Figure 1.4) et conserve des propriétés sur les interactions entre cycles circadien et cellulaire.

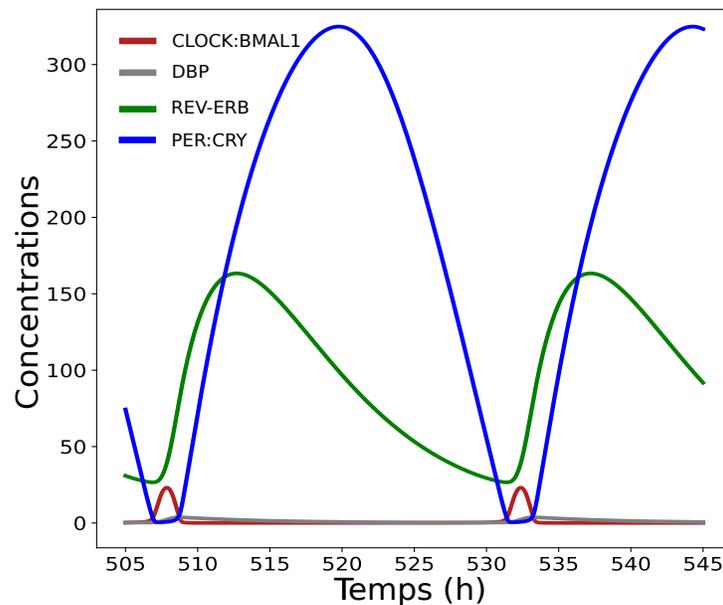


FIGURE 1.4 – Série temporelle du modèle réduit de l'horloge circadienne proposé par Almeida *et al.* [3]. Ce modèle reproduit certaines caractéristiques des horloges circadiennes telles que des oscillations périodiques, une opposition de phase entre CLOCK:BMAL1 et PER:CRY, ou encore l'ordre des pics de protéines CLOCK:BMAL1, REV-ERB puis PER:CRY.

Ce modèle robuste, calibré et validé avec des données expérimentales, a déjà permis dif-

férentes études. De par sa taille réduite, il présente l'avantage d'être facilement manipulable, ce qui facilite la réalisation d'études numériques, notamment pour modéliser le couplage entre plusieurs oscillateurs, mais également l'obtention de résultats théoriques. Pour ces raisons, ce modèle servira de point de départ pour plusieurs études réalisées dans cette thèse. Nous regardons alors de plus près la manière dont il est construit. Ses équations différentielles sont les suivantes :

$$\begin{aligned}
\frac{d[BMAL1]}{dt} &= V_R \frac{k_{Rr}^4}{k_{Rr}^4 + [REV]^4} - \gamma_B [BMAL1][PER : CRY] \\
\frac{d[DBP]}{dt} &= V_B [BMAL1] - \gamma_D [DBP] \\
\frac{d[REV]}{dt} &= V_D [DBP] - \gamma_R [REV] \\
\frac{d[PER : CRY]}{dt} &= V_D [DBP] - \gamma_B [BMAL1][PER : CRY]
\end{aligned} \tag{1.9}$$

avec $V_R = 44.4\%.h^{-1}$, $k_{Rr} = 80.1\%$, $V_B = 0.142\%.h^{-1}$, $V_D = 19\%.h^{-1}$, $\gamma_R = 0.241 h^{-1}$, $\gamma_D = 0.156 h^{-1}$, $\gamma_B = 2.58 h^{-1}$.

Les valeurs de cet ensemble de paramètres proviennent de la Table 2 de [3] et seront utilisées tout au long de ce manuscrit (sauf indication contraire). Elles donnent aux oscillations un cycle de période 24.5h. De manière à normaliser les données (voir [4]), les unités de concentration ont été évaluées en pourcentage de la valeur moyenne des données de REV-ERB α .

De fortes similitudes sont à noter entre ce modèle à 4 variables 1.9 et le modèle de Goodwin [67], présenté au début de cette section. Le modèle à 4 variables de Almeida *et al.* ne contient non pas une, mais deux cascades d'activations linéaires : BMAL1 \rightarrow DBP \rightarrow REV-ERB et BMAL1 \rightarrow DBP \rightarrow PER:CRY. Au sein de la première cascade, et similairement au modèle de Goodwin, une fonction de Hill décroissante permet de modéliser la répression imposée par REV-ERB sur BMAL1. De plus, toujours de manière analogue au modèle de Goodwin, les termes de dégradation de DBP et REV-ERB sont linéaires. Par contraste, le terme de dégradation commun à BMAL1 et PER:CRY est non linéaire et permet de modéliser la répression transcriptionnelle et séquestration de CLOCK:BMAL1 par PER:CRY, et l'export du complexe CLOCK:BMAL1 :PER:CRY hors du noyau.

A noter que tout au long de ce manuscrit, les variables de ce modèle seront fréquemment dénotées par B , D , R et P pour BMAL1, DBP, ERV-ERB et PER:CRY respectivement.

Le modèle de Relógio *et al.*, publié en 2011 [127], est composé de 19 équations et 71 paramètres, dont la plupart viennent directement de la littérature, ou ont été estimés avec des données publiées sur les phases et les amplitudes. Le système d'équations repose principalement sur les principes de la loi d'action de masse, les réactions de transcription sont décrites

avec des termes de Michaelis et Menten ou des fonctions de Hill, et les dégradations sont représentées linéairement. Ainsi, ces équations modélisent les niveaux d'expression des ARNm, des protéines et complexes de protéines -nucléiques et cytoplasmiques et incluant des protéines phosphorylées- au coeur des horloges circadiennes. Les gènes (et leurs protéines et complexes associés) sont regroupés par famille au sein d'une même variable : *Rev-Erb α* et *Rev-Erb β* sont regroupés au sein de *Rev-Erb* par exemple [104]. Ce modèle a permis de proposer des éléments de réponse quant à l'impact du taux de dégradation de *Per* sur la période, ou bien de démontrer l'importance de la boucle ROR/Bmal/REV-ERB dans la génération d'oscillations, puisqu'une sur-expression d'éléments de cette boucle conduit à un amortissement ou une perte des oscillations.

En 2021, dans le but d'étudier le moment optimal d'administration de l'irinotécan, un médicament anticancéreux utilisé pour traiter les cancers colorectaux, Hesse *et al.* ont adapté le modèle de Relógio *et al.* [80] de manière à ce qu'il puisse être calibré avec les données expérimentales disponibles, dont des données quantitatives venant d'hépatocytes de souris. Ainsi, les principales modifications apportées sont la simplification de la boucle PER/CRY (il n'y a plus de distinction entre la protéine PER phosphorylée ou non), l'ajout de *Clock*, le retrait du terme de dégradation des complexes CLOCK/BMAL et PER/CRY, ainsi que la prise en compte du rapport entre le volume du cytoplasme et celui du noyau de manière à garantir la conservation de la quantité totale de chaque entité lors de leur transport entre le cytoplasme et le noyau. Ce nouveau modèle est alors composé de 18 équations et 58 paramètres.

En 2020, Brown *et al.* [21] ont développé un modèle de 14 équations (chaque variable représente un ARNm, une protéine ou un complexe de protéine) et 45 paramètres, construit selon les cinétiques d'action de masse et de Michaelis et Menten. A la différence des modèles décrits précédemment, aucune hypothèse de coopérativité n'a été faite (la fonction de Hill n'est pas utilisée dans les équations), et les termes de dégradation, non linéaires, sont décrits par des termes de Michaelis et Menten. La dynamique du système est construite autour des boucles de rétroaction entre ROR/REV/BMAL1 et PER/CRY/BMAL1. Les paramètres ont été calibrés à l'aide d'un algorithme qu'ils ont développé de manière à reproduire des observations expérimentales telles que les différences de phase entre les entités, les rapports entre le pic et le creux des oscillations ou les niveaux d'expression relatifs. Ce modèle reproduit également des résultats sur le comportement des oscillations suite à l'inactivation d'un gène.

Bien que tous basés sur les mêmes principes basales (EDOs, lois d'action de masse, termes de Michaelis et Menten, molécules principales des horloges circadiennes...), ces modèles rendent compte de la diversité des solutions possibles pour modéliser un même phénomène biologique selon l'approche, les hypothèses formulées, les choix de simplification faits, les données sur lesquelles la paramétrisation a été réalisée, ou encore les objectifs du modèle (quelles observa-

tions veut-on que le modèle capture ? observations qualitatives -ordre des pics,...-, quantitative -amplitudes, différences de phases,...-, conséquences de perturbations -augmentation, diminution de la période, ou arythmie, suite à l'inactivation de certains gènes,-, etc.).

De cette observation, nous pouvons nous demander comment est-ce que les cycles de tous ces modèles pourraient être comparés. Si certaines études apportent des réponses pour la question d'oscillateurs en général, nous dirigeons cette question précisément sur la comparaison entre les cycles de modèles d'horloges circadiennes de mammifères. La comparaison de ces cycles permettrait-elle de mettre au jour certaines propriétés partagées par tous les modèles ? Peut-on vérifier et retrouver ces propriétés dans les données expérimentales ? Cette question sera étudiée et une solution proposée dans le Chapitre 4.

1.3 Plan du manuscrit

Au sein de cette thèse, des outils et méthodes numériques, mathématiques et théoriques sont développés afin d'aider à la compréhension du fonctionnement et des mécanismes de synchronisation des horloges circadiennes. Cette thèse est liée au projet InSync dont l'objectif principal est le développement de méthodes expérimentales, numériques et théoriques dans le but de mieux comprendre les processus sous-jacents de synchronisation des horloges hépatiques des souris.

La synchronisation des neurones dans le SCN a été étudiée à l'aide de divers modèles [41], [65], [87], montrant que le mécanisme de couplage nécessite une communication intercellulaire via des jonctions communicantes et des neurotransmetteurs. La synchronisation des horloges dans d'autres organes ou tissus a été essentiellement étudiée comme un résultat du contrôle du SCN ou de l'influence de signaux externes tels que la lumière ou l'alimentation [106], [151], [152].

En nous appuyant sur les observations suivantes :

- la cohérence de phase des horloges hépatiques persiste en l'absence de synchroniseur extérieur, grâce à un mécanisme qu'il reste à découvrir (selon des résultats expérimentaux *in vivo* [135]);
- les horloges des cellules du SCN communiquent entre elles au travers de jonction communicantes et de neurotransmetteurs [41];
- des hépatocytes en culture sont localement et faiblement couplés, au sein de clusters de 7 cellules (selon des résultats expérimentaux *in vitro* [74]);
- les horloges périphériques se couplent via des signaux paracrines, dont une molécule messagère/de signalisation pourrait être le facteur de croissance transformant $TGF\beta$ (selon des résultats expérimentaux *in vitro* [52]),

nous faisons dans cette thèse l'hypothèse que les hépatocytes demeurent synchronisées en l'absence de l'horloge centrale ou autre signal extérieur grâce à des mécanismes de couplage impliquant des molécules messagères qui agiraient directement sur un gène circadien.

Ainsi, le **Chapitre 2** présente des résultats obtenus suite à une étude numérique sur la synchronisation d'oscillateurs circadiens couplés. Il inclut une description du modèle mathématique proposé, des données expérimentales considérées et des résultats des simulations obtenus. La synchronisation des oscillateurs est étudiée sous différentes conditions, permettant d'explorer l'hypothèse du couplage.

Dans l'idée de mieux pouvoir décrire l'effet du couplage sur la synchronisation et sur les cycles des oscillateurs circadiens, le **Chapitre 3** se concentre sur l'étude de la dynamique d'un unique cycle circadien et propose une caractérisation des différentes étapes par lesquelles passe un oscillateur circadien au cours de son cycle. Il retrace notre processus de réflexion aboutissant à la construction d'un modèle affine par morceaux approximant un modèle continu construit avec des termes non linéaires polynomiaux. Il propose également un Algorithme permettant d'explorer l'espace de valeurs de seuils réelles conduisant à des oscillateurs avec le même comportement dynamique, défini par une séquence spécifique de transitions entre des régions de l'espace de phases discrétisé. La robustesse de ce système circadien, ainsi que l'existence d'un cycle périodique dans l'espace de phases sont démontrés.

L'étude présentée dans le Chapitre 3 a motivé le développement d'une méthode pour caractériser quantitativement la dynamique de n'importe quel cycle circadien. Le **Chapitre 4** contient une description approfondie du déroulement temporel des événements moléculaires qui constituent le cycle circadien des horloges du foie de la souris. Puis, ce Chapitre décrit une méthode et l'algorithme associé calculant automatiquement des valeurs de seuils pour vérifier qu'un cycle circadien donné suive une séquence spécifique d'étapes. Appliquée aussi bien à des données expérimentales qu'à cinq modèles de la littérature, cette méthode met en avant certaines caractéristiques quantitatives et temporelles partagées par tous les cycles ou bien révèle des incohérences dans la dynamique des protéines. Elle facilite l'analyse et la comparaison de divers cycles circadiens, indépendamment de leurs amplitudes, de leurs unités ou de leur période. En outre, cette méthode permet d'étudier les effets de perturbations sur la dynamique du cycle circadien.

A noter que les Chapitres 3 et 4 reproduisent chacun un article publié. Ils sont donc écrits sous forme d'article, et en anglais.

Dans le **Chapitre 5**, la méthode de caractérisation développée dans les Chapitres précédents est utilisée pour étudier l'impact du couplage sur les cycles de deux, puis d'un ensemble,

d'oscillateurs circadiens couplés. Elle permet de comparer et caractériser la dynamique des oscillateurs avant et après couplage.

Enfin, le **Chapitre 6** consiste en une conclusion générale des résultats obtenus et en une discussion traitant des problématiques ayant émergé et des perspectives futures.

Chapitre 2

Synchronisation d'un réseau d'horloges circadiennes périphériques couplées

Ce Chapitre développe des résultats numériques relatifs à la synchronisation des horloges circadiennes périphériques en partie publiés dans l'article "Cycle dynamics and synchronization in a coupled network of peripheral circadian clocks" en 2022 dans *Interface Focus* [24].

Dans le SCN, la forte cohérence de phase entre les neurones est favorisée par des mécanismes de couplage impliquant des neurotransmetteurs et des jonctions communicantes. L'idée que les neurones du SCN soient les seules cellules capables de coupler leurs horloges dynamiquement a été remise en question par de récentes expériences montrant que les hépatocytes étaient capables de maintenir des oscillations durables et un certain degré de synchronisation au cours du temps en l'absence d'un SCN fonctionnel [135], au travers d'un mécanisme qu'il reste à découvrir mais qui pourrait impliquer le facteur de croissance transformant $TGF\beta$ [52].

Dans ce Chapitre, nous explorons l'hypothèse du couplage entre les horloges circadiennes périphériques au travers d'une étude numérique. Notre modèle de réseau d'horloges circadiennes couplées dérive d'un modèle mathématique réduit de l'horloge circadienne développé par Almeida *et al.* [3], [4] et est présenté dans la première partie. La seconde partie consiste en une étude numérique de la synchronisation de deux oscillateurs circadiens couplés, tandis que la troisième partie vise à reproduire numériquement des résultats expérimentaux de l'impact du régime alimentaire sur la synchronisation d'horloges périphériques de souris [135].

Nous observons d'une part que les différences de périodes initiales, la force de couplage, ou bien encore le type de régime alimentaire jouent un rôle dans la synchronisation des oscillateurs, et d'autre part, que le modèle d'horloges couplées reproduit plus fidèlement certains des résultats expérimentaux que le modèle non couplé.

2.1 Modèle de couplage entre horloges circadiennes périphériques

Notre étude se base sur le modèle réduit d'horloge circadienne développé par Almeida *et al.* [3] qui décrit la dynamique entre le complexe de protéines CLOCK:BMAL1 (noté B), les protéines DBP (D) et REV-ERB (R) et le complexe PER:CRY (P). Une description plus approfondie est présentée dans l'introduction du manuscrit 1.2.3. La robustesse et la taille réduite de ce modèle calibré avec des données expérimentales rendent ce modèle approprié pour modéliser et simuler le couplage entre plusieurs oscillateurs circadiens périphériques.

Afin d'étudier la synchronisation d'oscillateurs ayant des périodes initiales différentes, nous ajoutons dans le modèle réduit d'Almeida *et al.* [3] deux nouveaux paramètres (Équations 2.1) : (i) pour faire varier la période de l'oscillateur en fonction du niveau d'expression du gène *Cry2* [158] et (ii) prendre en compte le rôle du gène *Per2* dans la communication intercellulaire [52]. Bien que les protéines PER et CRY ne soient pas représentées spécifiquement dans le modèle réduit, leur complexe PER:CRY est décrit par la variable P . Ces deux nouvelles considérations sont alors incluses dans le modèle en modifiant l'équation de \dot{P} de deux manières différentes, comme expliqué ci-après.

Pour faire varier la période, nous suivons des résultats expérimentaux montrant que les souris présentant une inactivation du gène *Cry2* ont une période plus longue que les souris de "type sauvage" (wildtype) [18], [158]. Nous modélisons cette observation en ajoutant un facteur ε dans l'équation de PER:CRY : $\dot{P} = \varepsilon V_D D - \gamma_B B P$. $\varepsilon < 1$ décrit une plus faible disponibilité de la protéine *CRY2* et donc un taux de formation du complexe PER:CRY plus faible (εV_D). Dans notre modèle, les périodes augmentent à mesure que $\varepsilon < 1$ décroît, comme dans le cas des cellules ayant le gène *Cry2* déficient. Les équivalences entre les valeurs de ε et les périodes des oscillations résultantes sont représentées par la Table 2.1, et se retrouvent dans la Figure 2.4 (courbe bleue en pointillés).

| | | | | | | | | |
|---------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| ε | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.7 | 0.8 | 0.85 | 0.9 | 0.95 |
| Période (h) | 27.2 | 27.2 | 26.7 | 26.3 | 25.8 | 25.5 | 25.2 | 24.8 |
| ε | 1.0 | 1.05 | 1.1 | 1.15 | 1.2 | 1.4 | 1.6 | 1.8 |
| Période (h) | 24.5 | 24.1 | 23.8 | 23.4 | 23.0 | 21.4 | 19.6 | 17.9 |

TABLE 2.1 – Equivalences entre les valeurs de ε et la période de l'oscillateur impacté

Diverses études précédemment publiées montrent que le gène *Per2* est impliqué dans de multiples voies de signalisation, à la fois dans le SCN et dans les organes périphériques [11], [143]. En addition, des données expérimentales récentes [52] montrent que la signalisation paracrine stimule la transcription de *Per2*, suggérant que le gène *Per2* joue un rôle précoce dans la communication intercellulaire. Nous représentons cette communication de manière diffusive via un terme de couplage (k) ajouté à la variable P du complexe PER:CRY. Bien qu'il s'agisse

d'une représentation très simplifiée, elle évite l'introduction de nouvelles variables non calibrées dans le modèle et nous permet de poursuivre notre étude.

Les équations suivantes décrivent alors notre modèle de couplage :

$$\begin{aligned}
 \dot{B}_i &= V_R h^-(R_i) - \gamma_B B_i P_i, \\
 \dot{D}_i &= V_B B_i - \gamma_D D_i, \\
 \dot{R}_i &= V_D D_i - \gamma_R R_i, \\
 \dot{P}_i &= \varepsilon_i V_D D_i - \gamma_B B_i P_i + k(P_j - P_i),
 \end{aligned}
 \tag{2.1}$$

avec

$$\begin{aligned}
 h^-(R_i) &= \frac{k_{Rr}^4}{k_{Rr}^4 + R_i^4}, V_R = 44.4\%.h^{-1}, k_{Rr} = 80.1\%, V_B = 0.142\%.h^{-1}, \\
 V_D &= 19\%.h^{-1}, \gamma_R = 0.241h^{-1}, \gamma_D = 0.156h^{-1}, \gamma_B = 2.58h^{-1}
 \end{aligned}
 \tag{2.2}$$

Figure 2.1 illustre les interactions entre deux horloges tel que décrit par notre modèle de couplage.

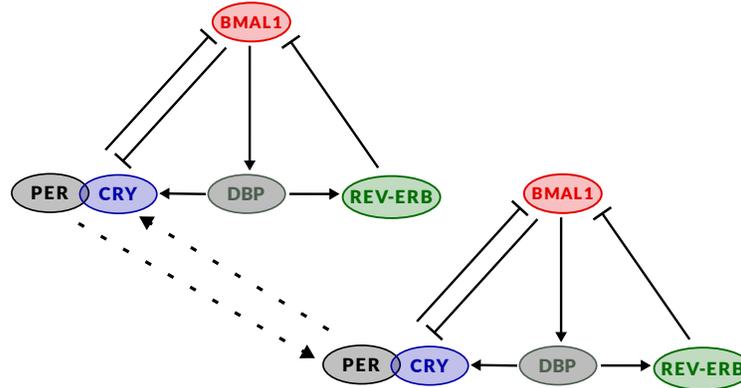


FIGURE 2.1 – Schéma des interactions entre les entités de deux horloges circadiennes couplées, tel que décrit par les Equations 2.1. Les flèches pleines représentent une activation, les flèches à tête plate une inhibition et les flèches en pointillés le couplage. Le couplage est diffusif, et via le complexe PER:CRY.

Dans les sections suivantes, nous analysons l'effet de ε et de k au sein d'un système de deux horloges couplées puis dans un réseau d'horloges (plus que 2), selon différentes forces de couplage et un intervalle pour les périodes défini tel que $\varepsilon_{min} < \varepsilon < \varepsilon_{max}$.

2.2 Synchronisation d'un système de deux horloges circadiennes couplées

En utilisant le modèle de couplage présenté dans la section précédente et appliqué à deux oscillateurs (l'un avec $\varepsilon_1 = 1$ et l'autre avec $\varepsilon_2 = \varepsilon$), nous étudions leur synchronisation en fonction de leur différence de périodes initiales (la période initiale d'un oscillateur fait référence à la période de l'oscillateur lorsqu'il n'est ni couplé, ni perturbé, et qui est ajustée via le facteur ε), de la force de couplage k et selon quatre critères de synchronisation définis en termes (i) de différence totale entre les variables, (ii) de périodes, (iii) de différences de phase, et (iv) de nombre de cycles nécessaires pour synchroniser ou désynchroniser deux oscillateurs suite à l'ajout / retrait du couplage.

Il est important de noter que le terme de couplage perturbe les cycles individuels de chaque oscillateur couplé et que, en fonction des paramètres, les oscillateurs couplés peuvent converger ou non vers un cycle limite. Figure 2.2 représente les séries temporelles et la projection sur le plan (PER:CRY,REV-ERB) des portraits de phase de deux oscillateurs couplés qui convergent vers un cycle limite (Figure 2.2(b,d), $k = 0.3$) ou non (Figure 2.2 (a,c), $k = 0.04$).

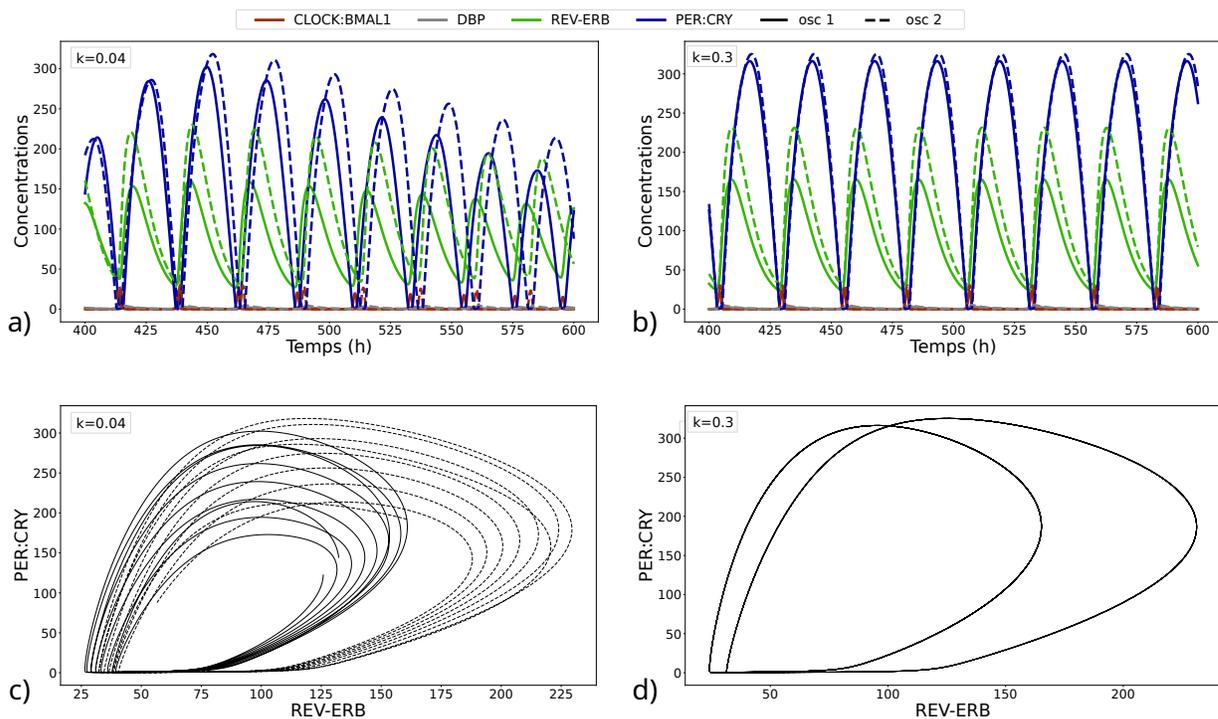


FIGURE 2.2 – Séries temporelles et projection sur le plan (PER:CRY,REV-ERB) des portraits de phase de deux oscillateurs couplés, avec $\varepsilon_1 = 1$ et $\varepsilon_2 = 0.6$ et (a,c) $k = 0.04$ et (b,d) $k = 0.3$.

2.2.1 Synchronisation en termes de différence totale entre les variables

La première méthode que nous utilisons pour quantifier le degré de synchronisation entre deux oscillateurs couplés se base sur le calcul de la différence entre les séries temporelles de chaque oscillateur, en chaque point de temps. Plus spécifiquement, la différence entre les séries temporelles de la variable X ($X \in \{B, D, R, P\}$) s'écrit $r_X(t) = X_1(t) - X_2(t)$. La différence totale, appelée $r(t)$, est donnée par l'Équation 2.3 :

$$|r(t)| = \sqrt{r_B(t)^2 + r_D(t)^2 + r_R(t)^2 + r_P(t)^2}, \quad (2.3)$$

avec $r_B(t) = B_1(t) - B_2(t)$, $r_D(t) = D_1(t) - D_2(t)$, $r_R(t) = R_1(t) - R_2(t)$, $r_P(t) = P_1(t) - P_2(t)$. Nous évaluons le degré de synchronisation en fonction de la valeur du maximum de $|r(t)|$.

Figure 2.3 illustre les effets des différences de périodes initiales et de la force de couplage sur le maximum de la différence totale $|r| : \max|r|$ augmente avec la perturbation $(1 - \varepsilon)$ et décroît avec la force de couplage k . Dans le cas de périodes égales (c'est-à-dire $1 - \varepsilon = 0$), l'erreur converge vers zéro et les deux horloges se synchronisent exactement. A l'inverse, dans le cas de périodes initiales différentes (c'est-à-dire $1 - \varepsilon \neq 0$), une plus grande force de couplage ne permet pas une synchronisation exacte des oscillateurs, mais entraîne une diminution de l'erreur.

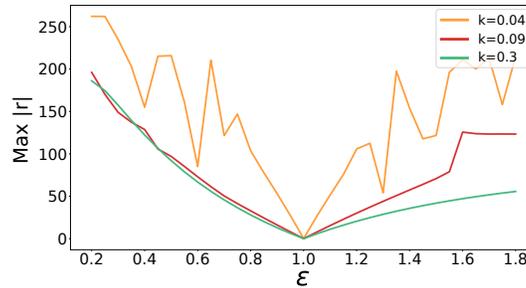


FIGURE 2.3 – Maximum de la différence totale $|r(t)| = \sqrt{r_B(t)^2 + r_D(t)^2 + r_R(t)^2 + r_P(t)^2}$ en fonction de ε , pour un système de deux oscillateurs couplés (2.1). Les paramètres sont ceux listés dans 2.2.

A noter que lorsque les oscillateurs ne sont pas synchronisés entre eux, et ne sont pas sur un cycle limite, la valeur du $\max|r|$ dépend de l'intervalle de temps de la série temporelle sur lequel le maximum de $|r|$ est calculé. Dans la Figure 2.3, les fortes variations de la courbe orange à mesure que $(1 - \varepsilon)$ augmente sont liées au fait que les oscillateurs ne sont pas synchronisés entre eux.

2.2.2 Synchronisation en termes de périodes

Une autre approche pour définir la synchronisation entre deux oscillateurs couplés (de périodes initiales différentes) consiste à considérer qu'ils sont synchronisés si leurs périodes convergent vers une valeur identique.

Figure 2.4 montre la durée des périodes de chacun des deux oscillateurs en fonction de ε , pour un système non couplé (en bleu) ou couplé selon trois valeurs de force de couplage ($k = 0.04$ en orange, $k = 0.09$ en rouge et $k = 0.3$ en vert). Les lignes pleines représentent l'oscillateur 1 et les lignes en pointillés l'oscillateur 2, dont la période initiale varie avec ε .

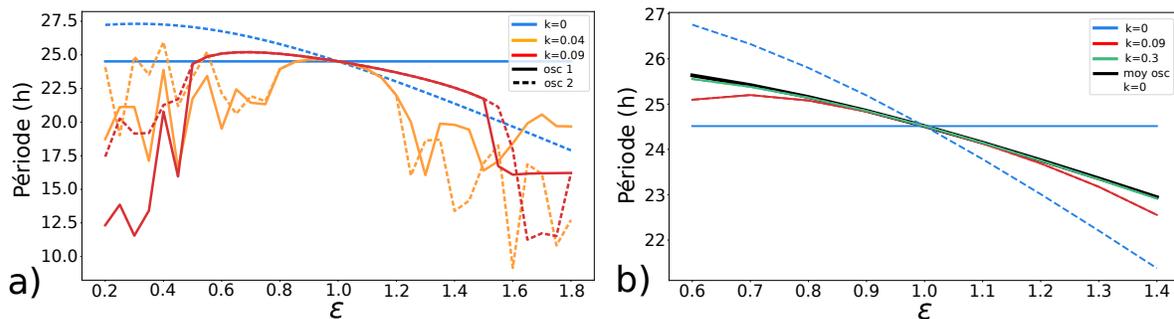


FIGURE 2.4 – (a,b) Périodes de l'oscillateur 1 ($\varepsilon_1 = 1$, ligne pleine) et de l'oscillateur 2 ($\varepsilon_2 = \varepsilon$, ligne pointillée) lorsqu'ils ne sont pas couplés (bleu), ou couplés avec $k = 0.04$ (orange, figure (a) uniquement), $k = 0.09$ (rouge) ou $k = 0.3$ (vert, figure (b) uniquement). La courbe noire de (b) représente la moyenne des périodes des deux oscillateurs lorsqu'ils ne sont pas couplés.

Une plus grande force de couplage permet la synchronisation des périodes sur un intervalle plus large autour de $\varepsilon = 1$ (pour ε entre 0.8 et 1.2 pour $k = 0.04$ et pour ε entre 0.5 et 1.5 pour $k = 0.09$, Figure 2.4(a)). Cette synchronisation en termes de périodes résulte d'un ajustement des périodes de chaque oscillateur sur une même période.

Les fortes variations de périodes que l'on peut observer lorsque les valeurs de ε s'éloignent de 1 (courbes orange et rouge de la Figure 2.4(a)) mettent en évidence que les oscillateurs ne se synchronisent pas en termes de périodes pour ces valeurs de ε .

Lorsque ε est dans un voisinage de 1, et inférieur à 1 (partie modélisant des cellules dont le gène *Cry2* est déficient), les périodes de l'oscillateur 2 couplé avec une force de couplage de $k = 0.04$ sont raccourcies jusqu'à 1h de différence avec celles lorsqu'il n'y a pas de couplage (différences entre les courbes bleues et oranges en pointillés) tandis que celles de l'oscillateur 1 restent approximativement les mêmes au voisinage de $\varepsilon = 1$ (courbe bleue pleine par rapport à la courbe orange), en bon accord avec les observations récentes de Finger *et al.* [52] (Figure 1 H, J dans cette référence).

Lorsque la force de couplage devient grande (pour $k = 0.3$ par exemple), la période à laquelle les oscillateurs se synchronisent devient très proche de la moyenne des périodes initiales

des oscillateurs (Figure 2.4(b) courbe verte par rapport à la courbe noire), comme ce qui a pu être observé pour des horloges du SCN [79], [87].

2.2.3 Synchronisation en termes de phases

Bien que synchronisés en termes de périodes pour un certain intervalle autour de $\varepsilon = 1$, les oscillateurs présentent une différence de phase : en particulier, le pic de P de l'oscillateur dont la période initiale est la plus longue est retardé par rapport au pic de P de l'autre oscillateur (voir Figure 2.5(a)). Encore une fois, un plus fort couplage réduit l'écart entre les deux oscillateurs, comme le montre le plus faible décalage de phase de la courbe verte par rapport aux courbes rouge et orange. De plus, pour chaque courbe, la différence de phase diminue à mesure que ε se rapproche de 1 (autrement dit que la différence de périodes initiales diminue).

Si l'on utilise différentes définitions de la phase, et que l'on considère désormais que les valeurs maximales et minimales de B , R et P représentent des phases, et si l'on calcule la différence de phase entre l'oscillateur 2 et l'oscillateur 1 couplés avec $k = 0.09$ pour chaque nouvelle définition de phase, une observation intéressante ressort (voir Figure 2.5(b)). Non seulement les oscillateurs (synchronisés en termes de périodes) sont déphasés par rapport au pic de P (comme vu au paragraphe précédent) mais en plus le déphasage n'est pas le même selon les variables et selon le moment du cycle : la différence de phase entre les valeurs maximales de P est jusqu'à 1h plus grande que celles de B et R ou des valeurs minimales de P (qui sont similaires entre elles - voir courbe bleue pleine par rapport aux autres courbes). Cette observation suggère que, malgré leur synchronisation en termes de périodes, chaque oscillateur a sa propre dynamique.

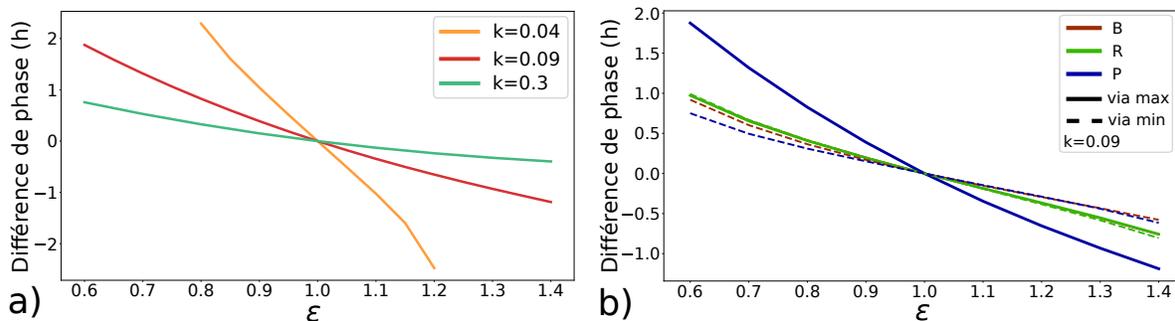


FIGURE 2.5 – (a) Différence de phase entre le pic (valeur maximale) de P de l'oscillateur 2 ($\varepsilon \neq 1$) par rapport à celui de l'oscillateur 1 ($\varepsilon = 1$) pour des oscillateurs synchronisés en périodes, avec un couplage de $k = 0.04$ en orange, $k = 0.09$ en rouge et $k = 0.3$ en vert. (b) Différences de phase entre les valeurs maximales (courbes pleines) et minimales (courbes en pointillés) de B , R et P de l'oscillateur 2 par rapport à l'oscillateur 1, lorsqu'ils sont couplés avec $k = 0.09$.

2.2.4 Nombre de cycles nécessaires pour synchroniser ou désynchroniser deux oscillateurs

Finalement, pour étudier les capacités de (dé)synchronisation de deux oscillateurs, nous calculons (i) le nombre de cycles nécessaires pour désynchroniser deux oscillateurs synchronisés une fois le couplage désactivé et (ii) le nombre de cycles nécessaires pour que deux oscillateurs non couplés se synchronisent suite à l'ajout d'un couplage. Pour cette deuxième étape, nous considérons plusieurs différences de phase (la phase étant définie par le pic de P) initiales (0h, 5h et 12h), et supposons que les oscillateurs sont synchronisés quand leurs différences de périodes sont inférieures à 0.2h et que leurs oscillations sont stables.

Figure 2.6 montre le nombre de cycles nécessaires pour désynchroniser ou synchroniser deux horloges, dont l'une des périodes varie avec le terme ε . Pour les deux forces de couplage étudiées, le retrait du couplage provoque une désynchronisation immédiate des deux oscillateurs (Figure 2.6(a)). En revanche, trois facteurs influencent le nombre de cycles nécessaires pour synchroniser les oscillateurs en termes de périodes : (i) la différence de période initiale ($1 - \varepsilon$), (ii) la différence de phase initiale et (iii) la force de couplage. Ainsi, plus les différences entre les périodes et entre les différence de phase initiales sont faibles, et plus le couplage est grand, plus les deux oscillateurs se synchronisent rapidement (moins de cycles seront nécessaires avant une effective synchronisation).

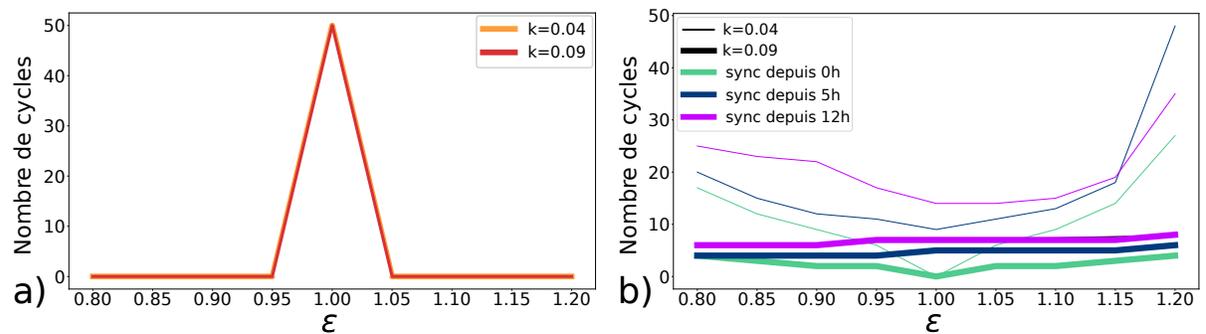


FIGURE 2.6 – Nombre de cycles nécessaires pour (a) désynchroniser ou (b) synchroniser deux oscillateurs selon plusieurs différences de phase initiales, suite au retrait ou à l'ajout d'un terme de couplage (la force de couplage est $k = 0.04$ pour les courbes fines et $k = 0.09$ pour celles épaisses).

2.2.5 Conclusion intermédiaire

D'après ces premiers résultats, il apparaît que deux oscillateurs dont les périodes initiales sont proches tendent, suite à l'ajout d'un couplage, à se synchroniser via un ajustement mutuel de leurs périodes sur une même période. La valeur de cette "même période" se rapproche, à

mesure que la force de couplage augmente, de la moyenne des périodes des oscillateurs non couplés. Cette synchronisation en termes de périodes n'implique pour autant pas une synchronisation parfaite, avec entre autre une différence totale entre les variables et une différence de phase (l'oscillateur ayant la plus petite période initiale est en avance de phase par rapport à l'autre oscillateur) persistantes. Ces différences diminuent avec une augmentation de la force de couplage et une diminution de la différence de périodes initiales.

2.3 Synchronisation d'un cluster d'horloges circadiennes en réponse à un régime alimentaire spécifique

Jusqu'à présent, nous avons étudié la synchronisation entre deux oscillateurs couplés. Par la suite, nous nous basons sur des résultats expérimentaux [74], [135] et utilisons notre modèle pour appréhender l'effet du couplage sur la synchronisation d'horloges hépatiques au sein d'un cluster soumis à différents types de régimes alimentaires. Cette section présente les résultats expérimentaux considérés, et explique les choix de modélisation envisagés et pris pour reproduire numériquement les expériences.

2.3.1 Les expériences de Sinturel *et al.* [135]

Sinturel *et al.* [135] ont étudié le rôle du SCN et des régimes alimentaires sur la rythmicité et synchronisation de l'ensemble des horloges périphériques, puis spécifiquement sur les hépatocytes. Leurs expériences ont été réalisées sur des souris (*in vivo*).

Synchronisation des horloges périphériques en réponse aux régimes alimentaires

D'abord, Sinturel *et al.* ont soumis des souris dont le SCN était lésé et des souris contrôles au même protocole : gardées en obscurité constante, les souris avaient à disposition de la nourriture à volonté pendant vingt jours, puis de manière restreinte durant une vingtaine de jours sur un schéma de jeûn-nourriture de 12h-12h avec une inversion des périodes de jeûn et de nourriture au milieu, et finalement, la nourriture était de nouveau laissée à volonté.

Les auteurs ont récupéré les oscillations circadiennes de l'ensemble des organes périphériques des souris grâce au rapporteur PER2::luciférase, et ont pu observer (i) des oscillations rythmiques et de grande amplitude chez les souris contrôle, peu importe le régime alimentaire, (ii) des oscillations arhythmiques et amorties chez les souris dont le SCN était lésé en période de régime à volonté, (iii) des oscillations rythmiques et de grande amplitude chez les souris dont le SCN était lésé en période de régime restreint.

Ces résultats suggèrent que les horloges périphériques des souris se désynchronisent en l'absence d'un synchroniseur ou d'un SCN fonctionnel. En revanche, un signal rythmique, tel que l'alternance de périodes de jeûn et de nourriture de 12h-12h, permet de rétablir des oscillations

rythmées et de grande amplitude au niveau de l'ensemble des organes périphériques (voir Fig2 ABEFG de [135]).

Synchronisation des horloges hépatiques

A la suite de l'expérience décrite précédemment, les auteurs ont néanmoins observé une rythmicité résiduelle de *PER2::luc* chez les souris nourries à volonté (et dont le SCN était lésé), les laissant suggérer une cohérence de phase persistante entre certains oscillateurs malgré l'absence de synchroniseur extérieur.

Pour vérifier leur hypothèse, ils ont étudié la rythmicité des horloges hépatiques (via le gène *Rev-erba*) des souris (avec et sans SCN lésé) en conditions constantes (obscurité et nourriture à volonté). Leurs résultats montrent que l'amplitude du pic de la transformée de Fourier rapide (FFT) des oscillations de la luciférase *Rev-erba* dans le foie est similaire entre les souris avec et sans SCN lésé. Ainsi, les hépatocytes sont capables de maintenir une certaine cohérence de phase en l'absence de synchroniseurs extérieurs.

Finalement, les auteurs sont allés plus loin et ont montré que les hépatocytes restaient synchronisés même chez des souris ne présentant des oscillateurs circadiens que dans le foie (c'est-à-dire en l'absence totale de signaux non hépatiques).

2.3.2 Reproduction numérique des expériences de Sinturel *et al.*

Cette section présente le cadre de modélisation numérique développé pour reproduire les résultats expérimentaux de Sinturel *et al.*, et ainsi étudier l'effet du couplage sur la synchronisation des horloges hépatiques.

Topologies de communication intercellulaire envisagées suivant l'organisation des cellules dans le foie

Le foie est un organe multifonctionnel capable d'assurer plus de 500 fonctions (stockage des nutriments, sécrétion de bile, synthèse de protéines, élimination de toxines, régulation de la glycémie, etc.) avec peu de différents types cellulaires. Cet organe est très irrigué (voir Figure 2.7), avec notamment deux flux de sang entrant (le principal passe par la veine porte, et transporte des nutriments en provenance de l'intestin tandis que le second provient du cœur, passe par l'artère hépatique et est riche en oxygène), un flux sortant (transportant le flux de bile produit par les hépatocytes), et de nombreux canaux d'irrigation circulant au sein des lobules hépatiques. Chaque lobule comporte des millions d'hépatocytes organisés en rangées parallèles et en couches superposées. Toutefois, du fait du grand nombre de canaux d'irrigation circulant entre les hépatocytes, le foie a une structure aérée et peu compacte/dense.

Suivant ces observations, nous considérons les configurations de communication intercellulaire suivantes (voir Figure 2.8) : en "étoile", "all-to-all" (ou "maillage complet"), en "anneau",

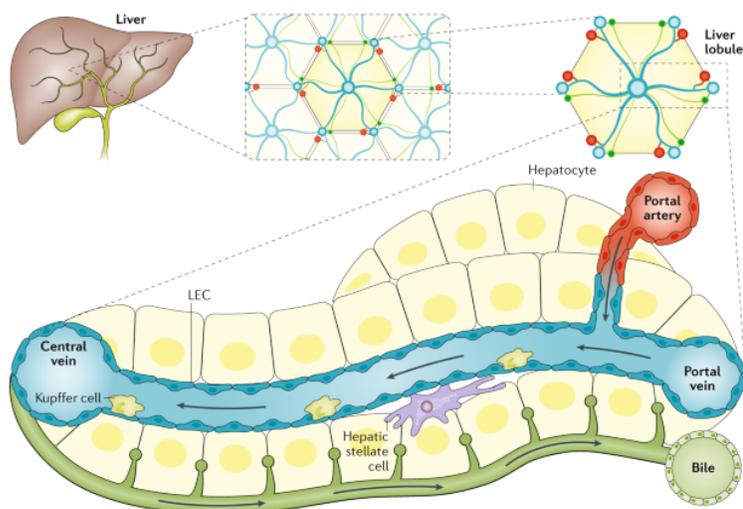


FIGURE 2.7 – Schéma représentant l'organisation au sein du foie, venant de [14].

en "lignes" et en "chaîne".

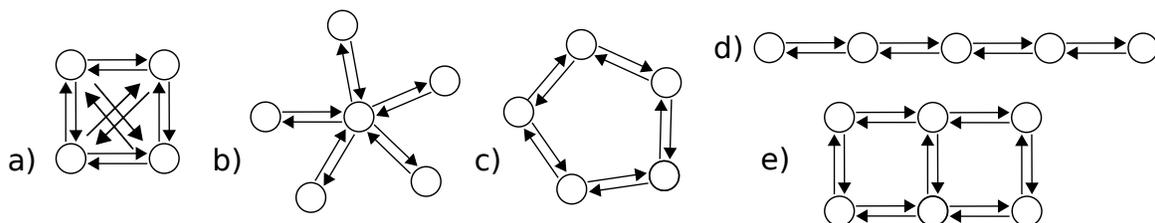


FIGURE 2.8 – Différentes topologies de communication intercellulaire envisagées. (a) All-to-all (b) Étoile (c) Anneau (d) Chaîne (e) Rangées. Chaque cercle représente une cellule communiquant de manière directe et diffusive avec une ou plusieurs autres cellules, tel que symbolisé par chaque flèche.

Modélisation des régimes alimentaires

Dans le but de reproduire les résultats expérimentaux sur la synchronisation des horloges périphériques en réponse à différents régimes alimentaires, il est nécessaire d'inclure un nouveau terme modélisant l'apport alimentaire dans notre modèle.

Un apport alimentaire provoque une augmentation de la glycémie et amène les cellules β pancréatiques à sécréter de l'insuline [15] qui va permettre aux cellules du foie de stocker les molécules de glucose. Les niveaux de glucose et d'insuline sont directement liés. Nous représentons alors dans notre modèle l'apport alimentaire avec un terme décrivant les niveaux d'insuline ($I(t)$), que l'on ajoute dans l'équation de CLOCK:BMAL1, comme suit (Équation 2.4) :

$$\dot{B} = V_R h^-(R) - \gamma_B B P + I(t) \quad (2.4)$$

Nous modélisons une alimentation à volonté en laissant le terme d'insuline à une faible valeur constante ($I(t) = 2\%/h$), et une alimentation restreinte par un pic d'insuline de 2 heures et d'amplitude élevée, tel que $I(t) = 13\%/h$ pendant 2 heures une fois par cycle circadien (sinon $I(t) = 0\%/h$).

Résultats des simulations numériques

A la différence des expériences de Sinturel *et al.* précédemment décrites, où la même expérience avait été réalisée à la fois sur des souris avec un SCN lésé et des souris contrôle, notre modèle de couplage ne prend pas en compte l'influence du SCN sur les horloges périphériques. Nous nous focalisons donc uniquement sur la reproduction du protocole expérimental de la figure 2B de [135] (figure concernant les résultats de l'impact du régime alimentaire sur les horloges de souris dont le SCN est lésé).

Suivant l'hypothèse d'un faible couplage localisé au sein de clusters de 5 à 10 cellules [74], nous considérons un groupe de huit horloges périphériques individuelles dont les périodes initiales sont prises aléatoirement entre 23.01h et 26.32h, soit $0.7 \leq \varepsilon \leq 1.2$.

De manière analogue à l'expérience de Sinturel *et al.*, nous modélisons l'apport de nourriture à volonté des 20 premiers, et derniers, jours en laissant le terme d'insuline constant. Durant la vingtaine de jours intermédiaire, soit durant la période d'alimentation restreinte, l'insuline est ajoutée pendant 2 heures toutes les 24 heures.

Pour étayer notre hypothèse de couplage, nous réalisons les simulations de cette expérience :

- sur le réseau des huit horloges non couplées (Fig. 2.9(a))
- sur le réseau des huit horloges faiblement couplées ($k = 0.04$) en étoile (Fig. 2.9(b))

Figure 2.9 montre la concentration moyenne de PER:CRY, \bar{P} , parmi ces huit cellules, tel que $\bar{P}(t) = \frac{\sum_{i=1}^8 P_i(t)}{8}$.

Dans le cas où les horloges sont faiblement couplées, et de manière similaire aux résultats expérimentaux, le régime alimentaire restreint entraîne une augmentation des amplitudes par rapport au régime alimentaire à volonté (Figure 2.9(b)). Cette observation disparaît en l'absence de couplage (Figure 2.9(a)).

Figure 2.10 montre les séries temporelles individuelles de chaque oscillateur du réseau des huit cellules couplées en étoile selon différentes forces de couplage et selon les deux types de régimes alimentaires considérés. De ces résultats, nous pouvons observer que :

- en l'absence de couplage, ni le régime alimentaire à volonté, ni celui restreint ne permettent de synchroniser sur une même période les horloges entre elles ;

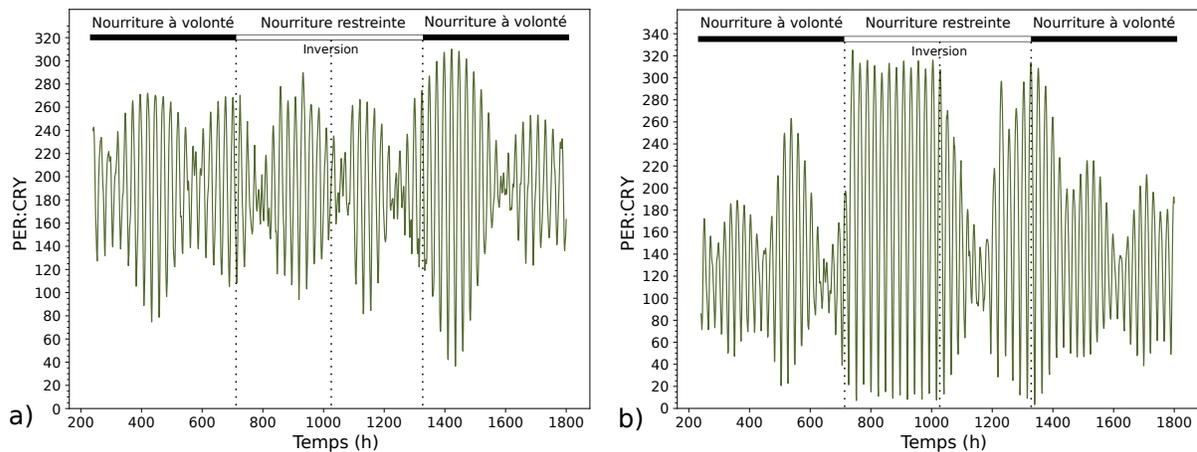


FIGURE 2.9 – Concentration moyenne de PER:CRY au cours du temps selon un régime alimentaire à volonté (bandes noires) ou restreint (bandes blanches), au sein d'un réseau de huit cellules avec différentes périodes initiales ($T_1 = 24.11h$, $T_2 = 23.48h$, $T_3 = 23.55h$, $T_4 = 26.29h$, $T_5 = 26.17h$, $T_6 = 26.15h$, $T_7 = 24.95h$ et $T_8 = 24.58h$). (a) Sans couplage et (b) topologie en étoile avec $k = 0.04$.

- un faible couplage ne permet pas de synchroniser les horloges sur une même période lorsque la nourriture est à volonté ;
- la combinaison d'un faible couplage et d'un régime régulier entraîne une synchronisation des huit oscillateurs en termes de périodes, et augmente significativement l'amplitude des oscillations ;
- un fort couplage synchronise tous les oscillateurs sur une même période, peu importe le régime alimentaire.

Finalement, les simulations de réseau d'horloges faiblement couplées en étoile sont celles qui sont les plus semblables aux résultats expérimentaux : le faible couplage entraîne une augmentation des amplitudes et synchronise les oscillateurs sur une même période lors des intervalles de temps pendant lesquels la nourriture est restreinte par rapport aux intervalles de temps où la nourriture est à volonté.

2.3.3 Analyse quantitative de la synchronisation avec des FFT

Les résultats qui suivent ont pour but d'approfondir et de quantifier ceux obtenus précédemment. Notamment, en plus des deux types de régimes alimentaires et de différentes forces de couplage, nous étudions la synchronisation des horloges en fonction de différentes topologies et de différentes valeurs du terme d'insuline. Dans cette section, la synchronisation est évaluée à partir de l'amplitude des pics des transformées de Fourier rapide (FFT), calculées sur des séries temporelles s'étendant sur une période de temps entre 2300 et 3000h.

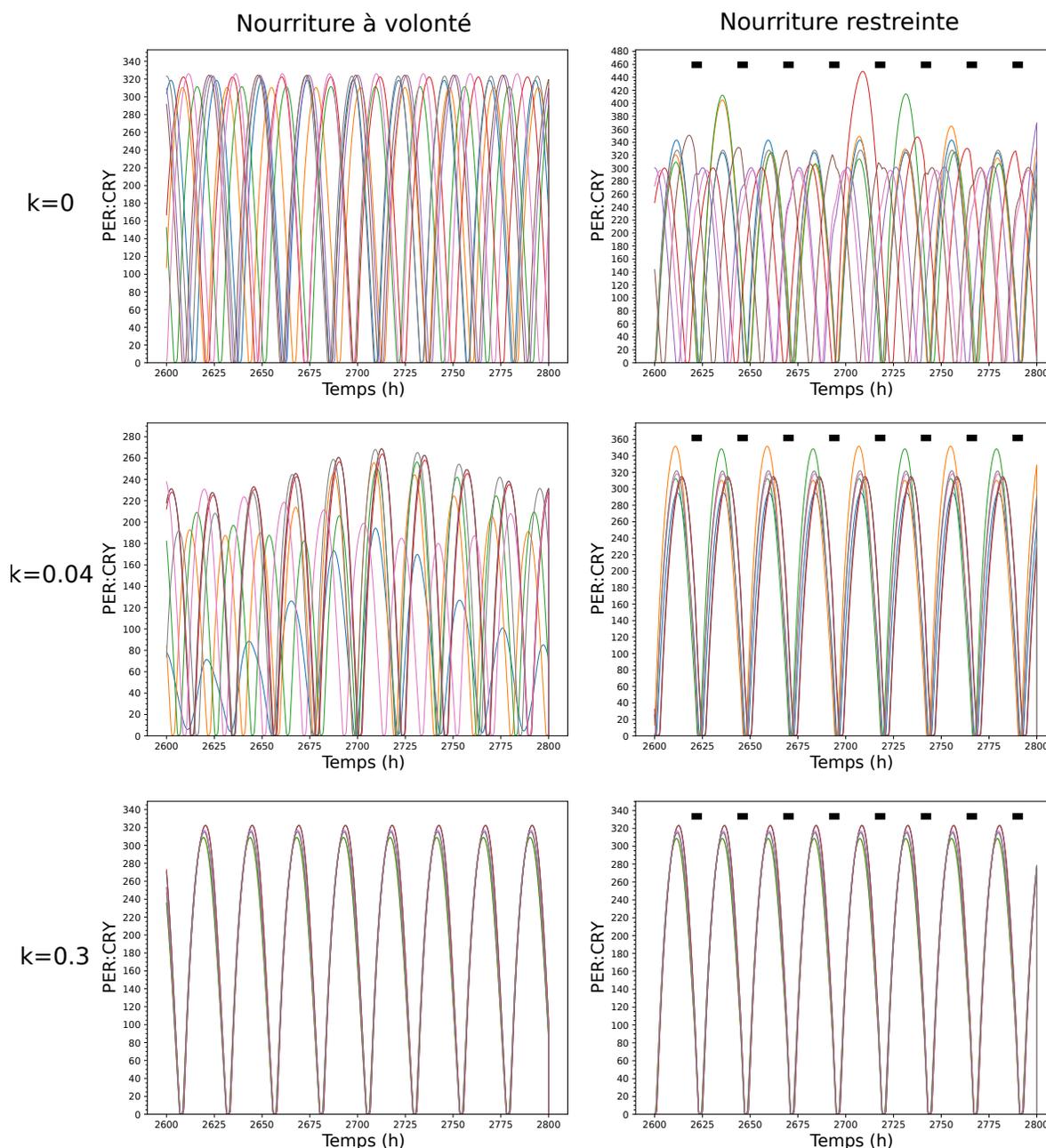


FIGURE 2.10 – Impact du régime alimentaire et de la force de couplage sur les oscillations d’un réseau d’horloges organisées en étoile. Les pointillés noirs indiquent le moment du pulse.

Effet de la topologie sur la synchronisation des horloges en réponse à différents régimes alimentaires

Figure 2.11 montre les FFT des séries temporelles de la concentration moyenne de PER:CRY du même groupe de huit cellules que celui de la Figure 2.10, selon les cinq topologies précé-

demment décrites (Figure 2.8), selon trois forces de couplage, et en réponse aux deux régimes alimentaires.

En l'absence de couplage (Figure 2.11, courbes bleues), et pour un régime alimentaire à volonté (figures de gauche), les FFT présentent deux pics de faible amplitude, de périodes autour de 23.2h et 25.5h. Dans le cas du régime restreint (figures de droite), un pic de faible amplitude apparaît. En l'absence de couplage, les oscillateurs ne parviennent pas à tous se synchroniser sur une même période.

Suite à l'ajout d'un couplage, des observations similaires ressortent de l'analyse des FFT pour les topologies en étoile, en anneau, et en rangées.

L'ajout d'un faible couplage de force $k = 0.04$ (Figure 2.11, courbes oranges) induit une diminution de la période du pic principal des FFT dans le cas d'un régime à volonté (colonne de gauche), bien que la FFT reste dispersé. A l'inverse, dans le cas d'un régime alimentaire restreint et d'un faible couplage (colonne de droite), les FFT montrent un unique pic très bien défini, d'amplitude au moins 2 fois supérieure à celle de la courbe bleue (sans couplage), et de période 24h (correspondant à la période du pulse d'insuline). Cette observation indique que le cluster de cellules couplées a la capacité de produire un signal cohérent significatif sous le régime d'alimentation restreint, ce qui correspond bien aux résultats expérimentaux de [135].

De plus, la comparaison des amplitudes des FFTs entre les deux types de régimes (courbes oranges) montre que les amplitudes des pics de la FFT correspondant à une alimentation restreinte sont significativement plus grandes que celles correspondant à un régime alimentaire à volonté, ce qui est en accord avec les résultats expérimentaux de [135] (Figure 2F).

Finalement, l'ajout d'un fort couplage ($k = 0.3$) induit un unique pic très bien défini, de grande amplitude, peu importe le régime alimentaire.

En revanche, dans le cas de la topologie all-to-all, les horloges se synchronisent très bien, peu importe la force de couplage ou le régime alimentaire. Cette forte synchronisation est probablement favorisée par la présence de couplage entre toutes les horloges 2 à 2.

Finalement, dans le cas d'un régime à volonté, et pour des forces de couplage identiques à celles appliquées aux autres schémas de communication intercellulaires, la topologie en chaîne ne permet pas une synchronisation du réseau d'horloges : les FFT se composent de nombreux pics indéfinis. L'ajout d'un pulse régulier (régime alimentaire restreint) entraîne néanmoins une synchronisation des horloges lorsqu'elles sont couplées.

Les résultats expérimentaux de Sinturel *et al.* indiquent que la rythmicité des oscillations de l'ensemble des horloges périphériques de souris ayant leur SCN lésé se restaure lors d'un régime alimentaire restreint par rapport à un régime à volonté. Parmi les configurations de

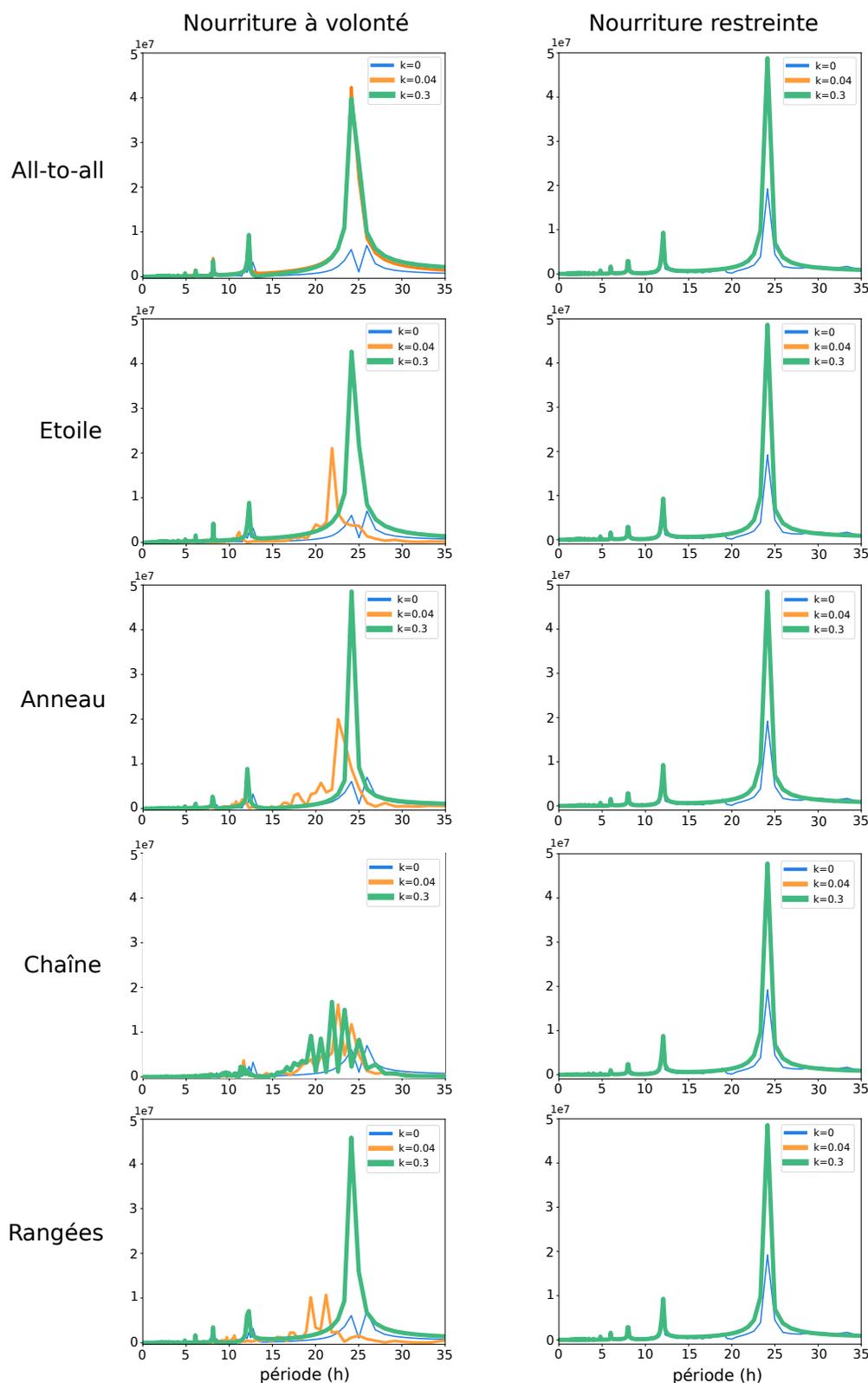


FIGURE 2.11 – FFT des séries temporelles de la moyenne de PER:CRY d’un réseau de huit horloges couplées selon 5 schémas topologiques différents, en réponse à un régime de nourriture à volonté ($I(t) = 2$, constant) et un restreint ($I(t) = 13$ par pulse de 2h toutes les 24h), en présence ou non de couplage (courbes bleues, oranges et vertes pour $k = 0$, $k = 0.04$ et $k = 0.3$ respectivement).

communication intercellulaire étudiées, les topologies en étoile, en rangées et en anneau reproduisent le mieux cette observation pour une force de couplage égale à 0.04. Même en présence de synchroniseur extérieur, un faible couplage est nécessaire pour garantir la synchronisation des horloges.

De plus, Sinturel *et al.* avaient observé une synchronisation des cellules hépatiques en l'absence de synchroniseurs extérieurs. Dans nos simulations, seul un couplage élevé permet de retrouver un pic des FFT très bien défini dans le cas d'une alimentation à volonté.

Impact de la valeur du paramètre représentant l'insuline

Pour compléter ces observations, nous prenons un intervalle plus large de valeurs de paramètres et mesurons les amplitudes du pic principal des FFT en fonction de différentes forces de couplage (entre $k = 0$ et $k = 0.3$) et de différentes valeurs d'insuline : entre 1 et 5 pour le régime à volonté et entre 10 et 18 pour le régime restreint (voir Figure 2.12).

Si les résultats montrés sont toujours ceux des huit oscillateurs dont les périodes initiales ont été définies dans la légende de la Figure 2.10, les résultats de réseaux d'horloges ayant d'autres périodes initiales sont similaires (voir Figure A.1 en Annexe).

Dans le cas de l'alimentation restreinte (colonne de droite), et peu importe la valeur du paramètre d'insuline, le cluster couplé montre un pic avec une amplitude significativement plus élevée qu'en l'absence de couplage, signifiant que les cellules se synchronisent sur la même période. A l'opposé, pour les clusters non couplés, le pic principal a une faible amplitude, laissant suggérer la présence de d'autres pics d'amplitudes comparables, et donc indiquant que les cellules non couplées sont faiblement ou non synchronisées.

Dans le cas d'une alimentation à volonté, et peu importe la valeur du paramètre d'insuline, l'amplitude des pics augmente graduellement avec le couplage, ce qui suggère que plus le couplage est fort, plus la synchronisation est importante. Dans la configuration "all-to-all", les horloges se synchronisent pour une force de couplage plus faible que celle nécessaire pour les autres topologies.

La variation du paramètre d'insuline n'a aucun effet significatif sur les résultats, et les observations sont similaires à celles précédemment établies.

2.4 Conclusion et discussion

Cette étude numérique a été motivée par de récentes observations expérimentales suggérant la présence d'un couplage intercellulaire entre les horloges circadiennes hépatiques qui contribuerait à maintenir des oscillations cohérentes en l'absence de l'horloge principale du SCN. En nous basant sur un modèle réduit de l'horloge circadienne des mammifères, calibré et validé par

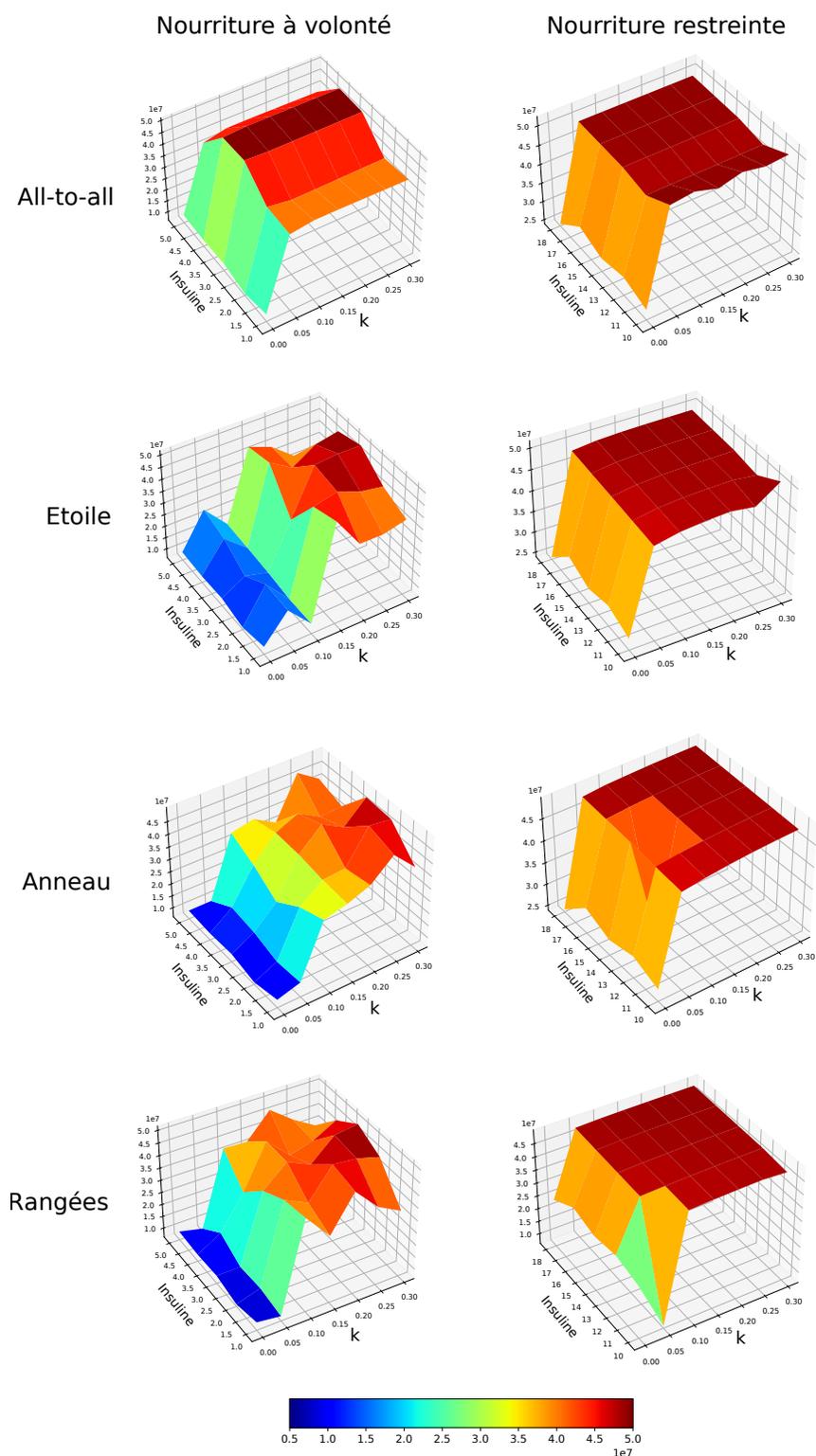


FIGURE 2.12 – Amplitude du pic principal des FFT de séries temporelles de réseaux de huit horloges selon différentes topologies, forces de couplage, régimes alimentaires et différentes valeurs d’insuline. Observations similaires à celles de la Figure 2.11, mais pour plus de valeurs de paramètres.

plusieurs applications, nous avons pu modéliser la communication entre différentes horloges, dont la période de chacune s'ajuste en réglant un seul paramètre (ε).

L'étude restreinte à deux oscillateurs a mis en évidence que la différence de période initiale et la force de couplage étaient deux éléments clés dans la synchronisation. Toutefois, bien que les oscillateurs parviennent à se synchroniser en ajustant leurs périodes sur une même période, ils demeurent désynchronisés en termes de phases.

Puis, suivant l'hypothèse que les signaux de communication entre les hépatocytes s'étendent à des clusters de moins de 10 cellules [74], nous avons construit un réseau d'horloges périphériques et réalisé des simulations identiques pour des réseaux couplés ou non couplés, dans le but de reproduire numériquement des résultats expérimentaux sur la synchronisation des horloges en réponse à différents types de régimes alimentaires.

Nos simulations indiquent que la topologie de communication considérée, le régime alimentaire et le couplage jouent un rôle dans la synchronisation des horloges. Notamment, seuls les modèles de réseaux d'horloges faiblement couplées, selon une topologie en étoile, en rangées ou en anneaux reproduisent l'augmentation de l'amplitude des oscillations, et la synchronisation des horloges en réponse à un régime de nourriture restreinte par rapport à un régime à volonté. Cette comparaison entre modèle et données suggère que la cohérence et la synchronisation des horloges périphériques ne sont possibles que grâce à un faible couplage entre les horloges en régime restreint. En régime à volonté, un fort couplage est nécessaire pour assurer une synchronisation.

Si les résultats obtenus via cette étude numérique sont encourageants vis à vis de l'hypothèse de couplage, notre approche comporte quelques limites.

D'abord, la considération du couplage entre huit horloges circadiennes au sein d'un unique réseau apparaît comme une limite évidente dans la reproduction de l'étude expérimentale dans laquelle l'ensemble des horloges périphériques avait été considéré. Une prochaine étape serait d'étudier la synchronisation entre différents réseaux d'horloges couplées entre elles. Est-ce que tous les réseaux se synchroniseront sur une même période et une même phase en réponse à un régime alimentaire restreint ? Ou bien est-ce que chaque réseau aura sa propre phase ? Quelle force de couplage sera nécessaire pour cela ?

Ensuite, bien que les hépatocytes soient organisés en 3D dans le foie, notre modèle ne permet pas de prendre en compte la spatialité dans la représentation de la communication intercellulaire. Cet aspect est actuellement l'objet d'étude d'un de nos partenaires du projet InSync.

Finalement, nous avons supposé que la force de couplage était identique entre toutes les horloges. Il serait intéressant d'étudier un réseau d'horloges au sein duquel les horloges communiqueraient entre elles avec des forces de couplage différentes.

Notre approche a l'avantage de pouvoir représenter diverses caractéristiques des horloges circadiennes au travers d'un modèle réduit et robuste, nous facilitant l'exploration du compor-

tement d'un réseau d'horloges périphériques en réponse à différents régimes alimentaires. Nos simulations numériques nous ont permis de tester l'hypothèse du couplage entre les horloges et d'observer l'influence de divers paramètres sur la dynamique du système.

Les résultats obtenus, et notamment la nécessité d'un faible couplage pour favoriser la synchronisation des horloges sur une même période, nous encouragent à poursuivre nos recherches sur les mécanismes de couplage entre cellules périphériques. Ils motivent notamment au développement de méthodes plus rigoureuses pour l'étude des horloges et de leur couplage, et nous amènent aux chapitres suivants.

Chapitre 3

Analytic solutions for the circadian oscillator characterize cycle dynamics and its robustness

This Chapter consists of some sections of the article “Cycle dynamics and synchronization in a coupled network of peripheral circadian clocks”, published in 2022 in *Interface Focus* [24], and of the article “Analytic solutions for the circadian oscillator characterize cycle dynamics and its robustness”, published in the *Journal of Mathematical Biology* [23] in a 2025 issue. The latter article improves on some issues treated in the former and, to avoid unnecessary repetition, we interspersed the preliminary work within the second one (sections marked with a star).

Circadian clocks form a fundamental mechanism that promotes the correct behavior of many cellular and molecular processes by synchronizing them on a 24 hour period. However, the circadian cycles remain difficult to describe mathematically. To overcome this problem, we first propose a segmentation of the circadian cycle into eight stages based on the levels of expression of the core clock components CLOCK:BMAL1, REV-ERB and PER:CRY. This cycle segmentation is next characterized through a piecewise affine model, whose analytical study allows us to propose an Algorithm to generate biologically-consistent circadian oscillators. Our study provides a characterization of the cycle dynamics in terms of four fundamental threshold parameters and one scaling parameter, shows robustness of the circadian system and its period, and identifies critical points for correct cycle progression.

3.1 Introduction

In mammals, every cell contains its own circadian clock network, a complex family of interactions between genes and proteins that helps to control and synchronize many cellular and

molecular processes (such as heart beat, blood pressure, body temperature,...). The main synchronizer of circadian clock is known to be the Earth's light/dark cycle, forcing circadian clock period at around 24h. The core mechanism of circadian clock is based on two negative feedback loops, between the complexes of proteins PER:CRY and CLOCK:BMAL1 and between CLOCK:BMAL1 and REV-ERB, allowing circadian clocks to show sustainable and rhythmic oscillations [4], [94].

The regulatory interactions of circadian clocks are frequently described with ordinary differential equations (ODEs). Throughout the years, several mathematical models have been developed using this framework, especially for the clock located in the Suprachiasmatic Nucleus (SCN) [54], [127] but also for peripheral organs such as the liver [80], [97], [151], or pancreatic beta-cells [152] or for more 'generic'-type cells [4], [21], focusing on different circadian clock features (such as transcription, translation, import/export, degradation, phosphorylation...) and recovering important biological properties of circadian clocks. These models enable, among other points, to provide insights to show circadian period and oscillation robustness whether by studying it with a reduced number of clock molecules (mRNA or proteins) in the cell [66] or demonstrating the role of the two loops [127].

Modeling complex dynamic of genetic regulatory networks with ODEs often necessitates the use of nonlinear terms, such as Hill functions or mass action terms, that complicate the study of these models since analytical solutions cannot be determined. An alternative framework considers the switching behaviour of the gene-protein interactions, by which Glass [60], [62]–[64] first proposed a simplified representation based on constant rates for species production and linear degradation rates. The network dynamic is then governed by threshold-dependent regulations between variables : depending on the position of a regulatory variable relative to a given threshold, the constant production rate of a regulated variable can be switched either high or low.

This representation was generalized to a framework also known as piecewise affine (PWA) systems that has been widely used to analyse genetic networks in computational and theoretical [27], [40], [44], [49] ways. It has the advantage that the set of thresholds allows to partition the state space into distinct domains or "boxes" in which solutions can be easily calculated piecewise and then the global solution is a concatenation of the different pieces [27]. More specifically, the global behavior of PWA models has been widely studied in order to prove the existence and stability of periodic solutions, often requiring restriction to specific systems and under some assumptions such as identical degradation rates for each variable and a single threshold per variable [44], [109]. Subsequent research extended to systems with several thresholds per variable (i.e. a given variable regulating several variables does so at different thresholds) [45], [48], or with different degradation rates [49].

A new wave of generalization of these networks was more recently developed, with among others, the introduction of a more general concept of switching networks [37] associated with a method to characterize all the possible qualitative behaviors "contained" in a given network,

by combinatorially identifying regions of parameters for which the qualitative dynamics don't change. This method is implemented through the software for Dynamical Signatures Generated by Regulatory Networks (DSGRN) [37], [58]. Applications of this new DSGRN framework include model validation or rejection [36], with the particular example of the yeast cell cycle [55].

Continuous models that use only sigmoidal-type production terms and linear degradations can usually be associated to a corresponding PWA system by approximating the sigmoidal functions by step functions. However, in the case of models more generally described by functions of mass action form or polynomial terms, these frameworks cannot in general be directly applied. In this work, we propose the construction of a piecewise affine model that approximates a reduced continuous nonlinear ODE model of circadian clock [3] including both a Hill function and mass action terms. Due to the polynomial terms, the previously cited methods cannot be applied, and the simplification leads to a system which is not of the classical PWA form, and which directly relies on the knowledge of the qualitative dynamics of the ODE model and of the general dynamics of circadian clocks.

More specifically, the qualitative behaviour refers to two features of circadian clock cycles experimentally observed, that are the phase opposition between the complexes CLOCK:BMAL1 and PER:CRY and the chronological order of protein peaks CLOCK:BMAL1, REV-ERB and PER:CRY. The idea of using the sequence of biological events, including minima and maxima, to qualitatively describe a system behavior is much used in Boolean systems, and presents the advantage of avoiding the requirement of quantitative experimental data that can be tricky to obtain. In [36], the authors propose a method to match models with datasets based on the sequence of biological events, that they next develop in [16] and apply in [55] to qualitatively match yeast cell-cycle networks with various datasets. Another class of models, called hybrid models, that are based on a formalism introduced in [140], also considers sequences of biological events to capture the qualitative dynamic of biological networks but they additionally include temporal features [13]. In this framework, celerities are assigned to each qualitative state, to take into account the time that the system spends in each state.

The construction of the piecewise affine model presented in this paper, although including peak order and temporal constraints, strongly differs from works previously mentioned. Indeed, the system is constructed so that its solutions follow a periodic orbit that approximates the cycle of an ODE model, and exhibit certain qualitative properties, such as the peak order. These requirements are guaranteed with a set of constraints derived from the analytical solutions of our PWA model, and have the form of limited dwell-time within some regions and of threshold inequality constraints. Based on these constraints, a dedicated Algorithm allows to estimate and explore the parameter space of threshold values, leading to a realistic region that ensures existence of the circadian periodic orbit.

Therefore, through the approximation of an ODE model, our approach proposes a characterization of the circadian clock cycle and shows that the circadian system is robust in the sense that a periodic orbit with period near 24 hours is observed for a wide range of threshold va-

lues. This robustness is determined by an adjustment between the minimal concentration of PER:CRY and the maximal concentration of CLOCK:BMAL1 : the product of these two quantities may range over a large interval and sets a scaling for the other variables in the system.

3.2 Numerical and mathematical characterization of circadian cycle

3.2.1 A model reproducing circadian clock properties

Throughout this paper, we base our analysis on the continuous circadian clock model recently developed by Almeida *et al.* [3]. This model, calibrated with data from mouse fibroblast cells [50], focuses on the transcriptional details and describes the dynamics of the core clock protein complexes CLOCK:BMAL1, DBP, REV-ERB (representing both REV-ERB α and REV-ERB β) and PER:CRY (complex formed by PER2 and CRY1). The proteins are respectively denoted B , D , R and P throughout this paper. The ordinary differential equations of this model are :

$$\begin{aligned}\dot{B} &= V_R h^-(R) - \gamma_B B P, \\ \dot{D} &= V_B B - \gamma_D D, \\ \dot{R} &= V_D D - \gamma_R R, \\ \dot{P} &= V_D D - \gamma_B B P,\end{aligned}\tag{3.1}$$

where $h^-(R) = \frac{k_{Rr}^4}{k_{Rr}^4 + R^4}$ and

$$\begin{aligned}V_R &= 44.4\%.h^{-1}, k_{Rr} = 80.1\%, V_B = 0.142\%.h^{-1}, V_D = 19\%.h^{-1} \\ \gamma_R &= 0.241h^{-1}, \gamma_D = 0.156h^{-1}, \gamma_B = 2.58h^{-1}.\end{aligned}\tag{3.2}$$

V_B , V_D and V_R stand for synthesis rates and γ_B , γ_D and γ_R for degradation rates. This set of parameters comes from the original model, (see Table 2 in [3]) and is used throughout this paper, unless stated otherwise.

3.2.2 Characterization of circadian cycle timing *

In order to better understand how circadian clock mechanisms work, we will characterize the circadian cycle by dividing it into six different stages, based on the dynamics of the CLOCK:BMAL1 / PER:CRY mutual inactivation. To do this, the nonlinear terms of model (3.1) are simplified to create a piecewise affine model [27] that partitions the state space into six different regions. The time spent by the cycle in each of these regions can then be explicitly

calculated in terms of the system's parameters and switching conditions, providing estimates for the duration of each stage.

A piecewise affine clock model *

There are two nonlinear terms in system (3.1). First, let's consider the decreasing Hill function $f(R) = V_R \frac{k_{Rr}^4}{k_{Rr}^4 + R^4}$. This class of functions is often simplified by a step function [27] :

$$f(R) \approx \begin{cases} 0, & R > k_{Rr} \\ V_R, & R < k_{Rr} \end{cases} \quad (3.3)$$

The second nonlinear term is $-\gamma_B BP$, the common inactivation of the complexes CLOCK:BMAL1 and PER:CRY. As the oscillator performs one full cycle, this term goes through several well marked conditions (see Fig. 3.1).

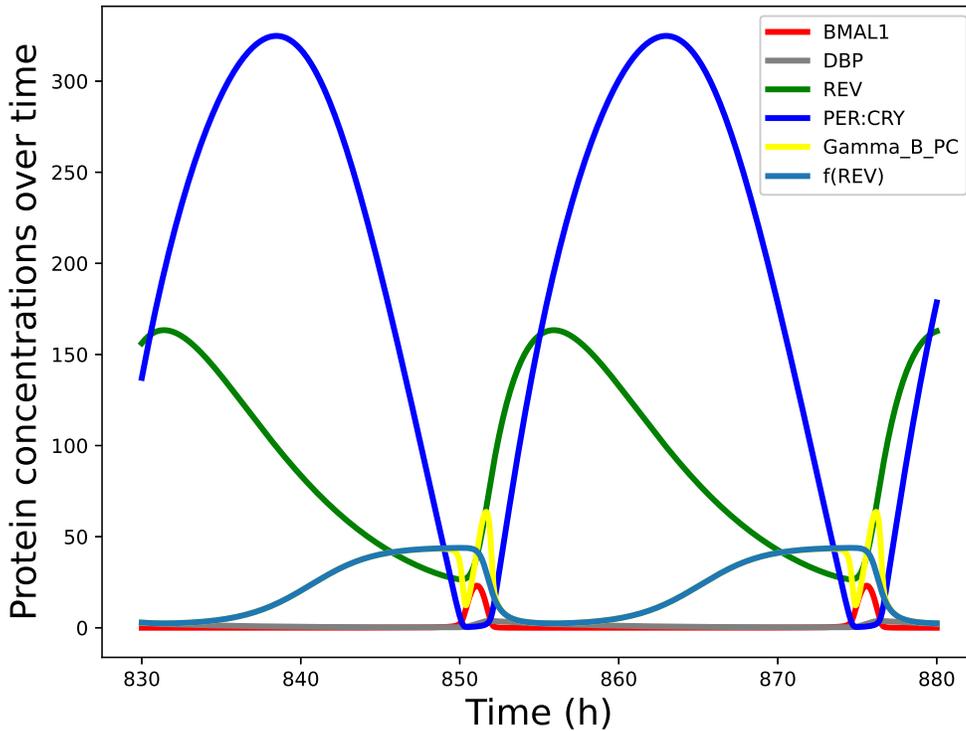


FIGURE 3.1 – Protein concentrations over time and $\gamma_B BP$ and $f(R)$ curves.

Define P_{low} and P_{high} to be respectively low and high levels of reference for the variable P . Consider also B_{high} , a high level of reference for B , and B_{max} , its maximal value. These

reference values will help to simplify the CLOCK:BMAL1 and PER:CRY common inactivation term.

Notice that while B is approximately constant below its level B_{high} , or when P is very large ($P > P_{high}$), the two terms $\gamma_B B P$ and $f(R)$ have similar values (see Fig. 3.1), so they add up approximately to 0 in the B equation 3.4. This suggests the following simplification :

$$\gamma_B B P \approx \begin{cases} 0, & R > k_{Rr} \text{ and } B < B_{high} \\ V_R, & R < k_{Rr} \text{ and } P > P_{high} \end{cases} \quad (3.4)$$

To approximate $\gamma_B B P$ in the other cases, we adopt the following criterion : for intermediate levels of P , we assume that the inactivation term is dominated by the B dynamics with P constant, while for very low P , the opposite scenario holds. Taking into account the phase opposition between B and P , we expect B to be close to its maximum value when $P < P_{low}$. We thus propose the following piecewise affine approximation for $\gamma_B B P$:

$$\gamma_B B P \approx \begin{cases} 0, & R > k_{Rr}, B < B_{high} & \text{Stage I} \\ V_R, & R < k_{Rr}, P > P_{high} & \text{Stage II} \\ \gamma_B B P_{low}, & R < k_{Rr}, P_{low} < P < P_{high} & \text{Stage III} \\ \gamma_B B_{max} P, & R < k_{Rr}, P < P_{low} & \text{Stage IV} \\ \gamma_B B_{max} P, & R > k_{Rr}, B > B_{high}, P < P_{low} & \text{Stage V} \\ \gamma_B B P_{low}, & R > k_{Rr}, B > B_{high}, P > P_{low} & \text{Stage VI} \end{cases} \quad (3.5)$$

TABLE 3.1 – Characterization of the six circadian stages based on the mutual CLOCK:BMAL1 and PER:CRY inactivation dynamics.

| Stage | I | II | III | IV | V | VI |
|---------------------------|-----------------------|------------------------|--|----------------------|------------------------|------------------------------|
| CLOCK:BMAL1 (B) | low $B < B_{high}$ | low $B > 0$ | increasing $B > 0$ | high $B > 0$ | high $B > B_{high}$ | decreasing $B > B_{high}$ |
| PER:CRY (P) | increasing $P > 0$ | high $P > P_{high}$ | decreasing $P_{low} < P < P_{high}$ | low $P < P_{low}$ | low $P < P_{low}$ | increasing $P > P_{low}$ |
| Common inactivation | negligeable | saturated by P | modulated by B | modulated by P | modulated by P | modulated by B |
| Repression of CLOCK:BMAL1 | on $R > k_{Rr}$ | off $R < k_{Rr}$ | off $R < k_{Rr}$ | off $R < k_{Rr}$ | on $R > k_{Rr}$ | on $R > k_{Rr}$ |

These conditions ensure positivity of the piecewise affine system composed of (3.1)-(3.3)-(3.5). To simulate this system we need to provide suitable values for the reference levels.

First, consider the steady state obtained when transcription is activated and the degradation

term is fixed at $\gamma_B B P_{low}$:

$$\dot{B} \approx V_R - \gamma_B B P_{low} \Rightarrow V_R - \gamma_B B_{eq} P_{low} = 0 \Leftrightarrow B_{eq} = \frac{V_R}{\gamma_B P_{low}}.$$

To estimate the low level P_{low} , consider the cycle's phase opposition property and assume that both B and D reached their maximum values, and P is produced at a rate $V_D D_{eq}$

$$\dot{D} \approx V_D D_{eq} - \gamma_D D \Rightarrow V_D D_{eq} - \gamma_D D_{eq} = 0 \Leftrightarrow D_{eq} = \frac{V_D D_{eq}}{\gamma_D} \quad (3.6)$$

$$\begin{aligned} \dot{P} &\approx V_D D_{eq} - \gamma_D B_{eq} P \Rightarrow V_D D_{eq} - \gamma_D B_{eq} \bar{P} = 0 \\ \Leftrightarrow \bar{P} &= \frac{V_D D_{eq}}{\gamma_B B_{eq}} = \frac{V_D V_B}{\gamma_B \gamma_D}. \end{aligned} \quad (3.7)$$

For a safer estimate we consider $P_{low} = \bar{P}/4$, so that

$$P_{low} = \frac{V_D V_B}{4\gamma_B \gamma_D} \quad \text{and} \quad B_{max} = \frac{V_R}{\gamma_B P_{low}} = \frac{4V_R \gamma_D}{V_D V_B}$$

In contrast, there is no obvious way to estimate a suitable non-zero value for B_{high} , so we choose a fixed value, $B_{high} = 0.01$ for the simulations in this paper. Finally, we use in the current simulations an appropriately high value within the system's parameters and set $P_{high} = V_R$.

Fig. 3.2 shows oscillations of the 4 proteins of the piecewise affine model (3.1)-(3.3)-(3.5), as well as the duration of each stage (black straight lines), with parameter set (3.2). We observe that the system does not go through all six stages.

Duration of each cycle stage in terms of the system's parameters *

The advantage of the piecewise affine approximation is to allow the explicit computation of a solution for four of the six cycle stages and hence also an expression for these four stage durations in terms of the parameters. We can express the duration of stages VI, I, II, and III in terms of the parameters, but expressions for stages IV and V are more complex to derive. However, in our example, the oscillator doesn't enter in these stages.

For stage VI, we have the following equation for B : $\dot{B} = -\gamma_B B P_{low}$ whose analytical solution is : $B(t) = e^{-\gamma_B P_{low}(t-t_0)} B(t_0)$. Letting (t_{III}, t_{VI}) denote the times at which the cycle ends stage III and VI, respectively, we assume that $B(t_{III}) = B_{max} = V_R/(\gamma_B P_{low})$ and $B(t_{VI}) = B_{high}$. So, recalling $P_{low} = V_D V_B/(4\gamma_B \gamma_D)$, obtain

$$B(t_{VI}) = e^{-\gamma_B P_{low}(t_{VI}-t_{III})} B(t_{III}) \Rightarrow t_{VI} - t_{III} = -\frac{4\gamma_D}{V_D V_B} \ln \left(\frac{B_{high} V_D V_B}{4V_R \gamma_D} \right)$$

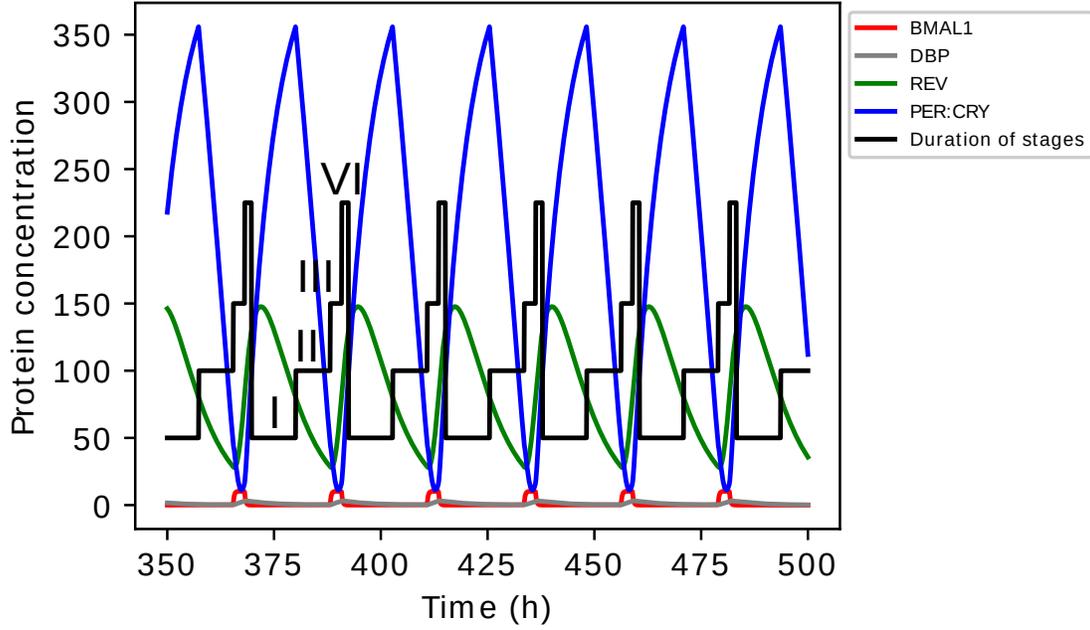


FIGURE 3.2 – Protein concentrations over time and stage durations, for the piecewise affine model. The stages are represented by the black straight lines.

In a similar way, we can compute the duration of stages I, II and III :

$$t_I - t_{VI} = -\frac{1}{\gamma_D} \ln \left(\frac{D(t_I) - \frac{V_B B_{high}}{\gamma_D}}{D(t_{VI}) - \frac{V_B B_{high}}{\gamma_D}} \right)$$

$$t_{II} - t_I = -\frac{1}{\gamma_D} \ln \left(\frac{D(t_{II}) - \frac{V_B B_{high}}{\gamma_D}}{D(t_I) - \frac{V_B B_{high}}{\gamma_D}} \right)$$

$$t_{III} - t_{II} = -\frac{1}{\gamma_B P_{low}} \ln \left(\frac{B(t_{III}) - \frac{V_B}{\gamma_B P_{low}}}{B_{high} - \frac{V_B}{\gamma_B P_{low}}} \right)$$

Duration of stage VI depends only on the parameters whereas duration of the other stages ($i = I, \dots, V$) depends also on the values reached by D and B at the beginning ($D(t_{i-1})$, $B(t_{i-1})$) or at the end ($D(t_i)$, $B(t_i)$) of stage i , that we don't necessarily know how to estimate.

Notice that stages VI, I and II follow each other in this order. Since the equation of D is the same for all stages, during stages I and II, its solution is

$$D(t) = e^{-\gamma_D(t-t_0)} \left(D(t_0) - \frac{V_B B_{high}}{\gamma_D} \right) + \frac{V_B B_{high}}{\gamma_D}$$

The lower level D_{low} of D is reached when $B \lesssim B_{high}$ so we can estimate it :

$$\dot{D} \approx V_B B_{high} - \gamma_D D \Rightarrow V_B B_{high} - \gamma_D D_{low} \approx 0 \Leftrightarrow D_{low} \approx \frac{V_B B_{high}}{\gamma_D} \quad (3.8)$$

$$(3.9)$$

So, as $D(t_0) > \frac{V_B B_{high}}{\gamma_D}$, $D(t)$ is decreasing during stages I and II, so that $D(t_{VI}) > D(t_I) > D(t_{II})$.

Some limitations of this partition

In this section, we proposed a first partition and characterization of the circadian cycle based on a piecewise approximation of a nonlinear model. In this way we obtained a circadian cycle with six stages. However, our approach has limitations that we discuss in this section.

First, although the proposed partition into six stages cover all the state space, this partition can be improved by a finer partition, taking into account all the possible stages depending on the position of each variable relatively to its threshold. For example, the current stage I doesn't take into account the position of P relatively to its threshold but a more complete partition would take it into account.

Moreover, we observed that the system may not go through all the six stages. The question arises whether this is coherent from a biological point of view, or whether there are some mandatory or inconsistent stages. Moreover, one might wonder if the stage transition order is important.

Then, the theoretical durations of stages can be computed only if the stage order is known. However, according to the parameter set, there is no guarantee that the order I-II-III-VI that we obtained will remain the same. Also, analytical solutions cannot be obtained for the stages where the mass action term is defined proportional to P (stages IV and V).

Finally, the thresholds are fixed and expressed in terms of the Almeida *et al.* model parameters. A wider range of possible threshold values would help assess the robustness of the system, and a more general method to define the threshold parameters would facilitate the application of the segmentation on multiple models.

To address these questions, we propose a more detailed circadian cycle partition. Based on qualitative experimental observations, we suggest, in a very deterministic way, a specific order of stages that any circadian oscillator should follow to be considered as "biologically coherent". We build a new piecewise affine model, still based on the approximation of the Almeida *et al.* model, but whose solutions follow the defined order of stages. The threshold parameters are generated by an Algorithm satisfying all the conditions, defined from analytical solutions, for a periodic trajectory.

The development of an automated method to partition and then characterize any circadian cycle, with thresholds computed independently of the model's parameters, will be the subject

of Chapter 4.

3.2.3 A segmentation of the circadian cycle into eight stages

We suggest a segmentation of the circadian cycle into stages based on the repression of CLOCK:BMAL1 by REV-ERB (represented by the term $V_R h^-(R)$ in model 3.1) and on the dynamics between CLOCK:BMAL1 and PER:CRY (represented by the mutual repression term $\gamma_B BP$ in model 3.1). We define the different regions by setting thresholds on the variables B , P and R in order to segment the circadian cycle and characterize the clock protein dynamics. Throughout this paper, we will use “stage i ” to designate the time interval spent by a circadian cycle in “region i ” of the state space. By abuse of notation, we will use “stage i ” to designate both the time interval and (as a label of) “region i ”.

Let’s define P_{low} , a low level of reference for the variable P , B_{high} and P_{high} , high levels of reference for the variables B and P and R_{int} an intermediate level of reference for R . The state space can be partitioned using all the different combinations of the thresholds : as there are two thresholds for P , one for R and one for B , the state space can be divided into twelve stages (see Table 3.2).

TABLE 3.2 – Segmentation of the circadian time into twelve stages and equations describing the dynamics of the circadian clock in each of the biologically-consistent stages, with function trends expected.

| Stage | 1 | 2 | 3 | 4 |
|----------------------------|---|---|---|---|
| Stage conditions | $R > R_{int}$ $B < B^{high}$ $P_{low} < P < P^{high}$ | $R > R_{int}$ $B < B^{high}$ $P > P^{high}$ | $R < R_{int}$ $B < B^{high}$ $P > P^{high}$ | $R < R_{int}$ $B < B^{high}$ $P_{low} < P < P^{high}$ |
| CLOCK:BMAL1 $\dot{B} =$ | \rightarrow 0 | \rightarrow 0 | \rightarrow 0 | \nearrow $V_R - \gamma_B B P_{low} > 0$ |
| DBP $\dot{D} =$ | \searrow $V_B B - \gamma_D D < 0$ | \searrow $V_B B - \gamma_D D < 0$ | \searrow $V_B B - \gamma_D D < 0$ | \searrow $V_B B - \gamma_D D < 0$ |
| REV $\dot{R} =$ | \nearrow or \nearrow $V_D D - \gamma_R R$ | \nearrow or \nearrow $V_D D - \gamma_R R$ | \searrow $V_D D - \gamma_R R < 0$ | \searrow $V_D D - \gamma_R R < 0$ |
| PER:CRY $\dot{P} =$ | \nearrow $V_D D > 0$ | \nearrow $V_D D > 0$ | \searrow $V_D D - V_R < 0$ | \searrow $V_D D - \gamma_B B P_{low} < 0$ |
| Stage | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Stage conditions | $R < R_{int}$ $B > B^{high}$ $P_{low} < P < P^{high}$ | $R < R_{int}$ $B > B^{high}$ $P < P_{low}$ | $R > R_{int}$ $B > B^{high}$ $P < P_{low}$ | $R > R_{int}$ $B > B^{high}$ $P_{low} < P < P^{high}$ |
| CLOCK:BMAL1 $\dot{B} =$ | \nearrow $V_R - \gamma_B B P_{low} > 0$ | \nearrow $V_R - \gamma_B \delta > 0$ | \searrow $-\gamma_B B_{eq} P_{low} = -V_R < 0$ | \searrow $-\gamma_B B_{eq} P_{low} = -V_R < 0$ |
| DBP $\dot{D} =$ | \searrow $V_B B - \gamma_D D < 0$ | \nearrow $V_B B - \gamma_D D > 0$ | \nearrow or \nearrow $V_B B - \gamma_D D$ | \nearrow or \searrow $V_B B - \gamma_D D$ |
| REV $\dot{R} =$ | \searrow $V_D D - \gamma_R R < 0$ | \nearrow $V_D D - \gamma_R R > 0$ | \nearrow $V_D D - \gamma_R R > 0$ | \nearrow $V_D D - \gamma_R R > 0$ |
| PER:CRY $\dot{P} =$ | \searrow $V_D D - \gamma_B B P_{low} < 0$ | \searrow or \searrow $V_D D - \gamma_B \delta$ | \nearrow $V_D D - \gamma_B B_{eq} P_{low} = V_D D - V_R > 0$ | \nearrow $V_D D - \gamma_B B_{eq} P_{low} = V_D D - V_R > 0$ |
| Stage | 9 (stage refuted) | 10 (stage refuted) | 11 (stage refuted) | 12 (stage refuted) |
| Stage conditions | $R < R_{int}$ $B < B^{high}$ $P < P_{low}$ | $R > R_{int}$ $B < B^{high}$ $P < P_{low}$ | $R < R_{int}$ $B > B^{high}$ $P > P^{high}$ | $R > R_{int}$ $B > B^{high}$ $P > P^{high}$ |

However, as the circadian clock performs one cycle, the phase opposition property between CLOCK:BMAL1 and PER:CRY has to be respected [139], refuting some stages. This property implies that the oscillator cannot have $B < B_{high}$ and $P < P_{low}$ simultaneously (eliminating stages 9 and 10) nor $B > B_{high}$ and $P > P_{high}$ simultaneously (eliminating stages 11 and 12). The circadian cycle is then described by the first eight stages of Table 3.2.

3.2.4 Temporal sequence of the stages

The circadian clock shows a specific order of protein peaks : BMAL1 then REV-ERB, then PER:CRY. This property suggests a specific order among stages followed by any circadian oscillator. Notice that the probability that two variables cross their thresholds simultaneously is very small. So, from one stage to another, we assume that only one variable crosses a threshold. It's therefore not possible to pass from stage 1 to 3 for example. We define the peak of B such that B is above its threshold B_{high} , corresponding to stages 5, 6, 7 and 8. The peak of R follows the peak of B and is defined such that R is above R_{int} which is represented by stages 7, 8, 1 and 2. Finally, the peak of P follows the peak of R and corresponds to stages 2 and 3, as $P > P_{high}$. A cycle that respects physiological properties (such as the order of protein peaks) should not enter twice a same stage in a same cycle and should follow an ascending and periodic order of stages : 1-2-3-4-5-6-7-8-1. This sequence of transitions is represented by green arrows in Figure 3.3. Each stage is represented by a vertex in the space (R, B, P) and is defined via the thresholds R_{int} , B_{high} , P_{low} and P_{high} . The unlabeled vertices correspond to the discarded stages.

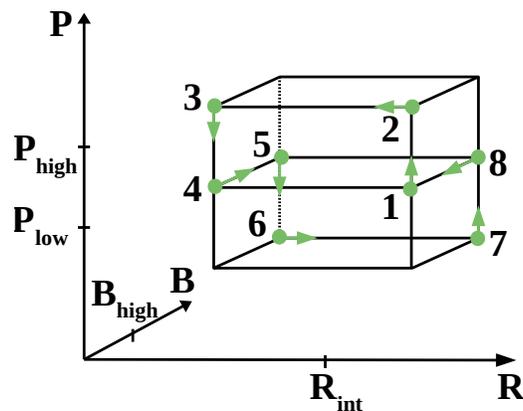


FIGURE 3.3 – Ideal physiological order of stages followed by an oscillator as it performs one cycle

3.3 A piecewise affine clock model

Inspired by the piecewise affine model suggested before by our group [24] and based on the repression of CLOCK:BMAL1 by PER:CRY, on the dynamics between REV-ERB and CLOCK:BMAL1 and on the circadian cycle decomposition into eight stages, we simplified the nonlinear continuous model of Almeida *et al.* (3.1) into a piecewise affine one, in order to characterize the dynamics of the circadian clock cycle. A scheme of the regulatory interaction network of the continuous model, including the negative feedback loops and the nonlinear mechanisms, is shown in Figure 3.4.

The goal is to provide an analytic treatment of the circadian system, based on the three fundamental variables that are also represented in practically every model of the circadian clock, to obtain :

- analytic solutions in each region of the piecewise affine system, leading to sufficient conditions for a periodic sequence of stage transitions of the circadian system ;
- a characterization of the cycle dynamics in terms of four fundamental threshold parameters ;
- robustness of the circadian cycle, in terms of threshold parameters.

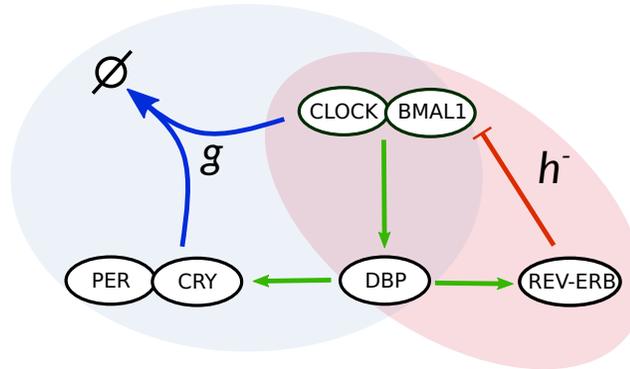


FIGURE 3.4 – Network representation of the circadian clock ODE model. The two negative feedback loops are highlighted by blue and red backgrounds. Activating interactions are shown by green arrows, and are described by linear terms in the model. CLOCK:BMAL1 inhibition by REV :ERB is represented by a red flat-head arrow and is described, in the ODE model, by the decreasing Hill function $h^-(R) = \frac{k_{Rr}^4}{k_{Rr}^4 + R^4}$. Complex formation of PER:CRY and CLOCK:BMAL1 is shown by blue arrows and is described, in the model, by a mass action term, $g(B, P) = \gamma_B BP$. The piecewise affine model is based on this ODE model and has the same basic structure. The nonlinear functions f and g are approximated by affine terms whose definitions depend on the position of variables relative to their thresholds. See Table 3.2 for more details.

3.3.1 Model design

The first nonlinear term of system (3.1) is the decreasing Hill function $V_R h^-(R)$ which can be simplified by a step function [27]. A straightforward choice for the threshold is R_{int} , which gives :

$$V_R h^-(R) \approx \begin{cases} 0, & R > R_{int} \\ V_R, & R < R_{int} \end{cases}$$

The second nonlinear term is $g(B, P) = \gamma_B B P$, the function from the complex formation of PER:CRY and CLOCK:BMAL1. To linearize this polynomial term, we rely on the dynamics of the ODE model (see [24]) and propose a solution in which this term is either defined null, linear or constant according to the stages. The same thresholds as for the cycle segmentation are used : B_{high} , P_{low} and P_{high} .

First, B remains close to its level B_{high} (whilst R and P are large) implying that the two terms $V_R h^-(R)$ and $\gamma_B B P$ have similar values and add up to 0 in the B equation, leading to the following simplification :

$$\gamma_B B P \approx \begin{cases} 0, & R > R_{int}, B < B_{high}, P_{low} < P < P_{high} \\ 0, & R > R_{int}, B < B_{high}, P > P_{high} \\ V_R, & R < R_{int}, B < B_{high}, P > P_{high} \end{cases}$$

These 3 equations correspond to the first three stages.

Next, we consider the dynamics between B and P . P decreases and tends to reach its low level P_{low} . B increases and so the degradation term is mostly dominated by B . The degradation term of B and P during stages 4 and 5 is then defined by :

$$\gamma_B B P \approx \begin{cases} \gamma_B B P_{low}, & R < R_{int}, B < B_{high}, P_{low} < P < P_{high} \\ \gamma_B B P_{low}, & R < R_{int}, B > B_{high}, P_{low} < P < P_{high} \end{cases}$$

At the end of stage 5, P reaches its low level P_{low} and B becomes close to a reference state B_{eq} , corresponding to the equilibrium between its production and degradation terms, $\dot{B} = V_R - \gamma_B B_{eq} P_{low} = 0$ which gives :

$$B_{eq} = \frac{V_R}{\gamma_B P_{low}},$$

a relationship between B_{eq} and P_{low} .

Then, during stage 6, B reaches its maximum and P its minimum. We define the degradation

term by a constant δ such that during stage 6 there is a time t where $\dot{P}(t) = 0$:

$$\gamma_B B P \approx \begin{cases} \gamma_B \delta, & R < R_{int}, B > B_{high}, P < P_{low} \end{cases}$$

The value δ stands for a product between a maximal B and a minimal P .

During stages 7 and 8, B decreases and tends to reach B_{eq} while P increases and crosses the threshold P_{low} . The degradation term is here described by :

$$\gamma_B B P \approx \begin{cases} \gamma_B B_{eq} P_{low}, & R > R_{int}, B > B_{high}, P < P_{low} \\ \gamma_B B_{eq} P_{low}, & R > R_{int}, B > B_{high}, P_{low} < P < P_{high} \end{cases}$$

Finally, we define the time at which the cycle exits stage i by t_i and the duration of each stage by the difference of exiting times :

$$d_i = t_i - t_{i-1} \text{ with } i = 1..8 \text{ and } t_0 = t_8.$$

We set the numerical starting point of the cycle as a point reached by the oscillator at the end of stage 5 (so $t_5 = 0$), when P crosses its threshold, so $P_0 = P_{low}$. The other initial conditions are based on the balance between production and degradation rates at the end of stage 6 :

$$P_0 = P_{low}, \quad B_{high} < B_0 \leq B_{eq}, \quad D_0 = \frac{V_B B_0}{\gamma_D}, \quad R_0 = \frac{V_D V_B B_0}{\gamma_D \gamma_R} \quad (3.10)$$

In what follows, the initial condition for the PWA system is a point at the boundary between stages 5 and 6, of the form (B_0, D_0, R_0, P_0) .

With these definitions, an analytical solution can be given for the dynamics of the model in each stage. Notice that these conditions and equations ensure positivity of B , D and R , provided that the threshold parameters are well-defined (see Section 3.3.2). As P reaches its minimum during stage 6, δ should also be defined carefully to ensure the positivity of P (in more detail below in Section 3.3.3). Table 3.2 summarizes the definitions of each stage, as well as the equations for each variable and the function trends expected to obtain oscillations and a consistent model, that is to say an oscillator that goes through all the stages in the specified physiological order.

3.3.2 Circadian cycle as a sequence of transitions between stages

The following assumptions and propositions summarize sufficient conditions on the values of the threshold parameters, of the scaling parameter δ and on the stage durations, to ensure that the analytical solutions represent an oscillator following the cycle transitions in the specified physiological order for one period (as defined in Section 3.2.4). Sketches of proofs are given in Appendix B.

First, some assumptions among the parameters are as follows :

$$\text{A.1 } \frac{V_R}{3\gamma_B} < \delta < \frac{V_R}{\gamma_B},$$

$$\text{A.2 } B_{high} < B_{eq} = \frac{V_R}{\gamma_B P_{low}},$$

$$\text{A.3 } P_{low} > \frac{2V_R}{3\delta\gamma_B - V_R} \frac{V_D V_B}{\gamma_D \gamma_B},$$

$$\text{A.4 } \frac{V_D V_B V_R}{\gamma_D \gamma_R \gamma_B P_{low}} < R_{int} < \frac{V_R}{\gamma_R}$$

Considering the requirements for the system to be in stage 6, Assumption A.1 ensures that B increases and remains above B_{high} and Assumption A.4 ensures the initial starting point R_0 lower than R_{int} . In addition to A.1 - A.4, the following assumptions on variables $D(t)$ and $R(t)$ are also needed. They are all verified by numerical results (see in Appendix Figure B.1) :

$$\text{A.5 } \frac{V_B B_{eq}}{\gamma_D} < D_{min},$$

$$\text{A.6 } D(t_i) < \frac{V_R}{V_D}, i \in \{2, 3, 4, 5\},$$

$$\text{A.7 } \frac{V_R}{V_D} < D(t_6) < D(t_7),$$

$$\text{A.8 } R_{int} < R(t_7) < R(t_8)$$

The next propositions state the conditions needed at each step for transition from one stage to the next. At the starting point of the cycle, only the values of P_{low} and δ are set. Then, at each step, the idea is to define the value of a specific threshold by choosing the duration $d_i = t_i - t_{i-1}$ of stage i , such that the desired threshold is crossed first. The duration d_i of stage i also depends on the duration d_{i-1} of stage $i - 1$. Since the starting point of the system occurs at the end of stage 5 (at t_5), the duration of stage 6 is the first one to be chosen. However, this duration directly impacts the good progress of the cycle, since a too short or too long duration blocks the beginning of the oscillations (see conditions of Proposition 1). Duration of stage 8 also requires precise conditions on the time intervals, to guarantee that the expected variable crosses its given threshold. Thus, for stages 6 and 8 (Propositions 1 and 2) an interval for the stage durations is provided, say $d_i \in (d_{i,min}, d_{i,max})$, to allow for flexibility in the threshold parameter choices.

Note that the transitions between two consecutive stages from stage 2 to 6 (see Proposition 4) follow naturally from the Assumptions A.1 - A.8 and from Propositions 1 to 3 and require no further conditions.

After one period, that is to say when the system reaches again the boundary between stage 5 and stage 6, $B(t_5) \approx B_0$ and $P(t_5) = P_0$. Indeed, during stage 5, $B (> B_{high})$ increases and

converges quickly to B_{eq} , with $B_{eq} \geq B_0 > B_{high}$ and the end of stage 5 corresponds to the moment where P equals P_{low} ($= P_0$). Then, although $D(t_5)$ and $R(t_5)$ are observed bigger than D_0 and R_0 , the good progress of the cycles of the next periods through the stages is not impacted.

Proposition 1 (Stage 6 to 7 to 8). *Consider the PWA system as defined in Table 3.2. Assume that the following inequalities hold :*

$$1(i) \ d_{6min} < d_6 \text{ such that } D(t_5 + d_{6min}) > \frac{V_R}{V_D} \text{ and } \exists d_7 < \frac{(V_R - \delta\gamma_B)d_{6min}}{V_R} \text{ such that } P(t_5 + d_{6min} + d_7) = P_{low};$$

$$1(ii) \ d_6 < d_{6max} \text{ such that } P(t_5 + d_{6max}) < P_{low} \text{ and } R(t_5 + d_{6max}) < \frac{V_R}{\gamma_R}.$$

Then, starting at the boundary between stages 5 and 6 with initial condition (B_0, D_0, R_0, P_0) defined in (3.10) the system will successively cross stage 6 and enter stage 7 and cross stage 7 and enter stage 8.

Condition 1(i) ensures that P increases at the end of stage 6 and that d_6 is long enough to ensure a solution of the equation $P(t_6 + d_7) = P_{low}$, with d_7 such that P crosses P_{low} , before B crosses B_{high} . Condition 1(ii) ensures that R crosses R_{int} before P crosses P_{low} , and such that $R_{int} < \frac{V_R}{\gamma_R}$. These conditions guarantee transitions from stage 6 to 7 and from stage 7 to 8.

Proposition 2 (Stage 8 to 1). *Consider the PWA system as defined in Table 3.2. In addition to the inequalities of Proposition 1, assume that the following inequalities hold :*

$$2(i) \ d_{8min} < d_8 < d_{8max} \text{ with } d_{8min} = \frac{B(t_7) - \frac{V_R}{\gamma_B P_{low}}}{V_R} \text{ and } d_{8max} = \frac{B(t_7)}{V_R};$$

$$2(ii) \ P(t_7 + d_{8max}) \ll P_{high}.$$

Then, starting from stage 8, with initial conditions $B_0 = B(t_7)$, $D_0 = D(t_7)$, $R_0 = R(t_7)$, $P_0 = P(t_7) = P_{low}$, the system will cross stage 8 and enter stage 1.

Conditions 2(i) and 2(ii) ensure that B crosses B_{high} (such that $0 < B_{high} < B_{eq}$) before P crosses P_{high} , which guarantees transition from stage 8 to 1.

Proposition 3 (Stage 1 to 2). *Consider the PWA system as defined in Table 3.2. In addition to the inequalities of Propositions 1 and 2, assume that the following inequality holds :*

$$3(i) \ P_{high} < P(t_8 + d_{1max}), \text{ such that } R(t_8 + d_{1max}) = R_{int}.$$

Then, starting from stage 1, with initial conditions $B_0 = B(t_8) = B_{high}$, $D_0 = D(t_8)$, $R_0 = R(t_8)$, $P_0 = P(t_8)$, the system will cross stage 1 and enter stage 2.

Condition 3(i) ensures that P crosses P_{high} before R crosses R_{int} , which guarantees transition from stage 1 to 2.

Proposition 4 (Stage 2 to 6). *Consider the PWA system as defined in Table 3.2. Assume that inequalities of Propositions 1-3 hold. Then, starting from stage 2, with initial conditions $B_0 = B(t_1)$, $D_0 = D(t_1)$, $R_0 = R(t_1)$, $P_0 = P(t_1) = P_{high}$, the system will cross stage 2 and successively evolve through stages 3, 4, 5 and finally 6, in this order.*

3.3.3 Algorithm for numerical estimation of circadian cycle threshold parameters

We use the conditions defined before in the propositions and propose Algorithm 1 to estimate the five-dimensional parameter space, composed of the four thresholds B_{high} , R_{int} , P_{low} and P_{high} and the scaling factor δ , such that any oscillator of the PWA model follows the specified physiological stage order for several periods. Both definitions and conditions of the system ensure positivity of B , D , and R but positivity of P has to be verified, so we add a condition in this sense (see steps 3 and 4 of Algorithm 1).

As input of Algorithm 1, we take the same parameters as the ones of the continuous model 3.1, except for γ_R . This parameter has a big impact on the period and allows us to adjust the period around 24h for a better coherence with biological clocks (the initial value of γ_R gave periods around 33h).

3.4 Continuous and PWA models share qualitative properties

Since our goal is to faithfully approximate the dynamics of the continuous model (3.1) by piecewise affine equations, we theoretically show that the PWA model reproduces the same qualitative properties as the continuous model, that we next illustrate with numerical simulations. The five-dimensional parameter space of the PWA model is estimated by computing with Algorithm 1 around 2000 combinations of values for the thresholds and δ (see Section 3.5.1 for more details). The results show that the PWA model is robust in the sense that the oscillators built from the set of threshold parameters generated by Algorithm 1 all have the same qualitative behaviour, independently of the exact values of the thresholds.

Algorithm 1 Numerical estimation of the threshold parameters.

-
- 1: **Input** : $V_R = 44.4$, $k_{Rr} = 80.1$, $V_B = 0.142$, $V_D = 19$, $\gamma_R = 0.7$, $\gamma_D = 0.156$, $\gamma_B = 2.58$.
 - 2: Pick δ such that $\frac{V_R}{3\gamma_B} < \delta < \frac{V_R}{\gamma_B}$.
 - 3: Pick P_{low} such that $P_{low} > \frac{2V_R}{3\delta\gamma_B - V_R} \frac{V_D V_B}{\gamma_D \gamma_B}$, and define $B_{eq} = \frac{V_R}{\gamma_B P_{low}}$, $B_0 = B_{eq}$, $D_0 = \frac{V_B B_{eq}}{\gamma_D}$, $R_0 = \frac{V_D V_B B_{eq}}{\gamma_D \gamma_R}$, $P_0 = P_{low}$.
 - 4: Compute $t_{P_{min}}$ solving $D(t_{P_{min}}) = \frac{\delta\gamma_B}{V_D}$, with initial conditions of 3.
 - 5: Check :
 - if $P(t_{P_{min}}) > 0$ go to 6.
 - if $P(t_{P_{min}}) < 0$ go back to 2 and pick another δ .
 - 6: Pick d_6 such that $d_{6min} < d_6 < d_{6max}$ with d_{6min} such that $D(t_5 + d_{6min}) > \frac{V_R}{V_D}$ and d_{6max} such that $P(t_5 + d_{6max}) < P_{low}$ and $R(t_5 + d_{6max}) < \frac{V_R}{\gamma_R}$.
 - 7: Compute d_7 such that $P(t_6 + d_7) = P_{low}$.
 - 8: Check :
 - if $d_7 < \frac{(V_R - \delta\gamma_B)d_6}{V_R}$ go to 9.
 - if there is no solution or if $d_7 > \frac{(V_R - \delta\gamma_B)d_6}{V_R}$ go back to 6 and pick another d_6 .
 - 9: Compute R_{int} such that $R_{int} = R(t_5 + d_6)$.
 - 10: Pick d_8 such that $\frac{B(t_7) - \frac{V_R}{\gamma_B P_{low}}}{V_R} < d_8 < \frac{B(t_7)}{V_R}$.
 - 11: Compute B_{high} such that $B(t_7 + d_8) = B_{high}$.
 - 12: Compute d_{1max} such that $R(t_8 + d_{1max}) = R_{int}$.
 - 13: Compute P_{high} such that $P(t_8) + p_{add} = P_{high}$, with $p_{add} = 200$ initially.
 - 14: Check :
 - if $P(t_8 + d_{1max}) > P_{high}$ go to 15.
 - if $P(t_8 + d_{1max}) < P_{high}$ go back to 13 with $p_{add} = p_{add} - 10$.
 - 15: Check if the oscillator goes through all the eight stages in the specified physiological order for several periods and save the threshold parameter values and δ .
 - 16: **Output** : set of parameters describing a circadian cycle : δ , P_{low} , R_{int} , B_{high} , P_{high} .
-

3.4.1 Theoretical robustness of qualitative properties

The construction of the PWA system provides a robust order of protein peaks and of maximal values and ensures the phase opposition between B and P for any oscillator whose threshold parameters were generated by Algorithm 1. Indeed Algorithm 1 satisfies a set of constraints on the threshold parameter values which ensures the progress of the oscillator through the eight stages in the expected order, which itself guarantees the peak-ordering and phase opposition

properties, as shown in Proposition 5.

Proposition 5. *Under Assumptions A.1-A.8 and Propositions 1 to 4, the following hold :*

- (a) *The maximum of B is reached at the boundary between stages 6 and 7 and B is at its minimum during stages 1, 2 and 3;*
- (b) *The maximum of P is reached at the boundary between stages 2 and 3 and the minimum of P is reached during stage 6;*
- (c) *The maximum of R is reached in between the maxima of B and P .*

Proof: (a) The variable B peaks when B is above its threshold B_{high} , which is during stages 5 to 8. Especially, since during stages 5 and 6 B strictly increases (in stage 5, B increases and tends to B_{eq} and in stage 6 $\dot{B} = V_R - \gamma_B \delta > 0$ with Assumption A.1) and during stages 7 and 8 B strictly decreases ($\dot{B} = -V_R < 0$), B reaches its maximal value at the boundary between stages 6 and 7 for any set of parameters returned by Algorithm 1. During stages 1, 2 and 3, B is constant and equal to its minimal value, which is just below B_{high} .

(b) P peaks when P is above P_{high} , which is during stages 2 and 3. The boundary between these two stages marks the point where P reaches its maximal value, with P strictly increasing during stage 2 ($\dot{P} = V_D D > 0$) and P strictly decreasing during stage 3 ($\dot{P} = V_D D - V_R < 0$ with Assumption A.6). P reaches its lowest values during stages 6 and 7, when P is below P_{low} . The system definition and Proposition 1 induce P minimal value during stage 6.

(c) R peaks when R is above its threshold, which is during stages 7, 8, 1 and 2. Since the maximal value of B (transition from stages 6 and 7) corresponds to the time where R increases above R_{int} , and since the maximal value of P (transition from stages 2 and 3) corresponds to the time where R decreases below R_{int} , the maximal value of R necessarily occurs between the maximal values of B and P (and is in fact always observed during stage 1). \square

For any set of parameters returned by Algorithm 1, (a) and (b) demonstrate the phase opposition between B and P with B (resp. P) reaching its maximal value in the same stage as the minimal value of P (resp. B), and (c) shows the peak order B, R, P .

3.4.2 Cycle oscillations and phase portraits

From a numerical point of view, Figure 3.5(a) shows an example of an oscillator whose threshold values have been computed by Algorithm 1 while Figure 3.5(b) represents the oscillations of the continuous model. As might be expected, the maximal and minimal amplitudes of each protein vary between the two model formalisms, with the maximal value of P increasing by a factor of 1.5 and the maximal value R decreasing by about the same factor, while maximal value of B remains similar (for the PWA oscillator compared to the continuous one). In any

case, the order among amplitudes and the phase opposition between B and P are maintained, as are the forms of the curves and their dynamics.

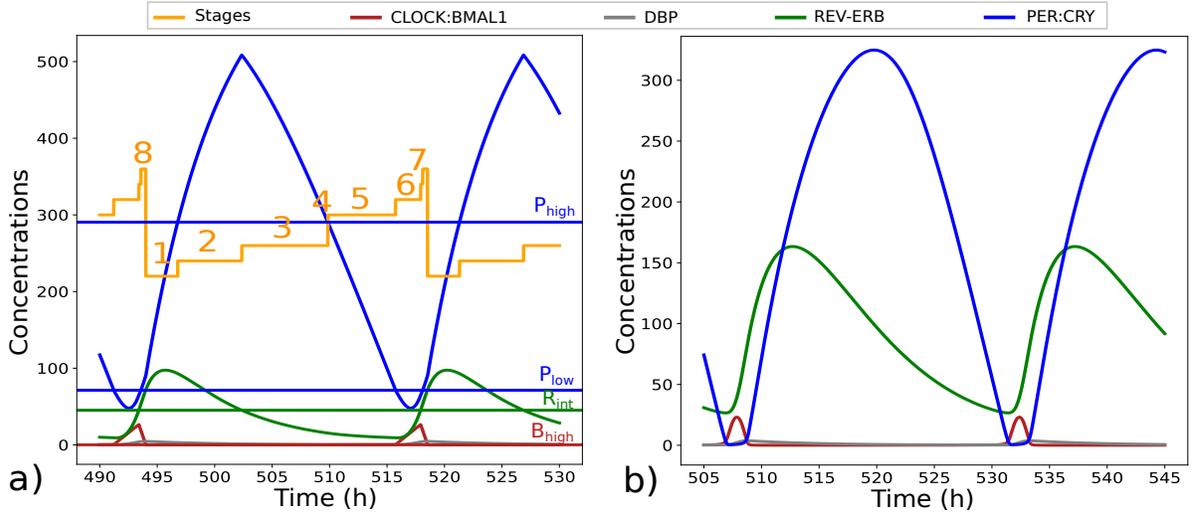


FIGURE 3.5 – Oscillations and cycle segmentation for (a) one oscillator generated by Algorithm 1 with $\delta = 12.55$, $B_{high} = 0.10$, $R_{int} = 45.21$, $P_{low} = 71.28$ and $P_{high} = 290.55$ and (b) for the continuous model (3.1).

These observations are confirmed by Figure 3.6, which shows the phase portraits of the continuous model with those of several oscillators from the PWA model, with different values of threshold parameters and of the scaling factor δ . Figure 3.6(a) highlights the phase opposition property, recovered by both models : when B reaches its highest values, P is low and inversely. Similarly, Figure 3.6(b) shows the similar dynamic between P and R , shared by all the oscillators : successively, R increases and reaches its highest values while P is at its intermediate ones, and then, as R decreases, P increases, peaks and decreases. From these figures, it is clear that the simplified PWA model closely represents the dynamical properties of the continuous model over a large range of its threshold parameters.

3.5 Cycle robustness : quantitative analysis and critical elements

We first introduce the following elements which will next serve as comparative analysis tools between all the oscillators generated by Algorithm 1. Letting $X \in \{B, R, P\}$, define :

1. A_{X_ϕ} : threshold value (called X_ϕ) relative to the amplitude ($X_{max} - X_{min}$) of the corres-

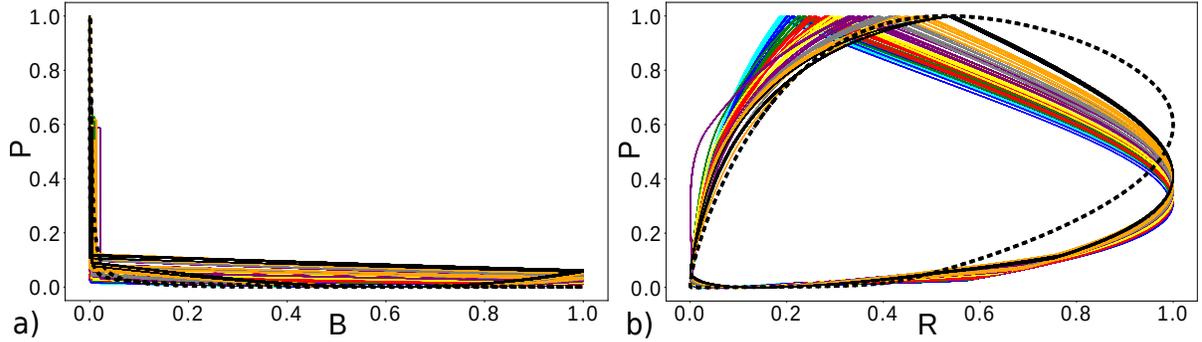


FIGURE 3.6 – Phase portrait projection on the planes : (a) B and P and (b) R and P for the continuous model (dashed black line) and for the PWA model (with different threshold parameters and one color stands for one δ value). Curves are normalized between 0 and 1 for comparison.

ponding variable (X) :

$$A_{X_\phi} = \frac{X_\phi - X_{min}}{X_{max} - X_{min}} \cdot 100 \quad (3.11)$$

2. τ_{X_ϕ} : time in hours that each variable (X) remains above its corresponding threshold (X_ϕ) over one period (T), corresponding also to protein peak duration :

$$\tau_{X_\phi} = \frac{t_{end} - t_{in}}{T}, \text{ such that } X(t) > X_\phi, \forall t \in [t_{in}, t_{end}] \quad (3.12)$$

3.5.1 Five-dimensional parameter space of the PWA model

The parameter space of the PWA model is composed of the four threshold parameters : B_{high} , R_{int} , P_{low} and P_{high} , and of one scaling factor : δ . Figure 3.7 represents this five-dimensional parameter space as estimated by Algorithm 1 but, for a clearer comparison, the figure represents the relative amplitudes for each threshold parameter, as defined in equation (3.11). Thus, relatively to the amplitude of their corresponding variables, the PWA model allows for a large range for R_{int} , P_{low} and P_{high} . Notice nevertheless that $A_{R_{int}}$ and $A_{P_{low}}$ increase or decrease directly with δ while the relation between δ and $A_{P_{high}}$ is less clear. The way the system is constructed implies that the minimal value of B will always be close to B_{high} and thus $A_{B_{high}}$ is small.

Although the region of threshold parameter values is wide, the periods (called T) of the oscillations of the PWA model remain in a small interval and are consistent with a circadian clock period, from 22 to 26h.

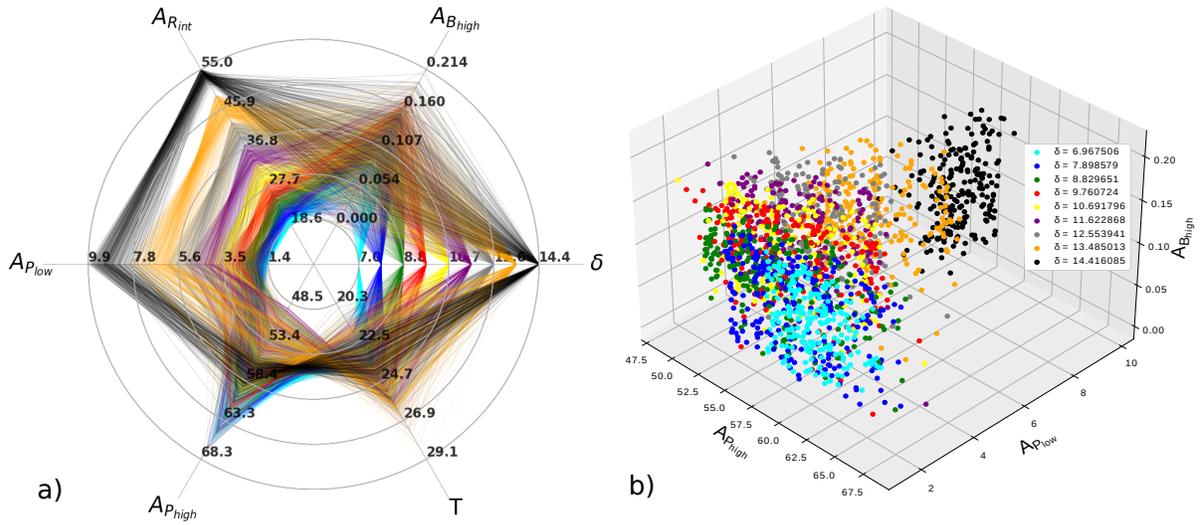


FIGURE 3.7 – (a),(b) Sets of threshold values computed by Algorithm 1 ensuring a correct representation of circadian clocks oscillations relatively to the amplitude of their corresponding variable (in %), and their associated period (T). One hexagon corresponds to one oscillator and its associated set of threshold and scaling parameters. One color for each δ .

3.5.2 Duration of protein peaks

Figure 3.8(a) represents the peak durations, as defined in equation (3.12), for each set of thresholds computed by Algorithm 1. Notice first that the duration of REV-ERB peak is inversely proportional to CLOCK:BMAL1 peak and to the scaling factor δ , highlighting one negative feedback loops characterizing circadian clocks : the more REV-ERB is expressed, the more CLOCK:BMAL1 is repressed, and inversely. The relation between $\tau_{B_{high}}$ and $\tau_{P_{high}}$ is less clear since the value of P_{high} is assessed last by Algorithm 1 and does not have a major influence on the correct progress of the cycle through the stages.

Then, the peak of B lasts between 7h and 10h and the peak of P lasts between 10h and 14h. The peak of R shows a larger range of durations, from 7 to 13h. Although no constraint about protein peak durations were given, the durations of B and P peaks reasonably correspond to biological results [139]. Concerning R , the oscillators with the biggest δ ($\delta \gtrsim 11$) have a shorter peak of R (between 7 and 10h) and seem more consistent with biological results [22].

3.5.3 Duration of stages and relation to daylight/night intervals

As the circadian oscillator performs one cycle, it goes through well-marked steps highlighted by our stages. Figure 3.9 represents minimal and maximal values of stage durations after

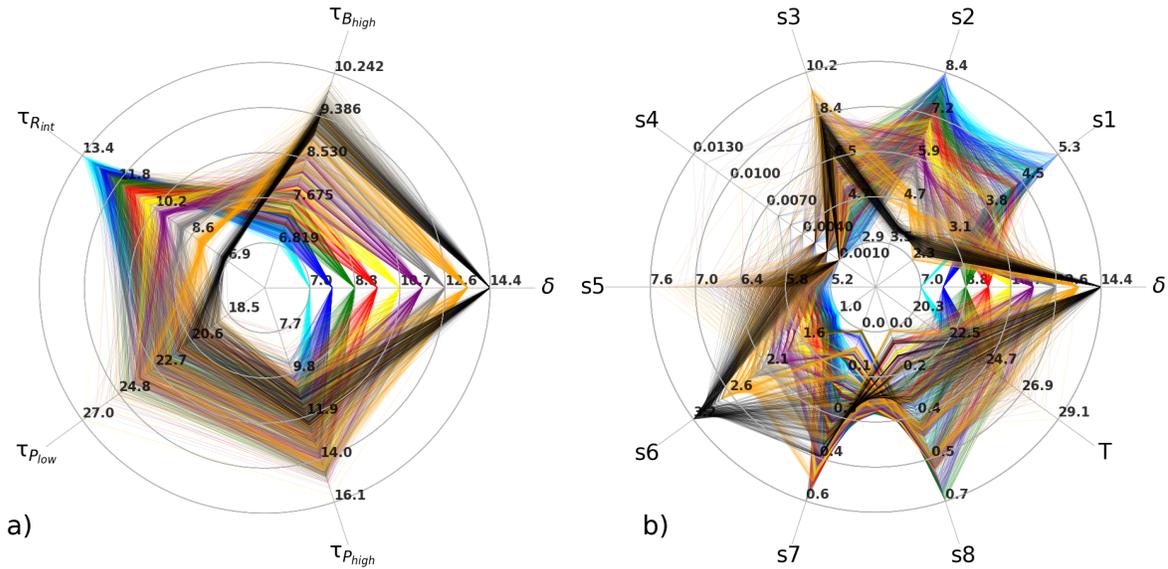


FIGURE 3.8 – Duration of protein peaks (a) and stage durations (b) in hours. One hexagon corresponds to one set of parameters. One color for each δ .

one period according to conditions from Propositions 1 to 4, while Figure 3.8(b) represent stage durations for the set of oscillators generated by Algorithm 1, after several periods.

As explained in Section 3.3.2, the duration of stage 6 is the first one to be defined, and directly depends on the values of δ and P_{low} . It varies from 1 to 3h and increases with δ and P_{low} . Then, stages 7 and 8 are very short and last less than one hour. Duration of stages 1 and 2 evolve inversely with δ . During stage 1, which lasts from 2.5 to 5h, P progressively increases, repressing B while R is still expressed. Stage 2 lasts from 3.5 to 8h and a short stage 2 represents an earlier degradation of R compared to a long stage 2. Concerning stage 3, its duration seems to evolve similarly to δ , and goes from 3 to 8h. Stage 4 is short and lasts less than half an hour. Finally, duration of stage 5 is around 6 hours and stays consistent from an oscillator to another.

Next, we draw a closer comparison between our analytic stages and the experimental Circadian Time phases as described by Takahashi *et al.* [139] in the mouse liver and establish a correspondence with daylight and night hours. At Circadian Time CT0, the circadian cycle is in a poised state, until transcriptional activity of CLOCK:BMAL1 is derepressed. Then, until CT12, (subjective daylight hours), both CLOCK:BMAL1 transcriptional activity and REV-ERB expression are observed, with a respective peak at approximately CT8 [139] and CT8-10 [22], [33], [51], [139]. Subjective night hours extend from CT12 to CT24 and are characterized by high levels of PER:CRY.

In our segmentation, stage 4 corresponds to a weak expression of all the variables and the

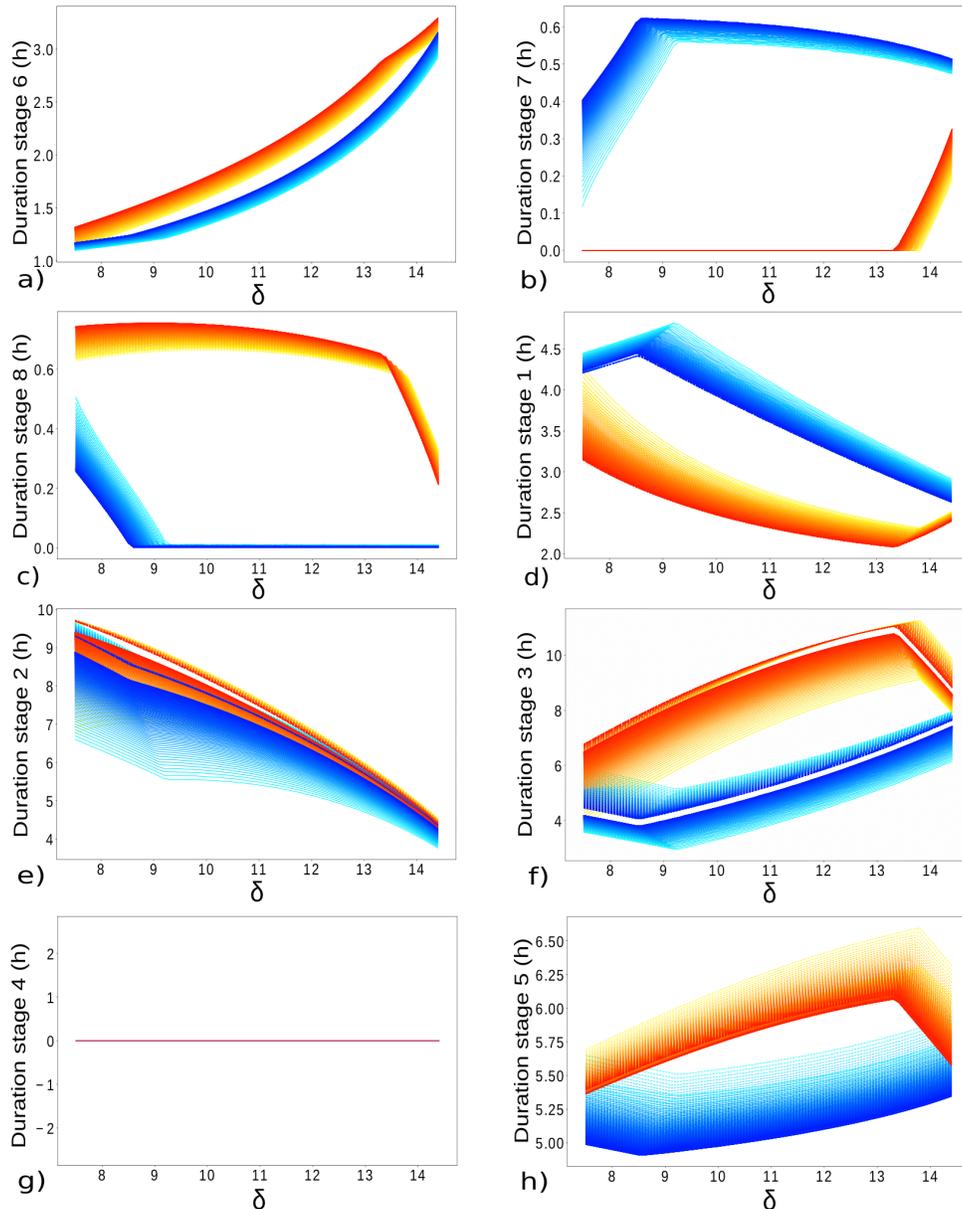


FIGURE 3.9 – (a) Minimal and maximal possible duration of stage 6 over δ according to conditions of Proposition 1 (lines in blue tones for $d_{\delta_{min}}$ and in orange tones for $d_{\delta_{max}}$). In each color, a darker line corresponds to a bigger P_{low} . (b) Durations of stage 7 over δ according to the minimal (lines in blue tones) and maximal (lines in orange tones) duration of stage 6. (c) Minimal and maximal possible duration of stage 8 over δ according to conditions of Proposition 2 (dashed lines for $d_{8_{min}}$ and solid lines for $d_{8_{max}}$) and according to the minimal and maximal duration of stage 6. (d-h) Durations of stages 1 to 5 are computed based on the minimal and maximal durations of stages 6 and 8. The lines use the same color and style code as for (a-c).

cycle enters stage 4 when P decreases under its threshold P_{high} , while R and B are low and leaves stage 4 when B increases above B_{high} . From a biological point of view, as soon as PER and CRY are degraded, CLOCK:BMAL1 is derepressed and starts its transcriptional activity. A short stage 4 could represent a fast derepression of B as soon as the levels of P are low and can be associated at the end of the poised state [139].

Then, since the peak of B is represented by stages 5 to 8 (when $B > B_{high}$) and since we observed the maximal value of R during stage 1, we assume that daylight hours are represented by stages 5 to 1, with stage 1 marking the transition between daylight and night hours, around CT12. The peak of P occurs during stages 2 and 3 (when $P > P_{high}$), and these two stages can be associated to night hours.

We can thus associate night hours to stages 2 and 3 and daylight hours to stages 4, 5, 6, 7, 8 and 1. In our model, night hours last around 10 to 14h and daylight hours are in a narrower interval, and are around 11-12h.

3.5.4 Two critical dynamical elements

Our analysis of stage durations and transitions identifies two critical moments during the circadian cycle : the first is the estimation of the duration of stage 6, where the system is defined by the scaling factor δ and which allows for P_{low} and R_{int} assessment, and the second is the evaluation of the duration of stage 8, which allows for B_{high} and P_{high} assessment.

In our piecewise affine model, the scaling factor δ represents the product of the concentrations of PER:CRY and CLOCK:BMAL1, when they are in phase opposition with PER:CRY at its minimum value. In fact, during this interval, it is difficult to approximate the dynamics of the degradation term $\gamma_B BP$ by a linear term in the continuous model. The best (and simpler) option was to consider that the product is constant and equal to some δ for a suitable time interval. And, indeed, this value defines a kind of scaling of the cycle that directly impacts the first threshold parameters to be defined (P_{low} and R_{int}), varying them in direct proportion to δ (see Figure 3.7(a)).

It is interesting to note that, as the factor δ ranges over a large interval, it sets the scale for the other threshold parameters while keeping the total period close to 24 hours (in an interval between 22 and 26 hours).

Another critical point in the cycle appears at stage 8, when extra conditions on the crossing times of the variables B and P are needed to guarantee the correct order of transition (see Proposition 2). In fact, stage 8 marks the last moments before CLOCK:BMAL1 repression and is of short duration (less than 1h). P is at an intermediate value and increasing, and should effectively repress B before P itself crosses P_{high} (since P and B cannot be simultaneously above their highest thresholds). The variable R should wait for B repression before it also starts decreasing, which is verified by Assumption A.8. In other words, the dynamics at stage 8 potentially allows for different outcomes, so time control needs to be more strict in order to

rule out the undesirable outcomes.

Globally, a well-defined duration of the stages 6-8 allows for a good assessment of all the threshold parameters, ensuring the expected progress of the oscillator through the stages and sustained oscillations.

3.6 Discussion

Our study is one of the first to propose a more precise, analytical and quantitative characterization of circadian clock cycle dynamics based on the approximation of a continuous model [3] including mass action terms by piecewise affine (PWA) equations. In this perspective, we proposed a segmentation of the circadian cycle into stages and to focus on a periodic sequence of transitions, consistent with qualitative properties of circadian cycles. Our main contribution is to propose a method to identify the parameter space of real threshold values leading to oscillators with the same periodic dynamics, defined by the specific sequence of transitions. This sequence is ensured by a set of inequality constraints on the threshold parameters and on some stage durations established from analytical solutions. An Algorithm satisfying all these conditions allows to explore, according to the scaling value δ , the region of threshold values. Our analysis shows that the PWA model allows for a large range of threshold parameters that exhibit the same dynamical behaviour, with a periodic orbit of about 24h.

An interesting feature of this model is the multiple roles of the thresholds. First used to divide the state space into well-defined regions, their real values turn out to be important to guarantee a periodic sequence of stage transitions for the system. They finally allow to assess and show robustness of our system. Another interesting feature is the factor δ representing the product of the minimal concentration of PER:CRY and maximal of CLOCK:BMAL1. This parameter provides a scaling for the PWA model such that, for each value of δ , a corresponding set of threshold parameters exists, that generates an ordered circadian cycle with period around 24 hours. In this way, a large range of allowed concentrations is established for the PWA, supporting high robustness of the system based on an inverse proportionality between PER:CRY and CLOCK:BMAL1, $B = \frac{\delta}{\gamma_B P}$, as the maximal concentration of CLOCK:BMAL1 becomes high, the minimum of PER:CRY should become smaller. Thus, among other quantitative points, our analysis indicates that the two concentrations minimal PER:CRY and maximal CLOCK:BMAL1 play a large role in setting the oscillatory regime of the cycle, and guarantee its robustness over a wide range of threshold values.

Our characterization of the circadian cycle involved the approximation of a mass action term into piecewise affine equations, which was made possible by the knowledge of qualitative properties of the ODE model we approximated. An open direction remains the development of a general method for approximating mass action terms through piecewise affine expressions in a suitable partition of the state space. Nevertheless, our analysis of the term $\gamma_B BP$ may be

useful for application in other clock models, where a similar term represents protein sequestering through binding. Some examples include models for *Neurospora crassa* [56], where other proteins play roles similar to BMAL1, PER and CRY.

To go further, we show in the next Chapter how our segmentation of the cycle can be adapted to any circadian clock model that includes the three main components B , R and P . Based on the time series for these three variables, we propose an alternative numerical method to assign parameter thresholds such that the healthy cycle sequence can be identified. This cycle partition will help characterize and compare circadian cycles quantitatively, notably to study mathematical model's agreement to biological properties, or highlight its most relevant terms for cycle robustness.

Chapitre 4

Benchmark for quantitative characterization of circadian clock cycles

This Chapter reproduces the article "Benchmark for quantitative characterization of circadian clock cycles", published in *BioSystems* in a 2025 issue [25].

Understanding circadian clock mechanisms is fundamental in order to counteract the harmful effects of clock malfunctioning and associated diseases. Biochemical, genetic and systems biology approaches have provided invaluable information on the mechanisms of the circadian clock, from which many mathematical models have been developed to understand the dynamics and quantitative properties of the circadian oscillator. To better analyze and compare quantitatively all these circadian cycles, we propose a method based on a previously proposed circadian cycle segmentation into stages. We notably identify a sequence of eight stages that characterize the progress of the circadian cycle. Next, we apply our approach to an experimental dataset and to five different models, all built with ordinary differential equations. Our method permits to assess the agreement of mathematical model cycles with biological properties or to detect some inconsistencies. As another application of our method, we provide insights on how this segmentation into stages can help to analyze the effect of a clock gene loss of function on the dynamic of a genetic oscillator. The strength of our method is to provide a benchmark for characterization, comparison and improvement of new mathematical models of circadian oscillators in a wide variety of model systems.

4.1 Introduction

Since life first appeared on Earth, organisms have developed an internal clock mechanism called "circadian clock" that they use to synchronize their physiology and behavior with the light/dark cycle and help them anticipate and prepare for daily changes in their environment.

Circadian clocks form a robust network of periodic interactions between genes and proteins that provide a rhythmic regulation of a large number of biological processes. Circadian clocks drive oscillations at all scales, from molecular, subcellular, cellular, tissues and physiological processes, including for instance chromatin modification, mitochondrial dynamics, cell division cycle, sleep-wakes cycles, change in body temperature, hormonal secretion, etc.

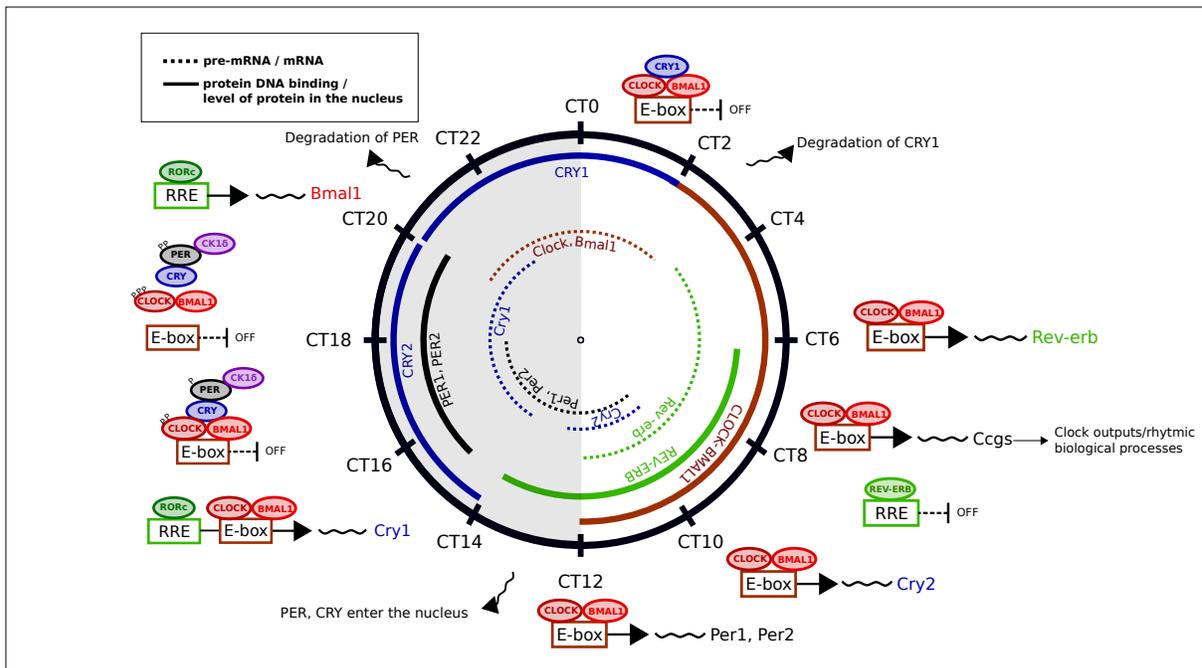


FIGURE 4.1 – Representation of the core circadian clock mechanism of the mouse liver in the nucleus and temporal expression levels of the core clock components at the mRNA level (dashed line) and at the DNA binding level (solid line). White and light grey coloring background represent respectively subjective day (CT0-CT12) and night (CT12-CT24). REV-ERB, CRY and PER refer respectively to REV-ERB α/β , CRY1/2 and PER1/2. This figure combines a collection of data from various articles [1], [7], [10], [22], [26], [32], [33], [51], [57], [59], [71], [83], [92], [94], [110], [127], [130], [131], [139], [141], [144]–[146], [151], [155].

In mammals, the circadian clock mechanism (see Fig. 4.1 for the mouse liver clock) is mainly based on two interlocked negative feedback loops (one between the complexes of proteins CLOCK:BMAL1 and PER:CRY and one between CLOCK:BMAL1 and REV-ERB), allowing circadian clocks to show sustainable oscillations over time in the absence of external synchronizers, with an approximated period of 24h [69], [115], [129]. To accurately describe time within a free-running circadian system, that is in the absence of external synchronizers (e.g., constant darkness), the unit of time used is Circadian Time, such that 1CT is equal to the cycle period divided by 24 [85]. For mice previously entrained in a 12h/12h light/dark cycle before

being kept in free-running condition, subjective day (sleep/rest/fasting phase in mice) extend from CT0 to CT12 while CT12 to CT24 correspond to subjective night (wake/activity/feeding phase in mice) [150].

In the early subjective day, at CT0, the circadian cycle is in a poised state [139], while the protein CRY1 blocks CLOCK:BMAL1 activity (see top right of Fig. 4.1). As CRY1 is gradually degraded, CLOCK:BMAL1, bound to the DNA response element Ebox (Enhancer box), promotes transcription of different genes (including the clock genes *Period Per1* and *Per2*, Cryptochrome *Cry1* and *Cry2* or *Rev-erb α* , *Rev-erb β* , but also the clock controlled genes (Cggs), needed for the regulation of various cellular, molecular, physiological and behavioral processes), with a peak observed around CT8 [139]. *Rev-erb* mRNA expression peaks around CT6-10 [22]. The resulting proteins REV-ERB α/β bind to the RRE (Rev Response Element) and block transcription of *Clock* and *Bmal1*, with a binding peak observed around CT10 [12], [22], [136].

The transition between subjective day and night, around CT12, is marked by PER and CRY nuclear translocation (see bottom of Fig. 4.1), leading to CLOCK:BMAL1 repression during the subjective night. First, PER enhances local concentration of the casein kinase CK1 δ at CLOCK:BMAL1-bound promoters in a CRY-dependent manner (interactions between PER and CLOCK:BMAL1 are facilitated by CRY), which leads to the phosphorylation of CLOCK. Hyperphosphorylation of CLOCK results in the displacement and sequestration of the complex CRY-CLOCK:BMAL1 from the Ebox and in the repression of CLOCK:BMAL1 transcriptional activity [26], [83]. PER1, PER2 and CRY2 binding activity peak between CT15 and CT18 [139].

During the end of the subjective night, RORc, in competition with REV-ERB for the RRE binding, promotes transcription of *Bmal1*. Around CT22-24, the translation of *Clock* and *Bmal1* mRNA generates the CLOCK and BMAL1 partner proteins (see top left of Fig. 4.1) which upon dimerization will bind to Ebox containing promoters. However, while PER is degraded, CRY1 expression is delayed and CRY1 binds to the CLOCK:BMAL1-E-box (around CT0) blocking CLOCK:BMAL1 transcriptional activity until the next cycle begins. CLOCK:BMAL1 is thus repressed during all subjective night, by displacement, sequestration and blocking [26], [32], [83], [155].

Systems of ordinary differential equations (ODEs) are relevant for modeling biological oscillators, and over the past decade several circadian clock models have been developed using this mathematical framework [3], [4], [21], [80], [127], [151].

To analyze the periodic behavior of circadian clocks, we previously proposed [23], [24] to partition the circadian time into stages defined according to the levels of abundance of the core clock components CLOCK:BMAL1, REV-ERB and PER:CRY, both in the cytoplasm and in the nucleus. Based on this segmentation, our group developed a piecewise affine model [23] to represent the dynamics of the circadian cycle within each stage, generating numerous oscillators

with different parameters, and giving insights on temporal estimation of some circadian events or critical points for correct cycle progression.

In this paper, we expand this cycle segmentation into stages and propose an Algorithm and a quantitative method to partition, characterize and compare any circadian cycle from both experimental data and diverse ODEs models.

Finally, considering experimental results showing that partial or complete loss function of *Cry2* lengthens the circadian period *in vivo* and *in vitro* [81], [149], we modeled this by decreasing the transcription rate of *Cry* in each model, and showed how the cycle segmentation can be used to characterize the new dynamic of an oscillator after a genetic perturbation.

Our quantitative method facilitates the study of a cycle and its time dynamics (sequence and duration of visited stages, time spent above some thresholds), highlighting biological properties recovered by the models, or detecting inconsistencies in the cycle, thus creating a benchmark which allows for validation, improvement and comparison of different models.

4.2 Characterization of circadian cycles

In this Section, we develop an automated method to partition and then characterize, study and compare the dynamics of any circadian clock cycle including the three core components CLOCK:BMAL1, REV-ERB and PER:CRY.

4.2.1 Circadian time partition into stages

Our method uses a cycle segmentation (introduced in [23] and based on the model from [3]), whose stages are defined according to the levels of abundance of the three fundamental clock components involved in the two main feedback loops : CLOCK:BMAL1, REV-ERB and PER:CRY (denoted respectively B , R and P throughout this paper).

By setting one threshold on each of the variables B and R (respectively B_{high} and R_{int}) and two thresholds on the variable P (P_{low} and P_{high}), the state space is thus subdivided into 12 regions. For biological reasons (such as the phase opposition between B and P , or the order of protein peaks - B , R , P -, both induced by the two negative feedback loops), only eight stages are considered as valid. Any circadian cycle is expected to successively evolve through these eight stages, in a well-defined order (in the order from stage 1 to stage 8), and to go through each stage only once during a same cycle (see Table 4.1 and [23] for more details).

To represent the transitional states when P is at an intermediate level, two thresholds are set on the variable P . However, in the case where a cycle fails to progress through the eight stages in the expected order, the partition can be adapted and enlarged by removing the threshold P_{low} , which corresponds to merging stages 5 and 6 together -renamed as stage 5-, 7 and 8 together -renamed as stage 7-, 4 and 9 together -renamed as stage 4- and 1 and 10 together -renamed as

stage 1-. The state space is then divided into eight stages : stages 1, 2, 3, 4, 5, 7, 11, 12, of which only stages 1 to 7 are expected from a biological point of view.

A more coarse-grained partition can still be considered by removing R_{int} , leading to a partition of the cycle into only four stages and permitting at least to check the phase opposition between B and P . In this case the following stages are thus merged together : stages 1 and 10 -renamed as stage 1-, stages 2 and 3 -renamed as stage 2-, stages 4 and 9 -renamed as stage 4-, stages 5, 6, 7, 8 -renamed as stage 5- and stages 11 and 12 -renamed as stage 11-. The corresponding expected stages order is 1,2,4,5. Notice that the new stages 1 and 4 are identically defined, but for convenience, to keep the ‘‘ascending’’ order through the stages, the property such that each stage is crossed only once in a same cycle, and to make a difference between the time before the peak of B and the one of P , we distinguish them.

TABLE 4.1 – A partition of the circadian time into stages.

| Stage | 1 | 2 | 3 | 4 |
|------------------|---|---|---|---|
| | PER:CRY peak | | | |
| Stage conditions | $R > R_{int}$ $B < B_{high}$ $P_{low} < P < P_{high}$ | $R > R_{int}$ $B < B_{high}$ $P > P_{high}$ | $R < R_{int}$ $B < B_{high}$ $P > P_{high}$ | $R < R_{int}$ $B < B_{high}$ $P_{low} < P < P_{high}$ |
| Stage | 5 | 6 | 7 | 8 |
| | CLOCK:BMAL1 peak | | | |
| Stage conditions | $R < R_{int}$ $B > B_{high}$ $P_{low} < P < P_{high}$ | $R < R_{int}$ $B > B_{high}$ $P < P_{low}$ | $R > R_{int}$ $B > B_{high}$ $P < P_{low}$ | $R > R_{int}$ $B > B_{high}$ $P_{low} < P < P_{high}$ |
| Stage | 9 | 10 | 11 | 12 |
| | Unexpected stages | | | |
| Stage conditions | $R < R_{int}$ $B < B_{high}$ $P < P_{low}$ | $R > R_{int}$ $B < B_{high}$ $P < P_{low}$ | $R < R_{int}$ $B > B_{high}$ $P > P_{high}$ | $R > R_{int}$ $B > B_{high}$ $P > P_{high}$ |

4.2.2 An adaptive algorithm for threshold estimation

In order to detect whether a given model exhibits the desired sequence of stages described above, we propose Algorithm 2 to partition automatically any circadian clock cycle. The goal of our algorithm is to find suitable threshold values while satisfying two conditions :

1. the cycle progresses through the eight (or six or four) stages in the expected order;
2. the duration of protein peaks, defined as the time spent by each variable above its corresponding threshold, are biologically-consistent (see Fig. 4.1 and Table 4.1).

First, notice that looking for thresholds such that the cycle progresses through the stages in the expected order amounts to saying that crossings of the different thresholds are expected in a well-defined order. Thus, the main idea of the Algorithm is to detect the errors occurring in the order of crossing thresholds and adjust the values of the thresholds in consequence.

Secondly, the peaks of CLOCK:BMAL1, REV-ERB and PER:CRY are defined such that B , R and P are respectively above B_{high} , R_{int} and P_{high} . Let's call τ_{X_ϕ} the time in hours that each variable (X) remains above its corresponding threshold (X_ϕ) over one period (T). In order to obtain duration of protein peaks that can be compared with biological duration, expressed in Circadian Time (see Fig. 4.1), we scale the results to a period of 24h (τ_{X_ϕ} is thus called τ_{sX_ϕ}):

$$\tau_{sX_\phi} = \frac{t_{end} - t_{in}}{T} \cdot 24, \text{ such that } X(t) > X_\phi, \forall t \in [t_{in}, t_{end}] \quad (4.1)$$

Let's set $\tau_{sB_{high}} = 10h$, $\tau_{sR_{int}} = 8h$, $\tau_{sP_{low}} = 20h$ and $\tau_{sP_{high}} = 12h$ as initial peak durations. By abuse of notation, we use through this paper "h" to refer to a "circadian time unit".

Algorithm 2 Numerical estimation of the threshold parameters

- 1: **Input** : time series data of B , R and P over one period, a partition, τ_{sX_ϕ} for each X_ϕ and a maximal number of iterations (nb_iter_max)
 - 2: Initialize thresholds : compute each threshold value (X_ϕ) such that the time spent above each threshold is τ_{sX_ϕ}
 - 3: Initialize threshold boundaries : compute lower (resp. upper) boundaries for each threshold such that the time spent above each boundary is $\tau_{sX_\phi} + 1$ (resp. $\tau_{sX_\phi} - 1$)
 - 4: Check stages order : verify if the sequence of stages corresponds to the expected order
 - 5: **while** expected stages order is not reached and nb_iter < nb_iter_max **do**
 - 6: Identify $X_{\phi_{crossed}}$ and $X_{\phi_{expected}}$, the threshold crossed instead of the threshold expected (determine the first stage transition error)
 - 7: **if** $X_{\phi_{crossed}}$ or $X_{\phi_{expected}}$ reached its boundary **then**
 - 8: Enlarge the interval of acceptable threshold values : increase or decrease the boundary(ies) reached as needed
 - 9: **end if**
 - 10: Tune the values of $X_{\phi_{crossed}}$ and $X_{\phi_{expected}}$ by increasing or decreasing them
 - 11: Check stages order : verify if the sequence of stages corresponds to the expected order
 - 12: **end while**
 - 13: **Output** : stages order and threshold values (X_ϕ)
-

Steps 1 to 3. Algorithm 2 takes as input time series data of B , R and P over one period -from

the output of a model or from experimental measures-, a target partition (see above) with an associated specified order through the stages and initial peak durations (τ_{sX_ϕ}) and generates an initial estimation of the thresholds values (as well as a tolerance range for threshold values), such that the value spent by each variable X above its threshold X_ϕ corresponds to τ_{sX_ϕ} (to $\tau_{smaxX_\phi} = \tau_{sX_\phi} + 1$ and to $\tau_{sminX_\phi} = \tau_{sX_\phi} - 1$ for the respective lower and upper threshold boundaries).

Step 4. Algorithm 2 verifies if the sequence of stages corresponds to the expected order.

Steps 5 to 12. While both the expected stages order and a maximal number of iteration are not reached, Algorithm 2 detects and corrects the errors occurring in the transitions between stages, by notably adjusting the thresholds X_ϕ .

Steps 6. To begin, Algorithm 2 determines the first stage transition error and identifies which threshold is crossed instead of the desired one.

In what follows, the idea is to adjust the values of each of the two thresholds identified as responsible for the error by increasing or decreasing them such that the oscillator crosses the expected threshold before the threshold crossed in error.

Steps 7 to 9. If a threshold has already reached its upper (resp. lower) boundary and that it must be increased (resp. decreased), the value of the upper (resp. lower) boundary is widen such that $\tau_{sminX_\phi} = \tau_{sminX_\phi} - 1$ (resp. $\tau_{smaxX_\phi} = \tau_{smaxX_\phi} + 1$).

Step 10. Algorithm 2 tunes the values of the threshold currently crossed (called $X_{\phi_{crossed}}$) and of the threshold expected ($X_{\phi_{expected}}$). The oscillator crosses $X_{\phi_{crossed}}$ at time $t_{X_{\phi_{crossed}}}$ and $X_{\phi_{expected}}$ at time $t_{X_{\phi_{expected}}}$, with $t_{X_{\phi_{crossed}}} < t_{X_{\phi_{expected}}}$. To ensure that $X_{\phi_{expected}}$ is crossed before $X_{\phi_{crossed}}$, the idea is to reverse the order in which the thresholds are crossed (see also Fig. C.1) :

$$X_{\phi_{crossed}} := X \left(\frac{t_{X_{\phi_{crossed}}} + t_{X_{\phi_{expected}}}}{2} + 2dt \right) \quad (4.2)$$

$$X_{\phi_{expected}} := X \left(\frac{t_{X_{\phi_{crossed}}} + t_{X_{\phi_{expected}}}}{2} - 2dt \right), \quad (4.3)$$

with $dt = t_{i+1} - t_i$.

If the updated values of the thresholds $X_{\phi_{crossed}}$ or $X_{\phi_{expected}}$ exceed the range of their boundary, the threshold(s) value(s) concerned is (are) brought back to their respective limits.

Step 11. Algorithm 2 verifies if the sequence of stages corresponds to the expected order.

Step 13. Algorithm 2 returns as output the first set of threshold values encountered allowing for the expected partition or the last stages order obtained if the Algorithm could not converge to a suitable set of thresholds within the maximal number of iterations.

4.3 Cycle segmentation as a benchmark for circadian clock models

To better appreciate how circadian clock models are close to experimental data, in terms of cycle segmentation timing and dynamics, we both applied our segmentation on a biological dataset and on five ODE models.

Since the variables of our segmentation represent (complexes of) core clock proteins in a cell (mixing nuclear and cytoplasmic values), we chose a dataset measuring the total amount of protein within a cell. Narumi *et al.* [114] recently proposed a method to quantify absolute amounts of proteins, using mass spectrometry techniques. They measured the number of copies per cell (see Fig 3A from [114]) of several proteins from mouse liver, including those of interest to us : BMAL1, CLOCK, REV-ERB α , REV-ERB β , PER1, PER2, PER3, CRY1 and CRY2. However, these data don't distinguish unbound proteins from complexes and measurements are carried out at low temporal resolution with time points only every 4 hours. Thus, to be as close as possible to the conditions of application of our segmentation, we associated each variable of the segmentation to the data available with the following strategy :

- B : represents the complex CLOCK:BMAL1, but we only had data on CLOCK and BMAL1 individually. Thus, we assumed that the number of complexes formed by CLOCK and BMAL1 is equal to the amount of the limiting protein, that is to say :

$$B := \min(CLOCK, BMAL1) \quad (4.4)$$

- R : represents both the protein REV-ERB α and REV-ERB β , thus :

$$R := REV-ERB\alpha + REV-ERB\beta \quad (4.5)$$

- P : represents anything related to PER and CRY and blocking the transcriptional activity of CLOCK:BMAL1, that is to say both the complex PER:CRY and the free protein CRY1

in the nucleus. We first represented PER as the sum of PER1, PER2 and PER3. Then, we assumed that the number of complexes formed by PER and CRY2 is equal to the amount of the limiting protein, that is to say equal to $\min(PER, CRY2)$. To take into account the repression on CLOCK:BMAL1 by CRY1, we thus represented P as following :

$$P := \min(PER1 + PER2 + PER3, CRY2) + CRY1 \quad (4.6)$$

We finally interpolated the data with a spline, generating semi-synthetic time series for B , R and P .

Then, we focused on five models well established in the literature : two models from Almeida *et al.* (a model with eight variables proposed in 2020 [4] and its four variables reduced version [3]), the Relógio *et al.* model [127] proposed in 2011, the Hesse *et al.* model [80] proposed in 2021 (which refines the Relógio *et al.* model) and the Brown *et al.* model [21] proposed in 2020. These models, covering earlier to quite recent examples, have different dimensions, but are built in a similar way : they focus on the core components of the circadian clock and on the two transcription-translation feedback loops, between PER:CRY and CLOCK:BMAL1 and between REV-ERB and CLOCK:BMAL1. Some models make the distinction between nuclear and cytoplasmic proteins or between phosphorylated and unphosphorylated proteins and others do not. Thus, similarly to the experimental dataset, we associated each variable of the segmentation with the variables of each model, as given by Table 4.2.

TABLE 4.2 – Association between the variables of the segmentation and the ones of each model or dataset

| Variable | $B :=$ | $R :=$ | $P :=$ |
|--|---|--|--|
| Represents | Complex CLOCK:BMAL1 | REV-ERB and paralogs | Proteins and complexes related to PER and CRY and blocking the transcriptional activity of CLOCK:BMAL1 |
| Narumi <i>et al.</i> dataset [114] | $\min(\text{CLOCK}, \text{BMAL1})$ | $\text{REV-ERB}_\alpha + \text{REV-ERB}_\beta$ | $\min(\text{PER1} + \text{PER2} + \text{PER3}, \text{CRY2}) + \text{CRY1}$ |
| Almeida <i>et al.</i> model [3] (reduced) | CLOCK:BMAL1 | REV-ERB | PER:CRY |
| Almeida <i>et al.</i> model [4] (original) | CLOCK:BMAL1 | REV-ERB | PER:CRY |
| Relogio <i>et al.</i> model [127] | CLOCK :BMAL | $\text{REV-ERB}_C + \text{REV-ERB}_N$ | $\text{PER:CRY}_C + \text{PER}^* : \text{CRY}_C + \text{PER:CRY}_N + \text{PER}^* : \text{CRY}_N$ |
| Hesse <i>et al.</i> model [80] | $\text{CLOCK :BMAL}_C + \text{CLOCK :BMAL}_N$ | $\text{REV-ERB}_C + \text{REV-ERB}_N$ | $\text{PER:CRY}_C + \text{PER:CRY}_N$ |
| Brown <i>et al.</i> model [21] | BMAL1 | REV-ERB_α | $\text{PER:CRY}_{1N} + \text{PER:CRY}_{2N}$ |

We next used Algorithm 2 to partition all these cycles, ideally into the eight previously defined stages but, otherwise, into six stages, or, as a last resort, into four stages. As shown in Fig. 4.2(a-g), for the experimental data based cycle and for all models except the Brown *et al.* model, the cycles could be successfully partitioned into the eight specified stages. Only a six-stages segmentation was effective for the Brown *et al.* model.

Next, we quantitatively characterize and compare all these circadian cycles. We specifically focus on the duration and timing of protein peaks and on the duration of stages.

4.3.1 Duration and timing of protein peaks

Algorithm 2 is expected to set thresholds such that the time spent by each variable above its corresponding threshold (see Eq. 4.1) is biologically-coherent (see Fig. 4.1). Recall that the initial (and expected) peak durations established were 10h for B , 8h for R and 12h for P . For all the cycles (see Table 4.3) the peak durations are relatively close to the ones expected, except for the peak of B of the Brown *et al.* model, which is 4h shorter than expected.

TABLE 4.3 – Peak durations scaled at a 24h-period for each dataset/model of Fig. 4.2(b-g)

| Dataset / model | Fig. 4.2 | $\tau_{sB_{high}}$ | $\tau_{sR_{int}}$ | $\tau_{sP_{high}}$ |
|--|----------|--------------------|-------------------|--------------------|
| Narumi <i>et al.</i> dataset [114] | b) | 9.22h | 9.74h | 12.32h |
| Almeida <i>et al.</i> model [3] (reduced) | c) | 9.23h | 8.16h | 10.18h |
| Almeida <i>et al.</i> model [4] (original) | d) | 9.52h | 10.63h | 10.93h |
| Religio <i>et al.</i> model [127] | e) | 9.06h | 8.01h | 11.37h |
| Hesse <i>et al.</i> model [80] | f) | 8.76h | 8.29h | 12.24h |
| Brown <i>et al.</i> model [21] | g) | 6.05h | 9.18h | 9.55h |

A temporal representation of the segmentation obtained for each cycle is illustrated in Fig. 4.2(b-g). Fig. 4.2(i) also illustrates the timing of B , R and P peaks across Circadian Time, for the eight-stages segmentations. Timing of B and P peaks are similar throughout all cycles : respectively 6 hours (from CT2 to CT8.1) and 8 hours (from CT14.9 to CT22.9) of the Circadian Time are shared by all the cycles partitioned into eight stages. This representation highlights the robustness of the relative phase of B and P . Only 3.5 hours of the Circadian Time (from CT10.1 to CT13.6) is shared by all the cycles for R , showing the variability in the timing of R peak which agrees with experimental results [103].

4.3.2 Duration of stages

Fig. 4.2(j) summarizes the stage durations obtained from Fig. 4.2(b-g).

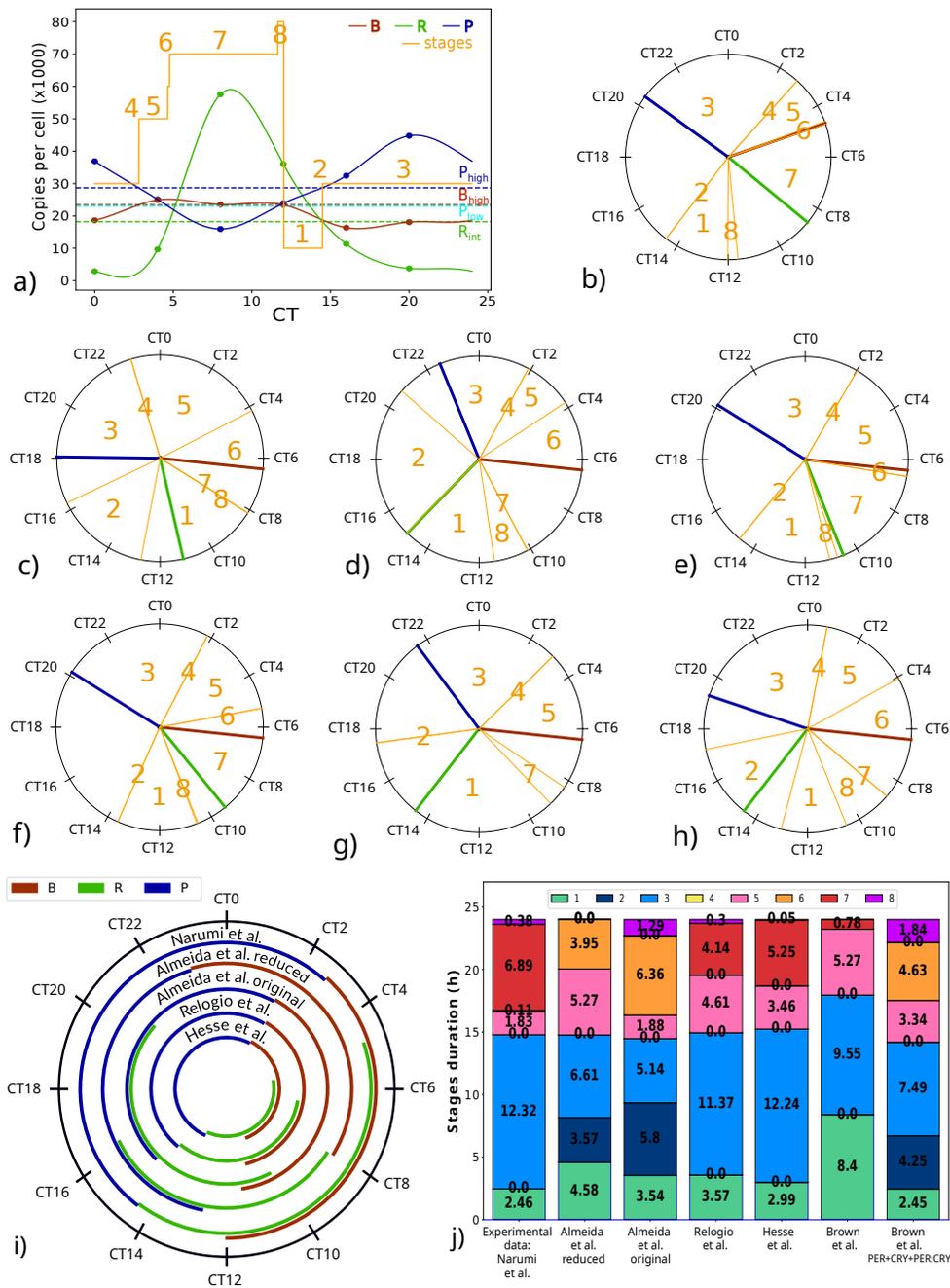


FIGURE 4.2 – **Illustration of circadian cycles segmentation.** (a) Cycle segmentation with data (see points) from Narumi *et al.* (times series are the result of data interpolation with a spline). Temporal representation (scaled to a period of 24h) of maximums of B , R and P (respectively in red, green and blue) and segmentation into stages (delimited between two orange lines) for (b) Narumi *et al.* dataset, (c) Almeida *et al.* model (reduced), (d) Almeida *et al.* model (original), (e) Relógio *et al.* model, (f) Hesse *et al.* model, (g) Brown *et al.* model and (h) Brown *et al.* model with $P := PER + CRY + PER:CRY$. The maximum of B is set at CT6.4 for models segmentation (since observed at CT8 in [139] and at CT4.7 in our reference experimental dataset [114]) and maximums of R and P and stages are represented relatively to the maximum of B . (i) Duration and timing of B , R and P peaks and (j) stage durations associated to each segmentation.

Cycles with an eight-stages segmentation.

First note that, regardless of the cycle, stage 4 is very short and lasts just a few seconds. This stage corresponds to a weak expression level of all the variables and the cycle enters stage 4 when P decreases under its threshold P_{high} , while R and B are low and leaves stage 4 when B increases above B_{high} . From a biological point of view, as soon as PER and CRY are degraded, CLOCK:BMAL1 is derepressed and starts its transcriptional activity. A short stage 4 could represent a fast derepression of B as soon as the levels of P are low enough.

Then, the intrinsic duration of stages 5, 6 and 7 is highly variable according to the cycles (from 0 to 7h) and the duration of stage 8 remains short (around 1h), even though the sum of these four stages, corresponding to the time where B is above B_{high} , stays consistent across the cycles, with a duration of about 9h. During these stages, levels of P are low while levels of B are high. Stage 1 lasts from 2.5 to 4.5h.

Finally, the sum of stages 2 and 3 (equivalent to $\tau_{sP_{high}}$) lasts around 11h for all the cycles, but the intrinsic duration of stages 2 and 3 depends on the cycles. Considering experimental observations (see Fig. 4.2(b)), the period during which P and R peak simultaneously, corresponding to stage 2, is expected to be short.

Cycle segmentation of the Brown *et al.* model.

For this model, the duration of stage 1 is twice to three times longer than the one of the other models. The cycle enters stage 1 when B decreases below B_{high} and exits stage 1 when P increases above P_{high} . Thus, relatively to B repression, P increases above its threshold P_{high} tardily. B and P are breaking phase opposition, due to a delay and a low activity of P . In the Brown *et al.* model, only the nuclear PER:CRY is taken into account while in the other models, both cytoplasmic and nuclear are considered. Remarkably, if we model the complex PER:CRY in the cytoplasm by summing up the variables CRY1, CRY2 and PER (proteins in the cytoplasm) and apply Algorithm 2, we obtain an eight-stages segmentation with consistent durations of peaks of proteins and durations of stages similar to those of other models (see Fig. 4.2(h,j)). Our cycle segmentation analysis thus suggests that the addition of a new variable representing cytoplasmic PER:CRY to the model would lead to a partition into eight stages and more realistic peak durations.

4.3.3 Stages related to Circadian Time phases in the literature

Using extensive DNA binding profiling in the mouse liver, Takahashi *et al.* [139] proposed six distinctive phases characterizing the circadian cycle, as summarized in Fig. 4.3.

According to their description, the circadian cycle begins with a poised state, at CT0, during which “CLOCK:BMAL1 and CRY1 bind to E-box”. A derepression phase follows, at CT4, “as

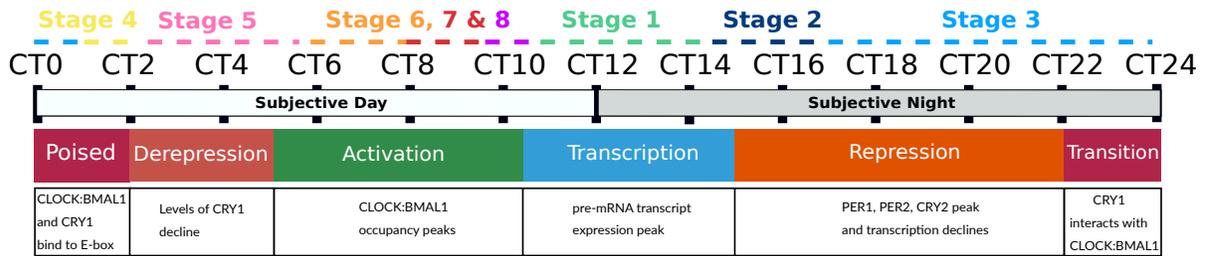


FIGURE 4.3 – Temporal analogy between the phases described by Takahashi in [139] and our cycle segmentation stages. The dashed line approximates the temporal expression of each stage.

the levels of CRY1 decline”. Thus, between CT0 and CT4, B is gradually derepressed as levels of P are decreasing, corresponding in our segmentation to stage 4 and the beginning of stage 5.

The third phase consists in “a major activation phase at CT8 during which CLOCK:BMAL1 occupancy peak”, and is followed by a “transcriptional activation phase at CT12-15 during which pre-mRNA transcript expression peak”. CLOCK and BMAL1 binding activities are observed throughout subjective daytime hours, until CT12, while REV-ERB peak is observed in the late daytime. In our segmentation, stages 5 to 8 characterize high levels of B . Thus, stages 5 to 8 spread out subjective daytime hours, from CT2 to CT12. Then, since (i) we observed the maximum of R either in stage 7, 1 or 2, (ii) the transition between stage 8 and stage 1 represents B repression, and (iii) levels of P are increasing during stage 1, we assumed that stage 1 marks the transition between daytime and night hours, around CT12.

Then, they identified “a repression phase at CT15–CT18 during which PER1, PER2 and CRY2 occupancy peaks and transcription declines”. In other words, levels of P are high and P strongly represses B , as characterized by stages 2 and 3 of our segmentation.

Finally, the cycle is in “a transition between the end of repression and the beginning of the next cycle”, marking the end of subjective night hours, that we associated with the end of our stage 3.

Roughly, confirming the results obtained in 3.5.3, we thus could associate subjective night hours to stages 2 and 3 and daytime hours to stages 4, 5, 6, 7, 8, while stage 1 is at the day-to-night transition.

4.3.4 Algorithm 2 provides accurate solutions to ensure the expected segmentation

We show in this Section the ability of Algorithm 2 to find accurate solutions for threshold estimation, with the particular example of the circadian cycle segmentation from the Narumi *et al.* dataset. In this case, threshold values are extremely sensible to ensure the partition into

the eight stages, and a small variation of threshold values would induce the disappearance of some stages. For example, let's take a closer look at P_{high} . This threshold is crossed by P twice during a cycle : at the boundary between stage 1 and stage 2, while P increases and at the boundary between stage 3 and stage 4, while P decreases. Moreover, our segmentation gave $\tau_{sP_{high}} = 12.3h$. To reduce this peak duration, we could consider to increase the value of P_{high} . On one side, this would increase the duration of stage 4 and decrease the duration of stage 3, which is possible since stage 3 lasts 12.32h and stage 4 lasts 0.001h. However, on the side of the transition between stage 2 and 3, since stage 2 is very short (0.005h), increasing (even if very little) P_{high} would induce R_{int} crossed before P_{high} and lead to an unexpected order of stages. The set of solutions for P_{high} is then restricted. Considering the short duration of stages 2, 4, 6 and 8, we could similarly show that the range of possible values for all thresholds is small.

4.4 Knockdown impacts on oscillator dynamics

As another application, we used our segmentation into stages to investigate the changes in the dynamics and the reorganization of the circadian cycle upon the knockdown of a core clock component. The experimental deletion or silencing of *Cry2* reproducibly leads to a long period phenotype under free-running conditions [81], [126], [158]. Building on these experimental results, we mimicked the *Cry2* knockdown in the previously studied models by multiplying the transcription rate of *Cry* (or, if not applicable, the transcription rate of PER:CRY [24]) by a factor ε lower than 1. This leads to a decrease of the transcription rate of *Cry* and to an increase of the period as ε decreases below 1.

Using the segmentation into stages, we aimed at studying and comparing the cycle dynamic between a reference oscillator (i.e. $\varepsilon = 1$) and long-period oscillators (i.e. $\varepsilon < 1$). Considering the set of constraints required and the quantity of information returned by the eight-stages segmentation, as well as the variability in the timing expression of REV:ERB, it appeared that the eight-stages segmentation was not the most suitable cycle partition. For an easier comparison and for better highlighting some observations, we chose the segmentation into four stages. In this case, only two thresholds are set : B_{high} on B and P_{high} on P . The resulting stage order is, as explained in the Section 4.2.1, 1, 2, 4, 5. Stage 2 (resp. 5) represents P (resp. B) above P_{high} (resp. B_{high}) and B (resp. P) below B_{high} (resp. P_{high}). Stages 1 and 4 are identical, with B and P lower than their respective thresholds. We nevertheless distinguish them to differentiate the time before the peak of B and the peak of P . Finally, stage 11 may also be part of the four-stages segmentation and corresponds to B and P above their respective thresholds simultaneously.

To compare and characterize each cycle (varying according to ε) within and across models, we adopted the following strategy :

1. Normalize the amplitudes of all the cycles between 0 and 1
2. Use Algorithm 2 to compute the values of B_{high} and P_{high} for a four-stages segmentation

- applied to the reference oscillator (i.e. $\varepsilon = 1$)
3. Fix the thresholds for each oscillator (with the values determined during the previous step)
 4. Partition the cycles with the fixed threshold values

4.4.1 Stage order and durations

In the reduced model of Almeida *et al.*, the initial order of stages (1, 2, 4, 5, 1) persists regardless the value of ε . For the Relógio *et al.*, Hesse *et al.* and the original Almeida *et al.* models, stage 4 disappears and is replaced by stage 11 giving rise to the order 1, 2, 11, 5, 1. Fig. 4.4 shows the stage durations, as a function of ε .

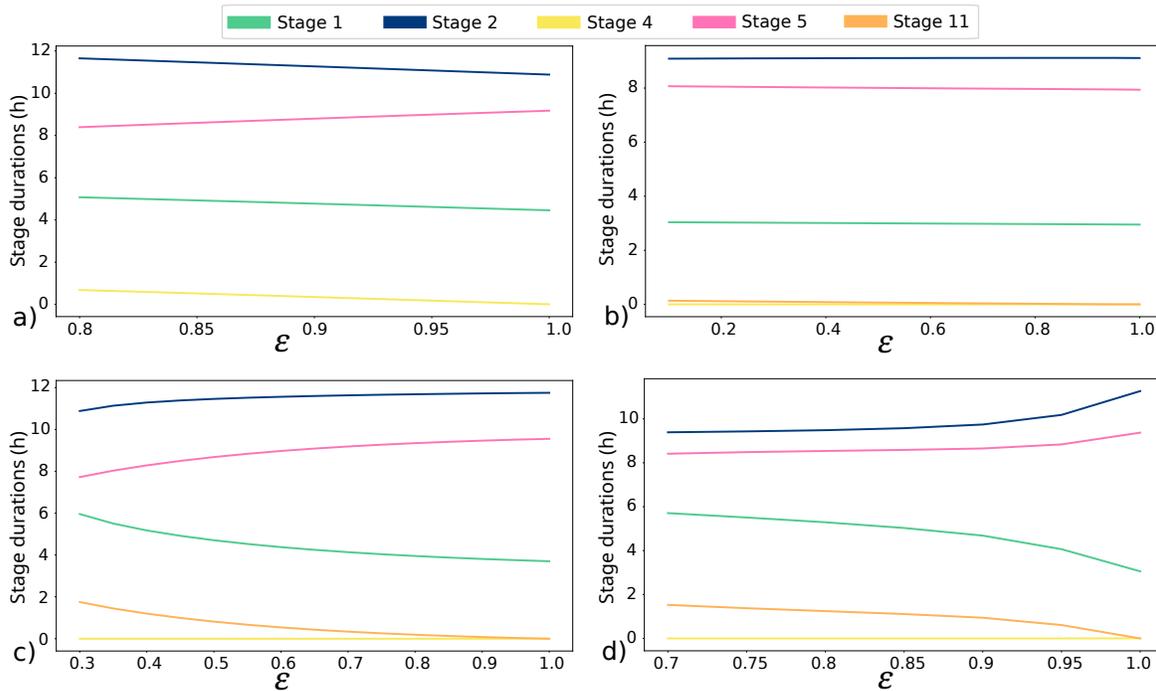


FIGURE 4.4 – **Stage durations as a function of ε .** (a) Almeida *et al.* (reduced), (b) Almeida *et al.* (original), (c) Relógio *et al.* and (d) Hesse *et al.* models. The range of ε in each model corresponds to a change of 1.3 hours in the total period (except in case (b), where only a small period variation is observed with ε).

A common observation is the increase of stage 1 as ε decreases. The oscillator enters stage 1 after stage 5, while B decreases below B_{high} and leaves stage 1 while P increases above P_{high} . An increase of stage 1 means that, relatively to the time where B crosses B_{high} , the time at which P crosses P_{high} is delayed.

Then, two different behaviors arise according to the models : either stages 2 and 4 increase as ε decreases (Fig. 4.4(a)), or stage 2 decreases and stage 11 increases (Fig. 4.4(b-d)). In the first case, an increase of stage 4 represents a delay of the increase of B above B_{high} relatively to the decrease of P below P_{high} . This delay results in a shorter peak of B as represented by the decrease of stage 5. In the second case, stage 2 decreases with the decrease of ε and is followed by stage 11. Stage 11 is defined by both B and P above their thresholds. Thus, stage 2 followed by stage 11 highlights that B increases above B_{high} while P is still above P_{high} : the phase opposition between B and P is misaligned.

4.4.2 Phase Difference Curves

To go deeper into this analysis, we introduce a tool to compare the dynamics of two oscillators throughout their cycle. The phase response curve (PRC) is commonly used to capture the effect of a perturbation on the phase of a periodic oscillator. Considering a reference position/phase in a cycle (or an observable event in experiments such as the onset of locomotor activity of mice), the phase response curve shows the phase shift of the perturbed oscillator according to the phase at which the stimulus (light pulse for example) is applied [133]. Here, we introduce the phase difference curve to compare the dynamic between two oscillators, of which one is affected by a knockdown. Thus, instead of analyzing the phase shift of one reference position following a stimulus at different times, we propose to compute the phase shift between a reference oscillator and an oscillator with a knockdown at each amplitude point of the cycle. For this, let oscillator 1 be the reference oscillator, and oscillator 2 be the one impacted by a knockdown. The amplitudes of each oscillator are normalized between 0 and 1. Let the time of the minimum of R be the initial starting point. Then, starting from this initial time, the phase difference curve corresponds to the phase shift between oscillator 2 and oscillator 1 for each amplitude point (each phase) of each variable throughout a cycle. In practice, this amounts to computing the time that variable X of oscillator 2 needs to reach the same amplitude as oscillator 1 (see Fig. C.2), as given by Eq. 4.7 :

$$\Delta t = t_2 - t_1, \text{ such that } X_1(t_1) = X_2(t_2) \text{ and} \quad (4.7)$$

$$\text{sign}(X_1(t_1 - dt_1) - X_1(t_1)) = \text{sign}(X_2(t_2 - dt_2) - X_2(t_2)) \forall t_1 \in [0, T_1] \quad (4.8)$$

where X_i refers to variable X of oscillator i , and T_1 to the period of oscillator 1.

We thus computed the phase difference curves (PDCs) of a long-period oscillator compared to the reference oscillator (see Fig. 4.5). For each model, ε is tuned such that the period of oscillator 2 ($\varepsilon < 1$) increases by approximately 0.7h (0.32h for the original model of Almeida *et al.*) compared to oscillator 1 ($\varepsilon = 1$). This period augmentation is in the observed range of

period differences between WT mice and *Cry2* deficient mice (e.g., 0.86h in [81]).

The PDCs are represented over one cycle, whose duration corresponds to the period of oscillator 1, and the difference between Δt computed at the initial time and Δt computed at the end of the cycle is equal to the period difference between the two oscillators.

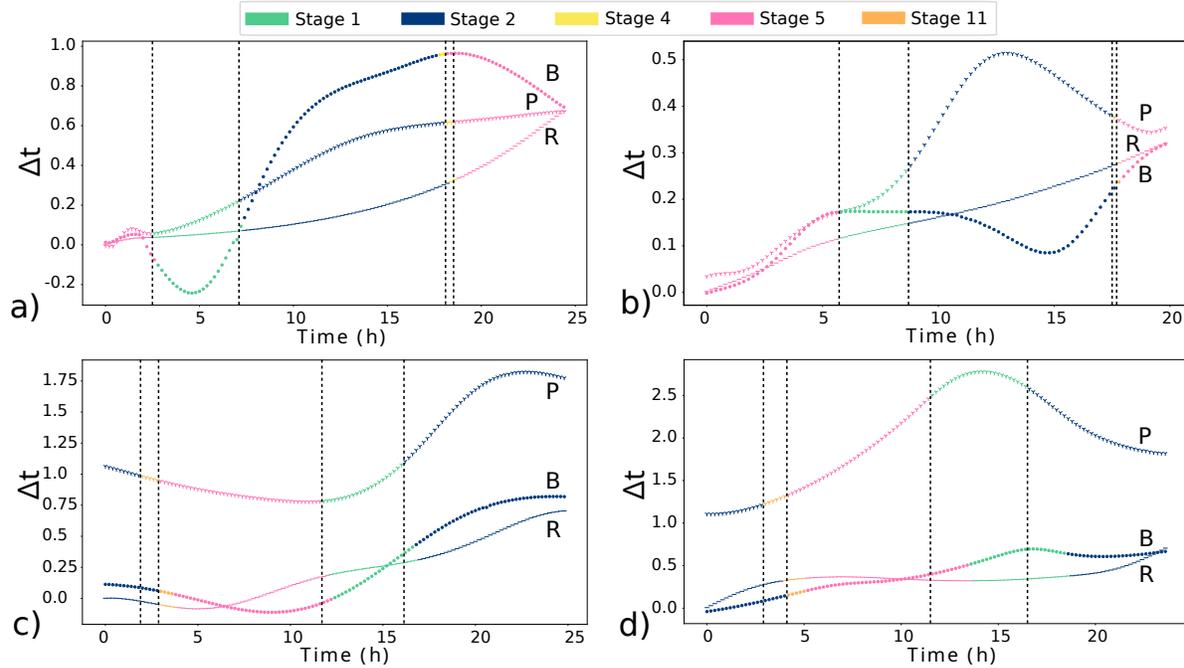


FIGURE 4.5 – **Phase difference curves between a long-period oscillator and the reference oscillator for B (dotted curves), R (dashed curves) and P (tri-star curves).** (a) Almeida *et al.* (reduced) (b) Almeida *et al.* (original) (c) Relógio *et al.* (d) Hesse *et al.* models. The marker color indicates the stage of the long-period oscillator at the time where a given variable of this oscillator reaches the same amplitude point as the same variable of the reference oscillator. Dashed vertical lines correspond to the time at which oscillator 2 transitions from one stage to another according to P_2 .

If the period augmentation is accompanied by a proportional augmentation across all stages of the cycle, one may expect a linear PDC. However, this is not the case for any of the oscillators. In fact, even within each oscillator the impact of ε on the dynamic of each variable differs, with distinct accelerations (phase advance) or slowdowns (delays) occurring at different cycle times according to the variables. For instance, a decrease in the PDC of variable X corresponds to an acceleration of oscillator 2 relative to the reference oscillator, that is, $X_2(t_2)$ reaches $X_1(t_1)$ “faster”, leading to a smaller $\Delta t = t_2 - t_1$. Similarly, an increase in the PDC corresponds to a delay in oscillator 2, with larger Δt . In general, the PDC for variable R tends to evolve monotonically and is closer to a linear form, for all models. Conversely, the PDC curves for B and P go through regions of acceleration and slowing-down throughout the cycle.

Fig. 4.5 also shows the stage of oscillator 2 at instant t_2 of the given variable (recall $X_2(t_2) = X_1(t_1)$). The dashed vertical lines mark the transitions of oscillator 2 from one stage to another according to the amplitude points reached by variable P_2 . Note that, along the horizontal axis (time), the transitions between two stages do not happen simultaneously among the three variables, and especially for P compared to B (see also Fig. C.2). Misaligned transitions highlight new behaviors in the dynamic of the three variables for oscillator 2 compared to oscillator 1 : consider the transition between stage 5 and 1 (transition from pink to green) of each model. This transition occurs earlier for the PDC of P (tri-star marker) than for B (dot marker). It corresponds to a delay in the phase of P_2 relatively to B_2 as compared to P_1 with B_1 : at the time at which B_2 decreases below B_{high} (transition from stage 5 to 1), P_2 is phase delayed compared to the phase at which P_1 was when B_1 decreased below B_{high} . Moreover, during stage 1, the PDCs of P keep increasing : oscillator 2 slows down, which increases the delay of P_2 compared to P_1 . Thus, due to the delay of P_2 at the beginning of stage 1 and its subsequent slowing down, the duration of stage 1 increases for oscillator 2, corroborating Fig. 4.4. This illustrates how a longer period is obtained by stretching stage 1 (which corresponds to the subjective day-to-night transition) through a slow down of P and a misalignment between the temporal evolution of B and P .

4.5 Discussion

Given the extensive biological knowledge on the circadian clock and the many mathematical models derived from it, our study aims to provide an explicit and general method for characterizing the dynamics of the circadian clock cycle.

Based on an analytic circadian clock cycle segmentation into stages, we first proposed an Algorithm to automatically partition the cycle of any circadian clock model built with ODEs and including the three core clock components : the protein REV-ERB and complexes CLOCK:BMAL1 and PER:CRY. The goal of this Algorithm is to detect whether a given cycle follows the expected order of stage transitions by finding a set of suitable threshold parameters. Starting with initial threshold values, the Algorithm detects the errors occurring in the order of crossing thresholds (and thus in the order of stages), and automatically corrects the errors by adjusting the values of the thresholds.

We applied this Algorithm to partition the cycles of an experimental dataset and of five different models. We analyzed the resulting segmentations, characterized the circadian cycles and checked their progression and dynamics along the cycle. One advantage of our method is to detect some problems that may appear and indicate ways for improvement. For example, a delay in the peak of PER:CRY in the Brown *et al.* model [21] seems due to a late and low activity of this complex relatively to the other proteins. To solve this problem, application of our Algorithm suggested the addition of a variable representing PER:CRY in the cytoplasm. Moreover, our

method facilitated the analysis of circadian cycles and highlighted some features shared by all models, showing for example robustness of CLOCK:BMAL1 and PER:CRY phases. Indeed, it appeared that intrinsic duration of stages 5, 6 and 7 (and of stages 2 and 3) may differ according to the models, but the timing and duration of their sum (corresponding respectively to B and P peaks) remained similar through the different cycles studied. Moreover, all models exhibited a short duration of stage 4, which could be associated to a fast derepression of CLOCK:BMAL1 as soon as levels of PER and CRY are low enough. The properties shared by all models in term of timing of protein peak or stage durations allowed us to establish a closer correspondence between our analytic stages and experimental circadian time phases.

Our segmentation analysis therefore provides a benchmark for quantitative comparison of different models of the mammalian clock : independently of their absolute amplitudes, units and total period, the time dynamics and progress of the cycle can be evaluated by the relative durations of protein peaks and stages. By observing both the progress of the circadian cycle through the stages and the relative duration of stages and protein peaks associated, this benchmark model will thus permit (in)validation of a clock model and provide insights for potential enhancements.

Finally, we showed how the segmentation into stages can be applied to investigate the new dynamics of an oscillator (throughout its entire cycle) following a perturbation such as a clock gene knockdown. As a mechanism for the long period phenotype caused by *Cry2* silencing, our analysis suggested a misalignment between the temporal evolution of BMAL1 and PER:CRY, through a delay in the augmentation of PER:CRY above its high threshold.

While our approach used the well documented mouse circadian clock as a benchmark, it could be easily implemented with the clock of many other model systems by proposing a segmentation into stages adapted to the circadian cycle of the organism of interest. Indeed, clock mechanisms and components are highly conserved accross metazoans from *Drosophila* [99] to humans. Further, even when components differ between Phyla for instance between fungi, plants and animal cells, very similar design principle including transcriptional/translational negative feedback loops are shared despite the evolutionary divergence [8], [34], [56], [118]. Our method provides a tool for quantifying the characteristics of the circadian clock cycle, allowing for instance an estimation of the time duration of the observed biological phases [139]. Moreover, it reveals those phases that are time-restricted and need to be finely adjusted (cf fast derepression, stage 4) or, conversely, those phases that can sustain higher variability. Finally, with its potential for application to other circadian clocks, this tool provides a means for studying and quantitatively comparing the cycle dynamics from various clocks, and to investigate whether and how quantitative temporal features are shared by different organisms.

Chapitre 5

Caractérisation des cycles d'horloges circadiennes couplées

Dans ce Chapitre, nous utilisons la méthode de caractérisation du cycle circadien présentée dans le Chapitre 4 pour approfondir l'étude du couplage entre oscillateurs circadiens, et analyser la dynamique des cycles d'un ensemble d'horloges couplées.

Certaines analyses présentées dans ce Chapitre reprennent celles publiées dans l'article "Cycle dynamic and synchronization in a coupled network of peripheral circadian clocks" en 2022 dans *Interface Focus* [24]. Dans cet article, la segmentation initialement proposée (et présentée dans le Chapitre 3, basée sur des seuils fixes et une partition en six étapes) était utilisée. Dans ce Chapitre, nous utilisons la partition plus complète du cycle, définie dans les Chapitres 3 et 4. Les analyses appliquées aux deux partitions ayant donné des résultats comparables, nous ne présentons que les résultats relatifs à la seconde partition.

5.1 Étude de l'influence du couplage sur la dynamique de deux oscillateurs circadiens

L'étude présentée dans la Section 2.2 a mis en évidence que deux oscillateurs circadiens couplés de périodes initiales différentes peuvent se synchroniser en ajustant leurs périodes individuelles sur une même période. Cette capacité de synchronisation dépend de la valeur de la force de couplage et de la différence de périodes initiales : une augmentation de la force de couplage permet d'une part d'élargir l'intervalle de différences de périodes initiales pour lequel les oscillateurs se synchronisent et d'autre part d'accélérer la synchronisation entre les deux oscillateurs (de diminuer le nombre de cycles nécessaire pour avoir des oscillateurs synchronisés suite à l'ajout du couplage).

Néanmoins, une synchronisation en termes de périodes n'implique pas une synchronisation en termes de phases. Une relation entre la période initiale et la phase après couplage existe :

l'oscillateur ayant la plus petite période initiale est, une fois couplé, en avance de phase par rapport à l'autre oscillateur. Remarquablement, la différence de phase entre les deux oscillateurs évolue au cours du cycle. Par exemple, elle est plus grande au moment où la variable P atteint son maximum qu'au moment où cette même variable atteint son minimum (voir Figure 2.5 (b)) suggérant que, malgré une synchronisation en termes de périodes, chaque oscillateur conserve sa propre dynamique.

Pour mieux comprendre les mécanismes de synchronisation et caractériser la dynamique de chaque oscillateur suite à l'ajout d'un couplage, nous utilisons notre méthode basée sur la segmentation du cycle circadien, que nous appliquons d'abord à un système de deux oscillateurs circadiens.

Ainsi, nous reprenons le modèle présenté dans la Section 2.1 que nous appliquons pour modéliser le couplage entre deux oscillateurs dont les périodes varient en fonction du terme ε (tel que l'oscillateur 1 ait $\varepsilon_1 = 1$ et l'oscillateur 2 $\varepsilon_2 = \varepsilon$, avec $\varepsilon_{min} < \varepsilon < \varepsilon_{max}$).

Nous utilisons la méthode de segmentation en étapes pour comparer les cycles de chaque oscillateur, avant et après couplage. Pour une meilleure comparaison entre tous les cycles, nous adoptons la même stratégie que celle pour étudier les cycles suite à une perte de fonction d'un gène (voir 4.4) :

1. Normaliser les amplitudes de tous les cycles entre 0 et 1
2. Utiliser l'algorithme 2 pour calculer les valeurs des seuils pour une segmentation du cycle de l'oscillateur de référence, c'est-à-dire quand $\varepsilon = 1$ et $k = 0$;
3. Fixer les seuils en prenant comme valeurs celles calculées à l'étape précédente ;
4. Décomposer chaque cycle en étapes selon les valeurs de seuils fixées.

5.1.1 Durée des étapes de deux oscillateurs couplés et synchronisés en termes de périodes

Figure 5.2 montre les durées des étapes de deux oscillateurs couplés en fonction de ε . Bien que les oscillateurs soient synchronisés en termes de périodes, la durée de chaque étape peut considérablement changer d'un oscillateur à l'autre (comparer les courbes de même couleur, pleines par rapport à celles en pointillés). De plus, les étapes successives par lesquelles passe chaque oscillateur sont différentes entre les deux oscillateurs et peuvent inclure des étapes initialement réfutées : par exemple, lorsque $\varepsilon > 1$, l'oscillateur 2 passe par l'étape 11 mais pas l'oscillateur 1.

Figure 5.2 montre un exemple des séries temporelles de deux oscillateurs couplés et synchronisés en termes de périodes mais dont l'ordre et la durée des étapes varient d'un oscillateur à l'autre.

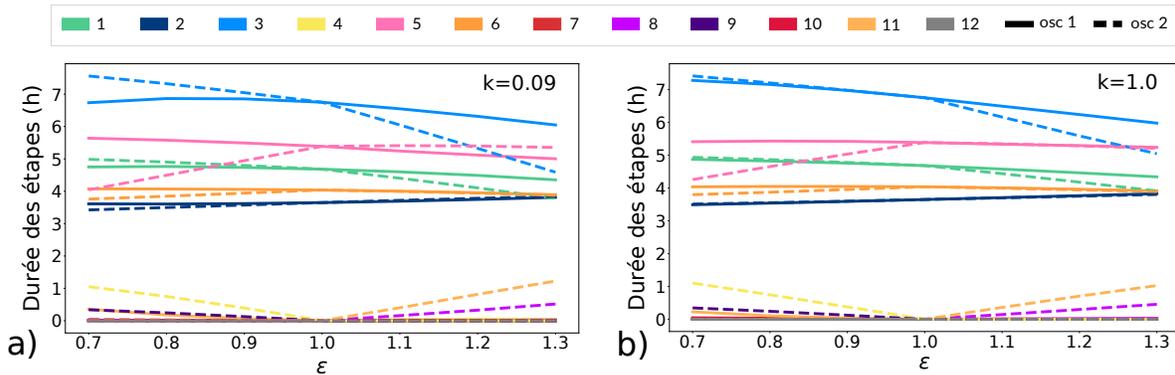


FIGURE 5.1 – Durée des étapes de deux oscillateurs synchronisés en termes de périodes et couplés avec (a) $k = 0.09$ et (b) $k = 1.0$. Les courbes pleines représentent l’oscillateur 1 ($\varepsilon = 1$) et les courbes en pointillés l’oscillateur 2 ($\varepsilon \neq 1$).

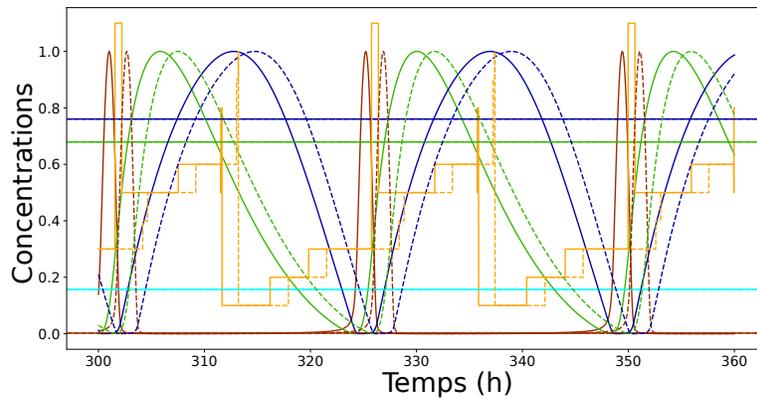


FIGURE 5.2 – Séries temporelles de deux oscillateurs synchronisés en terme de périodes mais dont l’ordre et la durée des étapes varient d’un oscillateur à l’autre. L’oscillateur 1 est en traits pleins, le 2 en pointillés. Les courbes sont normalisées entre 0 et 1. Les cycles de chaque oscillateur sont découpés en étapes, représentées par la courbe orange. L’ordonnée des courbes oranges correspond à l’étape dans laquelle se trouve l’oscillateur : 0.1 pour l’étape 1, 0.2 pour l’étape 2, 0.1*n* pour l’étape *n*.

Ces observations renforcent l’idée (déjà émise dans la Section 2.2 suite au constat de la variabilité dans les différences de phase au cours du cycle en fonction de la définition de la phase utilisée) que, même synchronisés en termes de périodes, chaque oscillateur garde, dans une certaine mesure, une dynamique qui lui est propre. Nous approfondissons par la suite cette observation.

5.1.2 Durée des pics de protéine de deux oscillateurs, avant et après couplage

Le grand nombre d'étapes rendant difficile la comparaison et l'identification de points communs entre les durées de chaque oscillateur avant et après couplage, nous nous concentrons désormais sur la durée des pics de protéines, définies par le temps passé par chaque variable au-dessus de son seuil haut, soit au-dessus de B_{high} pour B , R_{int} pour R et P_{high} pour P (voir Équation (3.12)). Figure 5.3 montre les durées des pics de protéines pour deux oscillateurs, avant et après couplage, en fonction de ε .

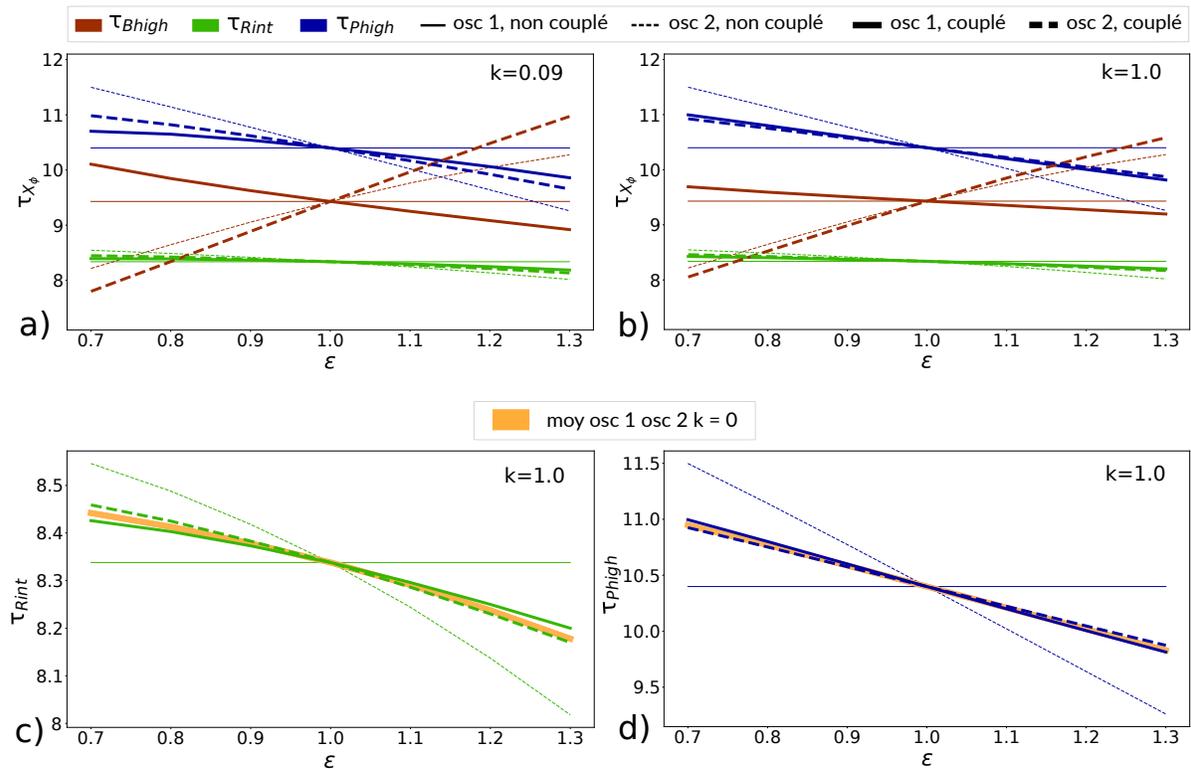


FIGURE 5.3 – (a,b) Durée des pics de protéines de deux oscillateurs avant couplage (courbes fines) et après couplage (courbes épaisses) avec (a) $k = 0.09$ et (b) $k = 1.0$. Les courbes pleines représentent l'oscillateur 1 ($\varepsilon = 1$) et les courbes en pointillés l'oscillateur 2 ($\varepsilon \neq 1$). (c,d) Zoom des courbes de (c) $\tau_{R_{int}}$ et (d) $\tau_{P_{high}}$ la figure (b). La courbe orangée représente la moyenne de la durée des pics des deux oscillateurs avant couplage (moyenne des deux courbes fines).

Des tendances claires ressortent au fur et à mesure que la force de couplage augmente (comparer Figure 5.3 (a) et (b)) :

1. $\tau_{P_{high}}$: les durées des pics de P des deux oscillateurs couplés tendent vers une même

- valeur, proche de la moyenne des pics de P des deux oscillateurs non couplés (comparer les courbes bleues épaisses avec la courbe orangée très épaisse de la Figure 5.3 (d));
2. $\tau_{R_{int}}$: les durées du pic de R , peu importe que les oscillateurs soient couplés ou non couplés, sont toutes comprises dans un petit intervalle, entre 8 et 8.5h. Toutefois, les durées des pics de R des deux oscillateurs couplés tendent vers une même valeur, proche de la moyenne des pics de R des deux oscillateurs non couplés (comparer les courbes vertes épaisses avec la courbe orangée très épaisse de la Figure 5.3 (c));
 3. $\tau_{B_{high}}$: les durées des pics de B des deux oscillateurs couplés sont très différentes, et peuvent atteindre une différence de 2h.

5.1.3 Courbes de différences de phases

Pour approfondir l'étude de la dynamique de chaque oscillateur après couplage, nous traçons les courbes de différences de phases entre deux oscillateurs couplés et synchronisés en périodes. Introduite dans la Section 4.4.2, la courbe de différences de phases (PDC) d'une variable X revient à calculer la différence de temps (Δt) que met la variable X_2 de l'oscillateur 2 pour atteindre le même point d'amplitude que la même variable X_1 de l'oscillateur 1, pour des courbes normalisées entre 0 et 1. Ainsi, une valeur de Δt négative (resp. positive) indique que l'oscillateur 2 est en avance (resp. retard) de phase par rapport à l'oscillateur 1.

Figure 5.4 montre les PDCs, sur une période, des variables B , R et P de deux oscillateurs couplés selon trois forces de couplage. L'oscillateur 1 est défini par $\varepsilon_1 = 1$ et l'oscillateur 2 par $\varepsilon_2 = 0.9$ ou par $\varepsilon_2 = 1.1$.

De manière générale, on observe 1) une réponse au couplage différente d'une variable à l'autre et selon le moment du cycle et 2) que l'augmentation de la force de couplage entraîne une diminution de l'amplitude des PDCs, et fait converger les valeurs des différences de phases vers 0 (comparer les courbes d'une même couleur mais d'opacité différentes), sans pour autant modifier la période à laquelle les deux oscillateurs se synchronisent, qui reste égale à la moyenne des périodes initiales de chaque oscillateur.

Les PDCs de R , en vert, sont proches de constantes tout au long du cycle et positives (resp. négatives) lorsque $\varepsilon < 1$ (resp. $\varepsilon > 1$) : R_1 et R_2 ont une dynamique similaire mais l'oscillateur avec la plus grande période initiale conserve un retard de phase par rapport à l'autre oscillateur.

Les PDCs de B mettent en évidence une dynamique différente entre B_2 et B_1 . Au cours du cycle, la variable B_2 ralentit ou accélère fortement par rapport à B_1 , entraînant des instants où elle est en avance de phase, et d'autres où elle est en retard de phase. Par exemple, dans le cas où $k = 1$ et $\varepsilon = 0.9$, B_2 présente par rapport à B_1 un retard de phase allant jusqu'à 0.6h et une avance de phase allant jusqu'à 0.2h.

Les PDCs de P , en bleu, montrent que, à mesure que la force de couplage augmente, les variables P tendent vers une synchronisation parfaite (même dynamique, pas de différence de

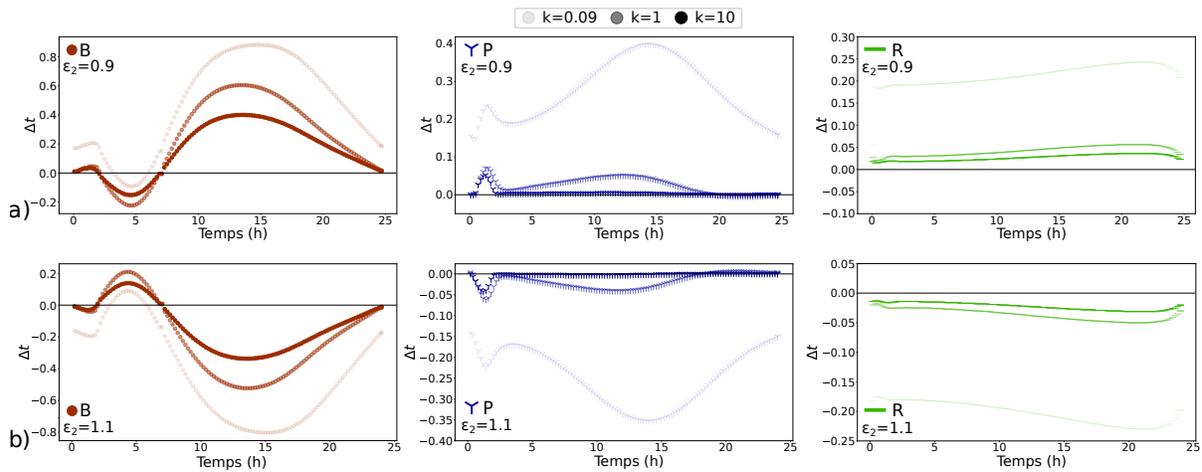


FIGURE 5.4 – Courbes de différences de phase au cours d’un cycle entre les variables B (points rouges), R (traits verts) et P (marqueurs "Y" bleu) de deux oscillateurs couplés avec $k = 0.09$, $k = 1$ ou $k = 10$ (les courbes plus foncées correspondent à des valeurs de k plus grandes). $\varepsilon_1 = 1$ et (a) $\varepsilon_2 = 0.9$ et (b) $\varepsilon = 1.1$.

phase), à l’exception d’une période d’environ 2h. Figure 5.5 permet de visualiser le moment du cycle durant lequel le couplage a un effet moindre sur la synchronisation des variables P : la désynchronisation entre les deux variables P débute quasiment au moment où P_1 atteint sa valeur minimale et quand B_1 augmente fortement et atteint sa valeur maximale. Durant cette période, les PDCs de B et P ont des tendances similaires. L’avance ou le retard de phase de P_2 par rapport à P_1 est, similairement à R , déterminé par la période initiale des oscillateurs.

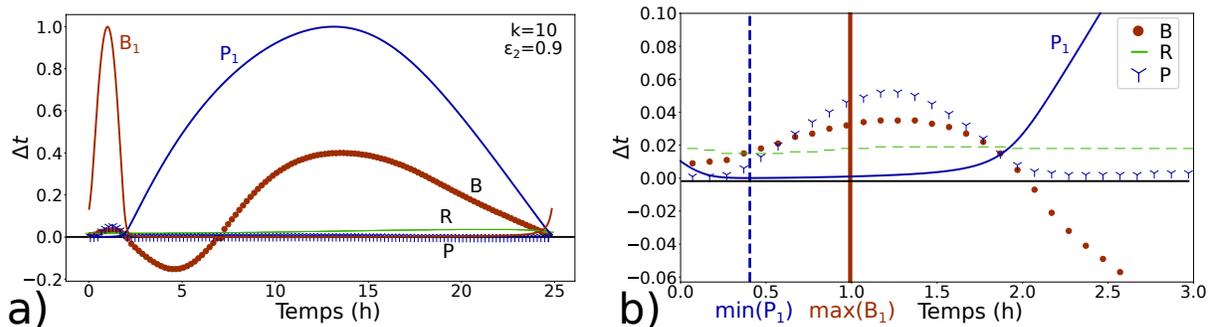


FIGURE 5.5 – (a) Courbes de différences de phases au cours d’un cycle entre les variables B (cercles pleins), R (traits fins) et P (marqueurs "Y") de deux oscillateurs couplés avec $k = 10$, et tel que $\varepsilon_1 = 1$ et $\varepsilon_2 = 0.9$. Même code couleur que Figure 5.6. Les courbes de B_1 et P_1 normalisées sont aussi représentées. (b) Zoom de (a).

Pour aller plus loin, regardons plus précisément ce qu’entraîne ces différentes dynamiques sur la durée des pics de B et de P en reprenant les oscillateurs 1 et 2 tels que $\varepsilon_1 = 1$ et $\varepsilon_2 = 0.9$, couplés avec $k = 1$. Figure 5.6 représente donc des PDCs de B et P identiques à celles de la Figure 5.4(a) mais avec un code couleur permettant de mettre en évidence les pics de P et de B : bleu pour $P_2 > P_{high}$ et $B_2 < B_{high}$ (=pic de P_2); rouge pour $B_2 > B_{high}$ et $P_2 < P_{high}$ (= pic de B_2); orangée pour $P_2 < P_{high}$ et $B_2 < B_{high}$. Dans cet exemple, B_2 et P_2 ne sont jamais simultanément supérieurs à leurs seuils. Les PDCs sont représentées sur une période, égale à la période à laquelle se synchronisent les deux oscillateurs (24.85h). Ainsi, la valeur de Δt calculée au dernier instant de la période (au temps 24.85h) est égale à celle calculée au premier instant (au temps 0h).

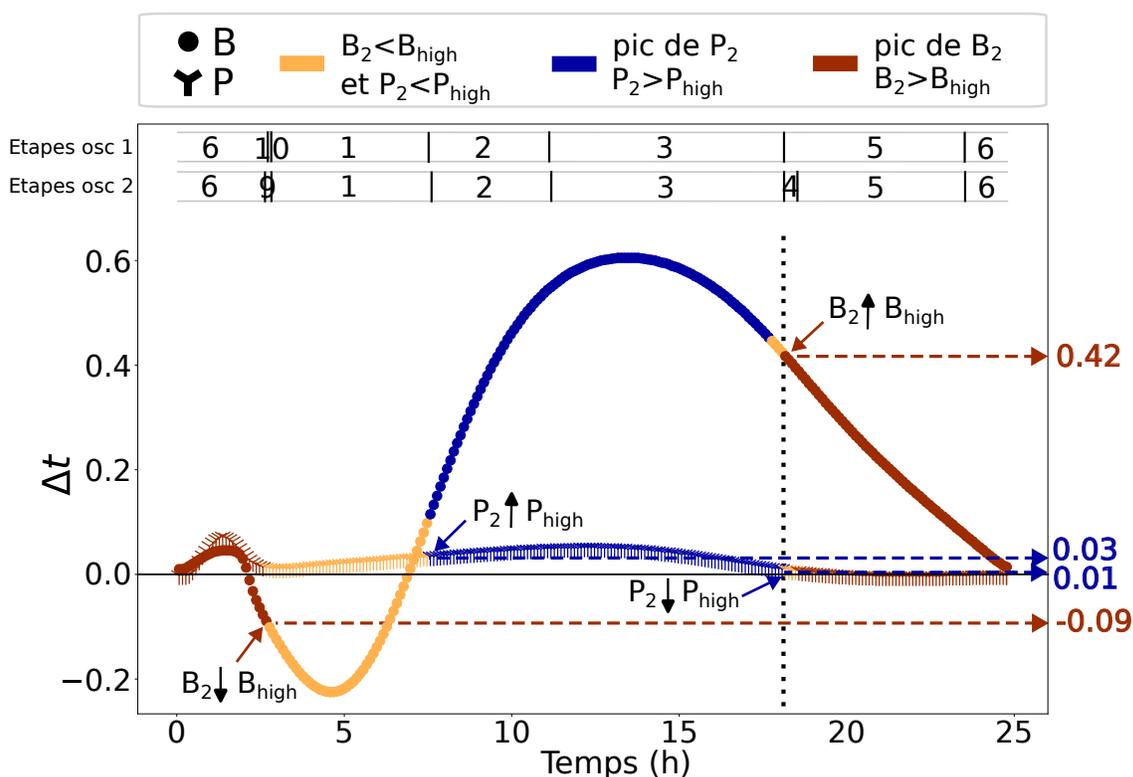


FIGURE 5.6 – Courbes de différences de phase au cours d’un cycle entre les variables B (cercles pleins) et P (marqueurs "Y") de deux oscillateurs couplés avec $k = 1$, et tels que $\varepsilon_1 = 1$ et $\varepsilon_2 = 0.9$. Les couleurs indiquent la position de B_2 et P_2 par rapport à leurs seuils B_{high} et P_{high} au moment où une variable donnée de l’oscillateur 2 atteint le même point d’amplitude que la même variable de l’oscillateur 1. Les étapes exactes par lesquelles passe chaque oscillateur au cours de son cycle sont indiquées en haut de la figure, en noir.

Concentrons nous d’abord sur la courbe de B , tracée avec des cercles pleins, et regardons sa

partie rouge, illustrant le pic de B_2 . Le pic de B_2 commence à l'instant où B_2 croît au-dessus de B_{high} , ce qui est indiqué par la flèche rouge et l'annotation $B_2 \uparrow B_{high}$. A ce moment-là, Δt vaut 0.42h, signifiant que B_2 a un retard de phase de 0.42h par rapport à B_1 . Autrement dit, B_1 avait franchit B_{high} 0.42h plus tôt que B_2 . Puis, le pic de B_2 finit à l'instant où B_2 décroît au-dessous de B_{high} , ce qui est indiqué par la flèche rouge et l'annotation $B_2 \downarrow B_{high}$. A ce moment-là, Δt vaut -0.09h, signifiant que B_2 a une avance de phase de 0.09h par rapport à B_1 . Autrement dit, B_1 va franchir B_{high} 0.09h après B_2 . Ainsi, puisque le pic de B_2 a été commencé avec 0.42h de retard et terminé avec 0.09h d'avance par rapport à B_1 , la différence entre la durée des pics de B_1 et de B_2 est donc de $0.42+0.09=0.51$ h. Cette durée peut se retrouver dans la Figure 5.3(b) : c'est la différence entre les deux courbes rouges épaisses au point d'abscisse $\varepsilon = 0.9$.

Ensuite, regardons la courbe de P , tracée avec des marqueurs en forme de "Y". Sa partie bleue illustre le pic de P_2 . En suivant le même raisonnement que pour B , on obtient que le pic de P_2 a été entamé avec 0.03h de retard par rapport au pic de P_1 , et s'est terminé avec 0.01h de retard. Ainsi, la différence entre la durée des pics de P_1 et de P_2 est de $0.03-0.01=0.02$ h. Ceci explique les durées similaires déjà observées dans la Figure 5.3(b,d).

Maintenant, regardons la ligne en pointillés noirs verticale. Le long de cette ligne, les transitions "d'une couleur à une autre" ne sont pas simultanées entre B et P puisque le début de la partie rouge de la courbe de B correspond au début de la partie jaune de la courbe de P . Ce désalignement à cet instant provient du retard de phase de B_2 par rapport à P_2 par rapport à la phase de B_1 avec P_1 : au moment où P_2 décroît sous P_{high} (transition entre les parties bleues et jaune), B_2 est en retard de phase par rapport à la phase à laquelle se trouvait B_1 lorsque P_1 décroissait sous P_{high} .

Ce retard de phase de B a des implications sur les étapes du cycle circadien (voir [139] et section 4.3.3). Les phases de la nuit étant caractérisées par le pic de P (en bleu, quand $P > P_{high}$) et celles du jour par le pic de B (en rouge, quand $B > B_{high}$), la partie jaune de la courbe suivant celle en bleue correspond à la transition nuit-jour (ou étape 4). Cette étape marque le début du nouveau cycle, et précède le début de l'activité transcriptionnelle de CLOCK:BMAL1 [139] (ou début de l'étape 5). Ainsi, le retard de phase de B_2 par rapport à B_1 met en évidence un retard dans le début de l'activité transcriptionnelle de CLOCK:BMAL1 de l'oscillateur 2 (de l'oscillateur avec la période initiale la plus longue) par rapport à celui de l'oscillateur 1. Ce retard diminue, et devient nul au début de l'étape 6. Durant cette étape, les PCDs de B et de P ont une tendance similaire.

Finalement, ce désalignement entre les phases de B et de P peut induire un ordre des étapes par lesquelles passe chaque oscillateur différent d'un oscillateur à l'autre, ainsi que l'émergence de nouvelles étapes (9 à 12), durant lesquelles B et P sont simultanément au-dessus/en-dessous de leurs seuils hauts.

5.2 Synchronisation de clusters d'oscillateurs

L'étude restreinte à deux oscillateurs a montré une réponse au couplage dissimilaire entre les variables B et P . Nous étendons notre étude sur la synchronisation entre oscillateurs couplés à un réseau d'oscillateurs couplés.

Définissons d'abord les notations et formules que nous allons utiliser. Soit $X \in \{B, R, P\}$:

1. $\bar{T}_{k=0}$: la moyenne des périodes des oscillateurs d'un réseau avant couplage :

$$\bar{T}_{k=0} = \frac{\sum_{i=1}^n T_{i,k=0}}{n}$$

avec n le nombre d'oscillateurs dans le réseau, i le i^{eme} oscillateur, et $T_{i,k=0}$ la période de l'oscillateur i ;

2. $\bar{\tau}_{X,\phi,k=0}$: la moyenne des durées des pics de la variable X de l'ensemble des oscillateurs d'un réseau avant couplage :

$$\bar{\tau}_{X,\phi,k=0} = \frac{\sum_{i=1}^n \tau_{X,\phi,i,k=0}}{n}$$

avec n le nombre d'oscillateurs dans le réseau, i le i^{eme} oscillateur, et $\tau_{X,\phi}$ la durée du pic de la protéine X par rapport à son seuil ϕ ;

3. $\tau_{X,\phi,i,k \neq 0}$: la durée du pic de la variable X d'un oscillateur i , après couplage ;
4. $\tau_{\bar{X},\phi,k \neq 0}$: la durée du pic de \bar{X} , où \bar{X} est la concentration moyenne de la variable X parmi tous les oscillateurs couplés :

$$\bar{X}(t) = \frac{\sum_{i=1}^n X_{i,k \neq 0}(t)}{n}$$

Pour modéliser les interactions entre les horloges au sein d'un réseau, nous reprenons le modèle et les topologies de communication intercellulaire introduits dans le Chapitre 2.

Nous calculons, pour dix réseaux d'horloges différents (les différences proviennent des périodes initiales de chaque oscillateur d'un réseau) et indépendants, les périodes, la durée des étapes et la durée des pics de protéines telles que définies par les points 1 et 2, 3 et 4. Pour $k = 1$, soit pour une forte force de couplage, les résultats obtenus sont similaires entre toutes les topologies. Nous ne présentons alors que les résultats obtenus avec la topologie en étoile.

5.2.1 Durée des périodes au sein d'un cluster d'horloges

Figure 5.7 montre les périodes d'oscillateurs au sein de dix clusters. Les clusters sont indépendants les uns des autres, et sont tous composés de huit horloges. Lorsqu'il y a un terme de

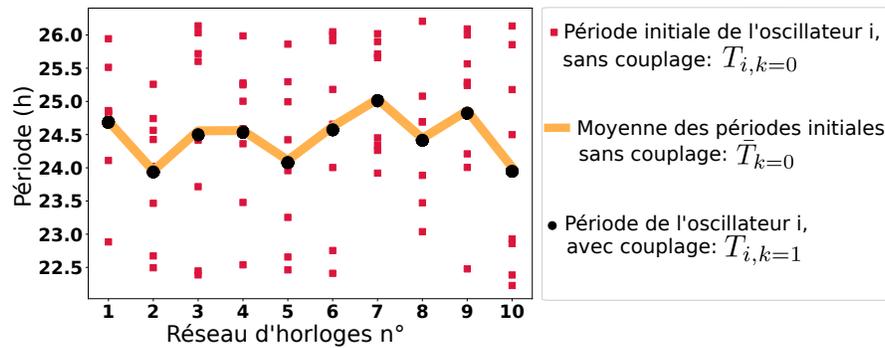


FIGURE 5.7 – Périodes et moyennes des périodes d’oscillateurs pour 10 réseaux d’oscillateurs. Les réseaux sont indépendants les uns des autres. Chaque réseau est composé de 8 horloges qui, lorsqu’elles sont couplées, le sont en étoile avec $k = 1$. La courbe orange reliant les différents réseaux n’est là que pour faciliter la lecture, les réseaux sont bien indépendants.

couplage, les horloges sont couplées en étoile avec $k = 1$. Plus précisément, les carrés rouges représentent les périodes initiales de chaque horloge, avant couplage. La courbe orange représente la moyenne des périodes initiales, avant couplage. Les ronds pleins noirs représentent la valeur de la période de chaque oscillateur après couplage. On observe que, une fois couplés et synchronisés sur une même période, les oscillateurs se synchronisent en fait sur une période égale à la moyenne des périodes avant couplage (comparer les ronds pleins noirs avec la courbe orange). Autrement dit, on a : $T_{i,k=1} \approx \bar{T}_{k=0}$.

5.2.2 Durée des étapes au sein d’un cluster d’horloges

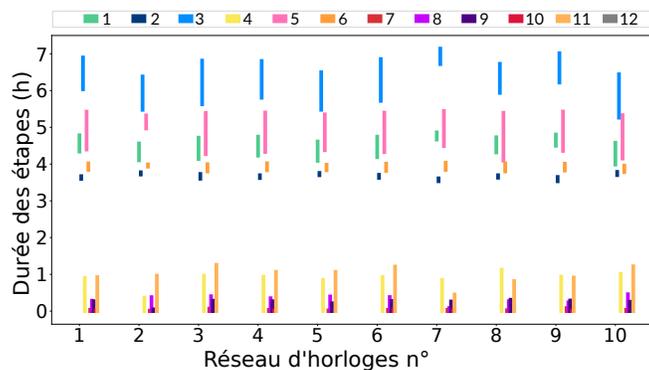


FIGURE 5.8 – Intervalles de durée des étapes pour les oscillateurs de chaque réseau. Chaque bâton correspond à l’intervalle de temps passé dans une étape donnée (définie par la couleur du bâton) par l’ensemble des oscillateurs d’un réseau : de l’oscillateur qui y passe le moins de temps (valeur de la base du bâton), à l’oscillateur qui y passe le plus de temps (valeur du sommet du bâton).

Alors que les oscillateurs de chaque réseau se synchronisent sur une même période, on regarde s'ils passent une durée identique au sein de chaque étape. Comme le montre la Figure 5.8, la durée passée par deux oscillateurs d'un même cluster dans une même étape peut avoir jusqu'à une heure de différence. Par exemple, au sein du premier réseau, la durée de l'étape 3 varie entre 6 et 7h selon les oscillateurs.

5.2.3 Durée des pics de protéines au sein d'un cluster d'horloges

Le nombre d'étapes étant grand, nous regardons désormais la durée des pics de protéines pour voir si certaines données quantitatives ressortent.

Figure 5.9 (a) concerne les durées relatives à P et Figure 5.9 (b) celles de B .

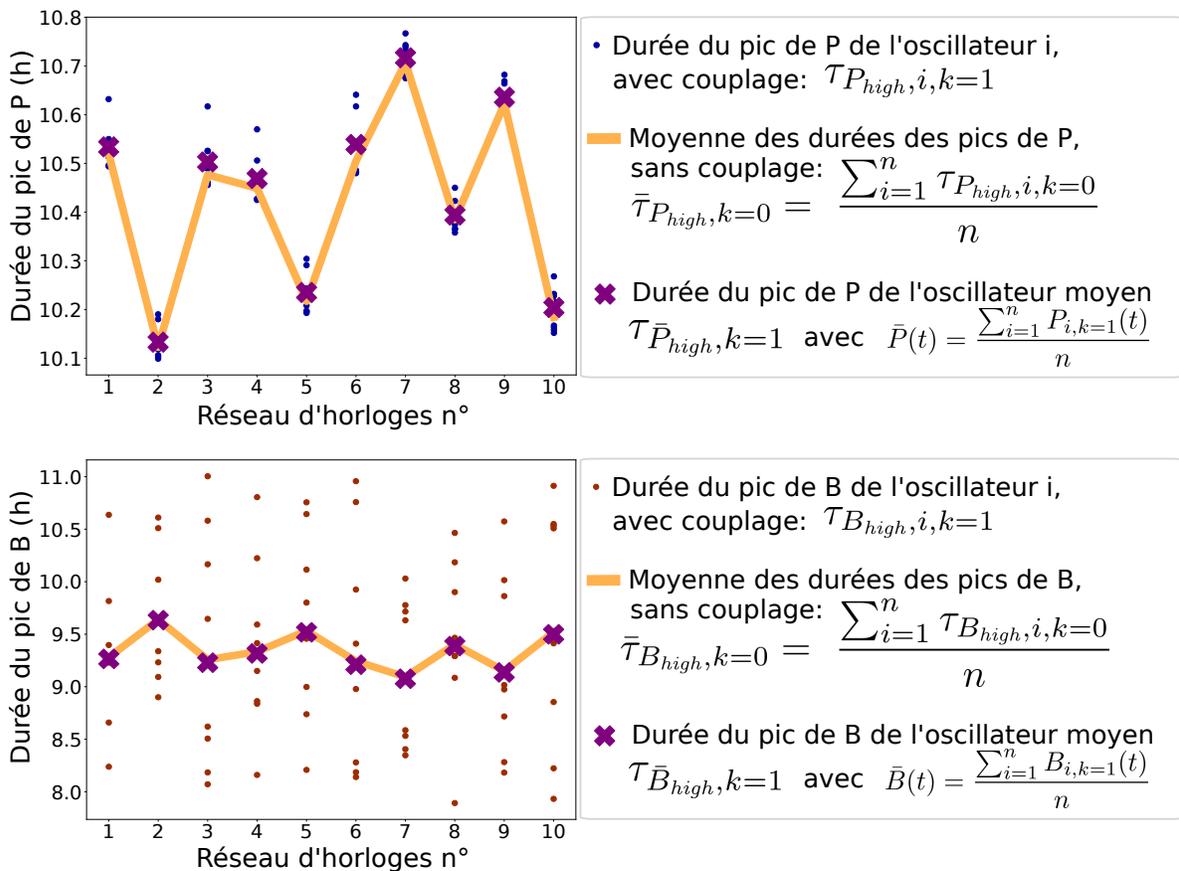


FIGURE 5.9 – Durée relatives à (a) P et (b) B , pour 10 réseaux d'horloges indépendants, constitués chacun de 8 horloges couplées en étoile avec $k = 1$. Plus précisément, la large courbe orange a été calculée selon la définition du point 2, les ronds pleins selon la définition du point 3, et les croix violettes selon la définition du point 4. Bien que la courbe orange lie les différents réseaux entre eux, les réseaux sont indépendants les uns des autres. Cette courbe ne sert qu'à faciliter la lecture de la figure.

Les durées individuelles des pics de P et de B de chaque oscillateur avant couplage ne sont pas représentées, mais leur moyenne (telle que décrite au point 2) est montrée au travers de la courbe orange. Les durées individuelles des pics de P et de B de chaque oscillateur i après couplage (telles que décrites au point 3) sont représentées par les ronds pleins (bleus pour P , rouges pour B). Les durées des pics de \bar{B} et \bar{P} (telles que décrites au point 4) sont représentées par les croix violettes.

Similairement à ce que l'on avait observé entre deux oscillateurs couplés (voir Figure 5.3 (b-d)), on retrouve que la durée des pics de P de chaque oscillateur après couplage tend à être égale à la durée de la moyenne des pics de P de tous les oscillateurs avant couplage (comparer les ronds pleins bleus avec la courbe orange de la Figure 5.9(a)). Cette observation ne se retrouve pas pour la variable B (comparer les ronds pleins rouges avec la courbe orange de la Figure 5.9(b)). Les durées des pics de B sont très différentes d'un oscillateur à l'autre, avec des écarts allant jusqu'à 3h.

Cependant, une observation intéressante ressort lorsque l'on calcule la durée des pics de \bar{B} (définie au point 4). Cette durée est montrée par les grosses croix violettes de la Figure 5.9(b), et est quasiment égale à la durée de la moyenne des pics de B de chaque oscillateur avant couplage. Autrement dit, on a $\bar{\tau}_{B_{high},k=0} \approx \tau_{\bar{B}_{high},k=1}$.

Expérimentalement, l'expression des protéines d'une population de cellules peut être récupérée par bioluminescence [135]. Nos résultats suggèrent que les profils d'expression résultants pourraient avoir certaines propriétés quantitatives dépendantes de la moyenne des propriétés intrinsèques (période, durée du pic de B , durée du pic de P) de chaque horloge, même si les courbes de certaines protéines peuvent avoir une grande variabilité d'une horloge à l'autre.

5.2.4 Progression de chaque oscillateur d'un réseau au cours de son cycle

Finalement, regardons la progression de chacun des oscillateurs d'un réseau d'horloges couplées au cours de son cycle. Figure 5.10 montre les PDCs de sept oscillateurs par rapport à un huitième oscillateur. Ces huit oscillateurs ont tous une période initiale différente et, suite à un couplage en étoile avec $k = 3$, ils se synchronisent en terme de période. Les étapes par lesquelles passe chaque oscillateur au cours de son cycle sont représentées en haut de la figure.

Encore une fois, on observe des PDCs de P et de R proches de 0, synonyme de synchronisation quasiment parfaite entre tous les oscillateurs pour ces 2 variables (à l'exception d'une petite période pour P en fin d'étape 6). Les oscillateurs franchissent leurs seuils P_{high} et R_{int} aux mêmes instants, illustrant les durées des pics similaires précédemment observées.

A l'inverse, les courbes de B sont déphasées tout au long du cycle. En particulier, l'oscillateur 3 croît au-dessus de B_{high} presque 2h avant l'oscillateur 4 (voir lignes verticales en pointillés noirs). Le moment auquel B croît au-dessus B_{high} est à relier à la période initiale de chaque oscillateur : plus la période initiale d'un oscillateur est grande (c'est-à-dire plus ε_i est petit), plus B franchit B_{high} tardivement. Le moment où B franchit B_{high} peut être associé au

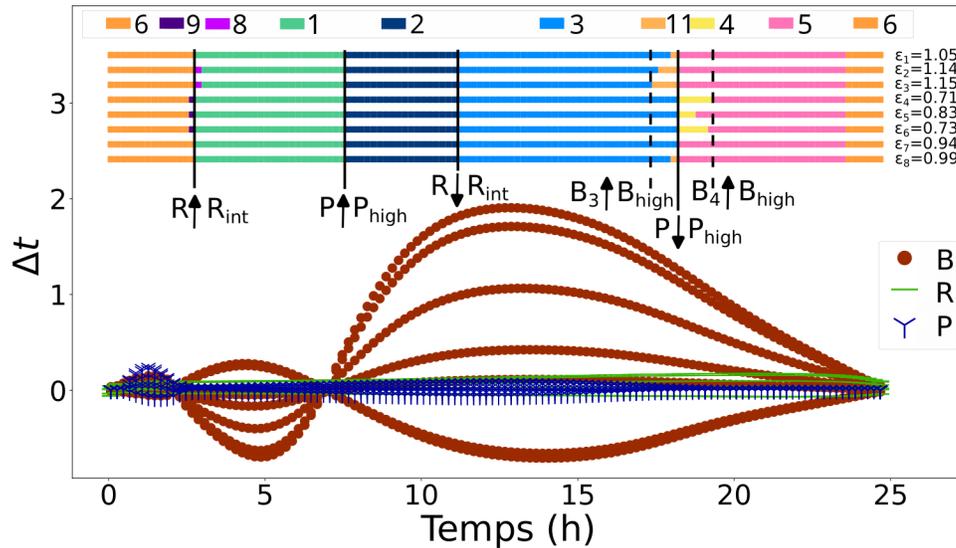


FIGURE 5.10 – PDCs individuelles de huit oscillateurs couplés en étoile avec $k = 3$. Haut de la figure : étapes successives traversées par chacun des huit oscillateurs, dont chacun a une valeur différente de ε .

début de l'activité transcriptionnelle de B . Ainsi, ce moment reste propre à chaque horloge.

Finalement, de manière générale, on observe, pour un oscillateur de grande période initiale, un fort ralentissement de la variable B durant l'étape 2, suivi d'une accélération durant l'étape 3 (relativement aux autres oscillateurs, et à P). Les oscillateurs se resynchronisent tous au début de l'étape 6.

5.3 Conclusion

Certaines relations entre propriétés intrinsèques à chaque horloge et propriétés d'un réseau d'horloges du SCN couplées ont déjà été observées. Par exemple, il a été montré théoriquement [65] et expérimentalement [153] que le décalage de phase d'un oscillateur par rapport aux autres oscillateurs d'un réseau couplé était gouverné par sa période initiale : l'oscillateur de période initiale la plus longue (resp. courte) conserve, après couplage, un retard (resp. avance) de phase par rapport aux autres oscillateurs. Il a aussi été observé que les horloges du SCN se synchronisent sur une période proche de la moyenne de l'ensemble des périodes individuelles [79], [87].

Notre étude a montré que, pour une force de couplage suffisamment grande, les horloges périphériques se synchronisent sur une période proche de la moyenne des périodes individuelles de chaque horloge (voir aussi Chapitre 2). De plus, nous avons mis en évidence que la diffé-

rence de phase entre deux oscillateurs varie au cours du cycle et d'une variable à l'autre. Les différences de phase de R et de P sont dépendantes de la période initiale de l'oscillateur, et tendent à être nulles à mesure que la force de couplage augmente. La variable B d'un oscillateur présente, relativement aux autres variables B du réseau, et relativement à la variable P du même oscillateur, des avances ou des retards de phase au cours d'un même cycle. Cependant, la plus grande différence de phase de B (c'est-à-dire si le plus grand décalage de phase de B équivaut à une avance ou à un retard de phase) reste dépendante de la période initiale de l'oscillateur, et influence le moment du début du pic de B . Les fortes différences de phase de B d'un oscillateur à l'autre induisent des durées du pic de B très différentes d'un oscillateur à l'autre. Néanmoins, la durée du pic de B de l'oscillateur résultant de la moyenne des concentrations de tous les B après couplage est la même que la moyenne des pics de B de tous les oscillateurs avant couplage, mettant en évidence un nouveau lien entre propriétés intrinsèques aux oscillateurs et propriété du réseau d'horloges couplées.

Chapitre 6

Conclusion générale et Perspectives

Dans ce Chapitre de conclusion, nous revenons sur le cheminement de ce manuscrit, les différents points abordés, les contributions apportées ainsi que sur les futures directions à prendre.

6.1 Conclusion générale

L'engouement de ces dernières décennies pour les horloges circadiennes a permis de nombreuses découvertes les concernant, aussi bien au niveau de leurs mécanismes moléculaires, que de leurs fonctions au sein des organismes. La recherche sur les horloges circadiennes a notamment ouvert des portes dans le domaine de la médecine, puisque l'intégration des rythmes circadiens lors du développement de protocoles de soin semble être une piste prometteuse pour optimiser l'efficacité de traitements médicamenteux, ou encore qu'une bonne connaissance de nos rythmes biologiques, et leur prise en compte dans nos modes de vie quotidiens, pourraient prévenir de nombreuses maladies et aider à une meilleure santé globale. Cette thèse a été motivée dans ce contexte, où les résultats des recherches sur les horloges circadiennes sont encourageants, mais où de nombreuses pistes sont encore à explorer.

En particulier, le point de départ de cette thèse s'appuie sur le manque de connaissances sur les mécanismes de synchronisation des horloges circadiennes périphériques. Comme expliqué dans le **Chapitre 1**, de récentes expériences [135] réalisées *in vivo* sur des souris ont mis en évidence que les horloges du foie étaient capables de garder une certaine synchronicité en l'absence de synchroniseur extérieur venant du SCN, du régime alimentaire ou de d'autres horloges d'organes périphériques. Suivant les résultats de d'autres expériences [52], [74] suggérant la présence de mécanismes de couplage entre les horloges, probablement paracrines, qui favoriseraient leur synchronisation, nous avons exploré cette hypothèse au travers d'une étude numérique présentée dans le **Chapitre 2**.

Notre première contribution est donc l'introduction d'un nouveau modèle pour représenter,

de manière simplifiée, les interactions entre horloges circadiennes. Ce modèle présente l'avantage de pouvoir ajuster la période de chaque oscillateur en réglant un unique paramètre, de pouvoir modéliser le couplage entre différentes horloges, et de pouvoir représenter différents schémas de communication intercellulaire. De plus, il nous a permis de tester notre hypothèse de couplage à travers la reproduction numérique de résultats expérimentaux sur la synchronisation des horloges périphériques en réponse à différents types de régimes alimentaires [135].

De manière générale, nous avons identifié différents facteurs influençant la synchronisation sur une même période d'un ensemble d'horloges couplées, à savoir la différence de périodes initiale entre les horloges, la force de couplage, le régime alimentaire ou la topologie de communication utilisée. En particulier, la comparaison entre résultats numériques et données expérimentales indique que la présence de termes de couplage favorise la synchronisation d'horloges au sein d'un même cluster sur une même période, mais que la force de couplage nécessaire dépend de la présence de signaux extérieurs (comme provenant du régime alimentaire) ou bien du schéma de communication. Un faible couplage permet par exemple de synchroniser un cluster d'horloges en condition de régime restreint.

Dans le **Chapitre 3**, nous nous sommes concentrées sur la caractérisation théorique de la dynamique du cycle circadien d'une unique horloge et avons développé un modèle de l'horloge circadienne affine par morceaux dont les solutions approximent un modèle continu construit avec des termes d'action de masse et reproduisent certaines observations biologiques du cycle circadien, comme l'ordre des pics de protéine, l'opposition de phase entre CLOCK:BMAL1 et PER:CRY ou encore une trajectoire périodique. Pour cela, nous avons contraint les solutions de notre modèle à suivre une séquence de transitions périodique entre les régions de l'espace de phases discrétisé du modèle continu en établissant un ensemble de contraintes sur les valeurs des seuils et sur la durée passée par l'oscillateur dans certains régions. Finalement, nous avons implémenté un Algorithme satisfaisant toutes ces contraintes et dont les valeurs de seuils générées conduisent à des oscillateurs présentant la même dynamique, et avec une période autour de 24h. De plus, nous avons pu prouver théoriquement l'existence d'un cycle périodique dans l'espace de phases.

Le développement de notre méthode de caractérisation du cycle circadien basée sur l'approximation par morceaux d'un modèle continu construit avec des termes polynomiaux a été facilité par la connaissance de la dynamique du modèle continu et par sa faible dimension (4 variables). L'extension de cette technique à d'autres modèles plus complexes, construits avec plus de termes polynomiaux ou de plus grande dimension, peut rapidement devenir long et coûteux. Pour étudier la dynamique de n'importe quel cycle circadien, nous avons proposé une méthode algorithmique présentée dans le **Chapitre 4** et basée sur l'idée de segmentation du cycle circadien. Plus précisément, cette méthode reprend la définition des régions à la base de la construction du modèle affine par morceaux du Chapitre 3 et utilise un algorithme recher-

chant des valeurs réelles de seuils pour vérifier que le cycle limite d'un modèle de l'horloge circadienne donné puisse passer par chacune des régions dans un ordre bien défini. Nous avons illustré notre méthode en l'appliquant à des données expérimentales, ainsi qu'à cinq modèles d'horloges circadiennes de mammifères. La décomposition en étapes de chaque cycle a permis de les comparer quantitativement et d'identifier des propriétés partagées par tous les cycles (telle que la robustesse des phases de CLOCK:BMAL1 et PER:CRY) ou bien des incohérences (comme le retard d'un pic de PER:CRY par rapport aux autres protéines). Finalement, nous avons aussi montré comment notre méthode peut être utilisée pour étudier l'effet d'une perturbation sur un oscillateur, telle que la désactivation d'un gène de l'horloge.

Dans le **Chapitre 5**, nous avons utilisé les méthodes développées dans les chapitres précédents pour apporter des informations sur les changements de dynamique qu'entraîne le couplage entre deux, ou plus, oscillateurs couplés. Notamment, nous avons montré une réponse au couplage différente entre B et P , qui entraîne un déphasage entre ces deux variables. De plus, nous avons mis en avant des liens entre propriétés quantitatives intrinsèques à chaque horloge et propriétés du réseau d'horloges couplées.

Les outils numériques développés et présentés dans ce manuscrit sont disponibles dans Gitlab, aux liens suivants : [codes Chapitre 3](#), [codes Chapitre 4](#).

6.2 Perspectives

Différentes directions, à la fois théoriques, numériques et expérimentales, sont à considérer pour approfondir le travail présenté dans cette thèse.

6.2.1 Par rapport aux mécanismes de synchronisation des horloges périphériques

Les recherches sur les mécanismes favorisant la synchronisation des horloges périphériques nécessitent d'être poursuivies à la fois du côté de la modélisation, du côté théorique que du côté expérimental. Elles pourraient entre autre permettre le développement de stratégies préventives ou thérapeutiques pour renforcer les rythmes circadiens à l'échelle de l'organisme.

D'un point de vue de la modélisation, l'hypothèse selon laquelle les horloges périphériques sont couplées devrait être intégrée, développée et étudiée dans de futurs modèles.

Il serait d'abord intéressant d'explorer différentes manières de modéliser le couplage. Dans cette thèse, pour simplifier, nous avons choisi de représenter le couplage de manière diffusive, directement entre 2 variables, sans ajout de nouvelle variable. Si, comme supposé dans [52], la

communication intercellulaire se fait par l'échange de signaux paracrine, une idée serait d'inclure dans le modèle une nouvelle variable modélisant la molécule échangée, comme ce qui a pu être fait dans [65], [87] pour modéliser le couplage par le neuropeptide VIP dans le SCN.

Ensuite, une limite à notre approche de modélisation du couplage est qu'elle n'est pas à l'échelle de l'organe, mais est restreinte à l'étude d'un cluster de 8 cellules à la fois. Sa mise à l'échelle de l'organe soulève de nouvelles questions et implique la formulation de nouvelles hypothèses. Une direction future serait donc de proposer un modèle qui permettrait d'étudier les possibles interactions entre de nombreux réseaux d'horloges. Si l'on garde la construction de notre modèle actuel, des hypothèses sur la topologie de communication entre les différents clusters, sur la force de couplage à appliquer ou bien sur l'homogénéité de la force de couplage (est-ce qu'elle est plus ou moins forte en fonction d'un couplage inter-cluster par rapport à un couplage intra-cluster ?) seront à étudier. De plus, cette mise à l'échelle pourrait aussi permettre d'inclure la spatialité dans le modèle, pour tenir compte de l'organisation 3D des cellules dans l'organe.

De manière plus générale, d'autres hypothèses pouvant expliquer la synchronisation des cellules périphériques ont été proposées et sont à explorer. Par exemple, dans [77], les auteurs observent que la moyenne d'une population d'oscillateurs non couplés peut être entraînée par un faible signal d'entrée périodique grâce aux interactions entre le bruit intrinsèque à chaque oscillateur avec la dynamique non linéaire du système, et ce bien qu'à l'échelle individuelle ces oscillateurs ne soient pas entraînés. Ils qualifient ce phénomène d'"entraînement stochastique de la population". Une autre piste en cours d'exploration par des membres du projet InSync est celle du développement d'un modèle de phase. Ce modèle permettrait d'étudier les capacités des oscillateurs à ajuster leur phase suivant différentes hypothèses. L'une d'entre elles serait de prendre en compte les signaux que chaque organe envoie et qui pourraient, indirectement, entraîner la synchronisation des horloges en influençant sur le comportement de la souris (moment de la prise de nourriture par exemple) même en l'absence de SCN fonctionnel.

Ainsi, diverses pistes de modélisation peuvent être empruntées pour approfondir l'étude des facteurs jouant sur la synchronisation des horloges périphériques.

D'un point de vue théorique, notre approche s'est portée sur le développement d'une méthode de caractérisation d'un unique cycle circadien, basée sur la construction d'un modèle affine par morceaux approximant un modèle continu. Néanmoins, notre méthode ne permet pas d'obtenir directement des résultats sur les mécanismes de couplage, et nécessiterait d'être approfondie dans cette direction.

Les résultats théoriques et numériques apportent de précieuses informations mais doivent être confirmés par des expériences. Des expériences pour confirmer la présence de mécanismes de couplage sont actuellement en cours chez un autre membre du projet InSync. Les premiers résultats étant encourageants, une future étape serait d'identifier la nature de ces mécanismes et

les molécules qui pourraient être impliquées.

De plus, nos simulations ont montré, en supposant la présence de couplage, une réponse au couplage différente entre B et P . Notamment, nous avons observé une désynchronisation de l'instant où B croît au-dessus de B_{high} , dépendante de la période intrinsèque de chaque oscillateur. Cet instant pourrait correspondre, d'un point de vue biologique, au début de l'activité transcriptionnelle de CLOCK:BMAL1. Ces prédictions sont encore à être vérifiées expérimentalement.

6.2.2 Par rapport aux systèmes affines par morceaux linéarisant des termes polynomiaux

Lorsque nous avons construit le modèle affine par morceaux présenté dans cette thèse, notre but initial était de pouvoir caractériser théoriquement la dynamique d'un cycle circadien. Pour cela, nous avons proposé de discrétiser l'espace de phases d'un modèle d'ODE réduit de l'horloge circadienne, et d'approximer par des fonctions affines la dynamique de chaque variable au sein de chaque région. Les non-linéarités du modèle ODE étaient de deux types : fonctions sigmoïdes et termes polynomiaux. Alors que les fonctions sigmoïdes peuvent être approchées (et linéarisées) par des fonctions *step*, aucune méthode de linéarisation par morceaux des termes polynomiaux n'existe. Une de nos premières idées était de laisser le terme d'action de masse proportionnel à une des deux variables et de laisser l'autre variable à une valeur constante définie en fonction du domaine dans lequel la variable se trouve. Cette approche n'était cependant pas applicable dans notre cas car le terme polynomial proportionnel à P ne permet pas d'avoir des solutions analytiques (qui sont essentielles à notre méthode). Dans notre exemple, la connaissance de la dynamique du modèle ODE nous a permis de proposer une linéarisation du terme d'action de masse de sorte à ce que notre modèle PWA reproduise la dynamique qualitative du modèle ODE, conduisant souvent à une approximation du terme d'action de masse par une constante. Cependant, cette méthode reste spécifique à notre exemple. Une perspective future serait donc de développer une méthodologie permettant de généraliser à n'importe quel système la linéarisation de termes polynomiaux ou du moins de termes dérivant de la loi d'action de masse.

6.2.3 Par rapport aux futures applications qui pourraient dériver de notre méthode de caractérisation basée sur la segmentation du cycle en étapes

D'abord, d'un point de vue algorithmique, l'Algorithme 2, qui vérifie qu'un cycle donné passe par un certain nombre d'étapes dans un ordre précis en cherchant des valeurs de seuils adaptées, pourrait être amélioré. En effet, nous n'avons pas démontré que si l'Algorithme

n'identifie aucun jeu de seuils, alors il n'y a effectivement pas de solution (nous avons néanmoins observé que la présence d'étapes avec une durée proche de 0 indique que l'Algorithme est capable de trouver des valeurs de seuils précisément). De plus, l'Algorithme s'arrête au premier jeu de seuils satisfaisant l'ordre des étapes attendu mais nous n'avons pas cherché l'ensemble des solutions existantes, ni cherché à avoir les solutions optimales. Les solutions optimales pourraient être définies comme les solutions conduisant à des durées de pics le plus proche possible de celles données en entrée.

Ensuite, bien que conçue pour l'horloge circadienne des souris, notre méthode de caractérisation pourrait être adaptée pour l'étude de d'autres horloges circadiennes (chez *Neurospora* [99] ou *Drosophila* [56] par exemple), ou même de d'autres systèmes biologiques cycliques, comme le cycle cellulaire. En effet, pour appliquer notre méthode, il suffit de pouvoir identifier les molécules principales d'un système, de discrétiser l'espace de phases du système via l'attribution de seuils sur les variables principales, et finalement de définir un ordre de transitions attendu entre les différentes régions. Ainsi, pourvu que la dynamique du cycle étudié soit suffisamment connue, notre méthode de segmentation peut être étendue à de nombreux cycles. L'algorithme de notre méthode permet ensuite de vérifier si le cycle donné suit l'ordre de transitions attendu en trouvant, si possible, des valeurs de seuils adaptées. L'application de notre méthode à des cycles de diverses horloges produirait un nouveau moyen de caractériser et de comparer quantitativement la dynamique de ces cycles, et de rechercher si et comment des caractéristiques temporelles quantitatives sont partagées par différents organismes.

Annexe A

Informations supplémentaires du Chapitre 2

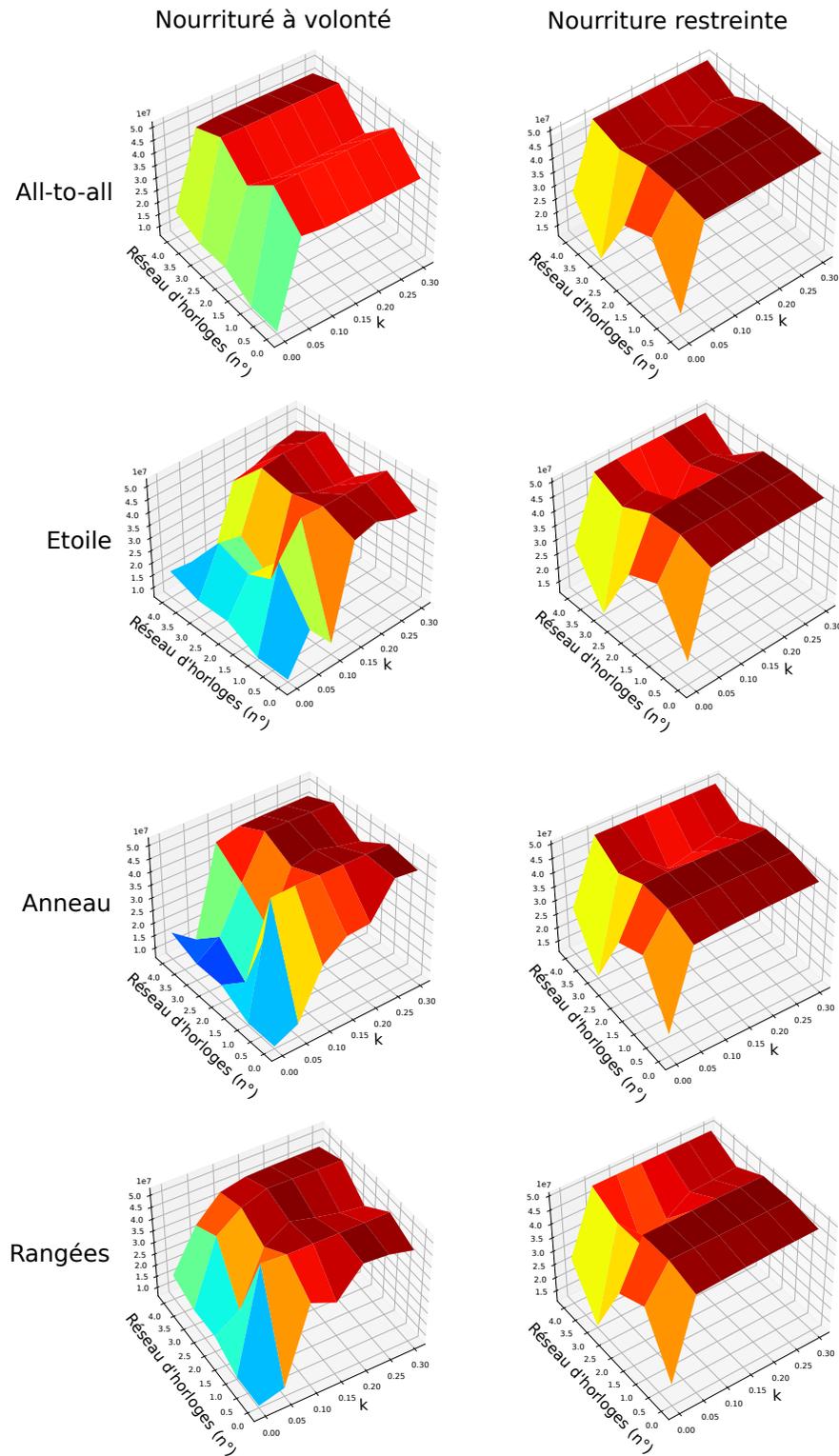


FIGURE A.1 – Amplitude du pic principal des FFT de séries temporelles de réseaux de 8 horloges selon différents ensembles de périodes initiales (numérotés de 0 à 5), différentes topologies, forces de couplage et régimes alimentaires.

Annexe B

Supplementary Information of Chapter 3

B.1 Analytical solutions of the piecewise affine model

B.1.1 Stages 1 and 2

$$\begin{aligned}
 B(t) &= B(t_0) \\
 D(t) &= e^{-\gamma_D(t-t_0)} \left(D(t_0) - \frac{V_B B(t_0)}{\gamma_D} \right) + \frac{V_B B(t_0)}{\gamma_D} \\
 R(t) &= e^{-\gamma_R(t-t_0)} \left(R(t_0) - \frac{V_D(D(t_0) - \frac{V_B B(t_0)}{\gamma_D})}{\gamma_R - \gamma_D} - \frac{V_D V_B B(t_0)}{\gamma_R \gamma_D} \right) + \frac{V_D(D(t_0) - \frac{V_B B(t_0)}{\gamma_D})}{\gamma_R - \gamma_D} e^{-\gamma_D(t-t_0)} + \frac{V_D V_B B(t_0)}{\gamma_R \gamma_D} \\
 P(t) &= P(t_0) - \frac{V_D}{\gamma_D} e^{-\gamma_D(t-t_0)} \left(D(t_0) - \frac{V_B B(t_0)}{\gamma_D} \right) + \frac{V_D V_B B(t_0)}{\gamma_D} (t - t_0) + \frac{V_D}{\gamma_D} \left(D(t_0) - \frac{V_B B(t_0)}{\gamma_D} \right)
 \end{aligned}$$

B.1.2 Stage 3

$$\begin{aligned}
 B(t) &= B(t_0) \\
 D(t) &= e^{-\gamma_D(t-t_0)} \left(D(t_0) - \frac{V_B B(t_0)}{\gamma_D} \right) + \frac{V_B B(t_0)}{\gamma_D} \\
 R(t) &= e^{-\gamma_R(t-t_0)} \left(R(t_0) - \frac{V_D(D(t_0) - \frac{V_B B(t_0)}{\gamma_D})}{\gamma_R - \gamma_D} - \frac{V_D V_B B(t_0)}{\gamma_R \gamma_D} \right) + \frac{V_D(D(t_0) - \frac{V_B B(t_0)}{\gamma_D})}{\gamma_R - \gamma_D} e^{-\gamma_D(t-t_0)} + \frac{V_D V_B B(t_0)}{\gamma_R \gamma_D} \\
 P(t) &= P(t_0) - \frac{V_D}{\gamma_D} e^{-\gamma_D(t-t_0)} \left(D(t_0) - \frac{V_B B(t_0)}{\gamma_D} \right) + \frac{V_D V_B B(t_0)}{\gamma_D} (t - t_0) + \frac{V_D}{\gamma_D} \left(D(t_0) - \frac{V_B B(t_0)}{\gamma_D} \right) - V_R(t - t_0)
 \end{aligned}$$

B.1.3 Stages 4 and 5

$$\begin{aligned}
 B(t) &= e^{-\gamma_B P_{low}(t-t_0)} \left(B(t_0) - \frac{V_R}{\gamma_B P_{low}} \right) + \frac{V_R}{\gamma_B P_{low}} \\
 D(t) &= e^{-\gamma_D(t-t_0)} \left(D(t_0) - \frac{V_B(B(t_0) - \frac{V_R}{\gamma_B P_{low}})}{\gamma_D - \gamma_B P_{low}} - \frac{V_B V_R}{\gamma_D \gamma_B P_{low}} \right) + \frac{V_B(B(t_0) - \frac{V_R}{\gamma_B P_{low}})}{\gamma_D - \gamma_B P_{low}} e^{-\gamma_B P_{low}(t-t_0)} + \frac{V_B V_R}{\gamma_D \gamma_B P_{low}}
 \end{aligned}$$

Let :

$$M = \frac{V_B(B(t_0) - \frac{V_R}{\gamma_B P_{low}})}{\gamma_D - \gamma_B P_{low}}$$

$$N = \frac{V_D}{\gamma_R - \gamma_D} (D(t_0) - M - \frac{V_B V_R}{\gamma_B \gamma_D P_{low}})$$

$$R(t) = e^{-\gamma_R(t-t_0)} (R(t_0) - N - \frac{M V_D}{\gamma_R - \gamma_B P_{low}} - \frac{V_D V_B V_R}{\gamma_B \gamma_D \gamma_R P_{low}}) + N e^{-\gamma_D(t-t_0)} + \frac{M V_D}{\gamma_R - \gamma_B P_{low}} e^{-\gamma_B P_{low}(t-t_0)} + \frac{V_D V_B V_R}{\gamma_B \gamma_D \gamma_R P_{low}}$$

Let :

$$N_1 = -\frac{V_D}{\gamma_D} (D(t_0) - M - \frac{V_B V_R}{\gamma_B \gamma_D P_{low}})$$

$$P(t) = P(t_0) + N_1 e^{-\gamma_D(t-t_0)} + e^{-\gamma_B P_{low}(t-t_0)} (\frac{M V_D}{-\gamma_B P_{low}} + B(t_0) - \frac{V_R}{\gamma_B P_{low}}) + (\frac{V_D V_B V_R}{\gamma_B \gamma_D P_{low}} - V_R)(t - t_0) - N_1 + \frac{M V_D}{\gamma_B P_{low}} - B(t_0) + \frac{V_R}{\gamma_B P_{low}}$$

B.1.4 Stage 6

$$B(t) = B(t_0) + (V_R - \delta \gamma_B)(t - t_0)$$

$$D(t) = e^{-\gamma_D(t-t_0)} (D(t_0) - \frac{V_B B(t_0)}{\gamma_D} + \frac{V_B (V_R - \delta \gamma_B)}{\gamma_D^2}) + \frac{V_B (V_R - \delta \gamma_B)}{\gamma_D} (t - t_0) + \frac{V_B B(t_0)}{\gamma_D} - \frac{V_B (V_R - \delta \gamma_B)}{\gamma_D^2}$$

Let :

$$A = D(t_0) - \frac{V_B B(t_0)}{\gamma_D} + \frac{V_B (V_R - \delta \gamma_B)}{\gamma_D^2}$$

$$C = \frac{V_B B(t_0)}{\gamma_D} - \frac{V_B (V_R - \delta \gamma_B)}{\gamma_D^2}$$

$$R(t) = e^{-\gamma_R(t-t_0)} (R(t_0) - \frac{V_D A}{\gamma_R - \gamma_D} - \frac{V_D C}{\gamma_R} + \frac{V_D V_B (V_R - \delta \gamma_B)}{\gamma_D \gamma_R^2}) + \frac{V_D A}{\gamma_R - \gamma_D} e^{-\gamma_D(t-t_0)} + \frac{V_D V_B (V_R - \delta \gamma_B)}{\gamma_R \gamma_D} (t - t_0) + \frac{V_D C}{\gamma_R} - \frac{V_D V_B (V_R - \delta \gamma_B)}{\gamma_D \gamma_R^2}$$

$$P(t) = P(t_0) - \frac{V_D A}{\gamma_D} e^{-\gamma_D(t-t_0)} + \frac{V_D V_B (V_R - \delta \gamma_B)}{2 \gamma_D} (t^2 - t_0^2) + (V_D (\frac{-V_B (V_R - \delta \gamma_B) t_0}{\gamma_D} + C) - \delta \gamma_B)(t - t_0) + \frac{V_D A}{\gamma_D}$$

B.1.5 Stages 7 and 8

$$B(t) = B(t_0) - V_R(t - t_0)$$

$$D(t) = e^{-\gamma_D(t-t_0)} (D(t_0) - \frac{V_B B(t_0)}{\gamma_D} - \frac{V_B V_R}{\gamma_D^2}) - \frac{V_B V_R}{\gamma_D} (t - t_0) + \frac{V_B B(t_0)}{\gamma_D} + \frac{V_B V_R}{\gamma_D^2}$$

Let :

$$A_1 = D(t_0) - \frac{V_B B(t_0)}{\gamma_D} - \frac{V_B V_R}{\gamma_D^2}$$

$$C_1 = \frac{V_B B(t_0)}{\gamma_D} + \frac{V_B V_R}{\gamma_D^2}$$

$$R(t) = e^{-\gamma_R(t-t_0)} (R(t_0) - \frac{V_D A_1}{\gamma_R - \gamma_D} - \frac{V_D C_1}{\gamma_R} - \frac{V_D V_B V_R}{\gamma_D \gamma_R^2}) + \frac{V_D A_1}{\gamma_R - \gamma_D} e^{-\gamma_D(t-t_0)} - \frac{V_D V_B V_R}{\gamma_R \gamma_D} (t - t_0) + \frac{V_D C_1}{\gamma_R} + \frac{V_D V_B V_R}{\gamma_D \gamma_R^2}$$

$$P(t) = P(t_0) - \frac{V_D A_1}{\gamma_D} e^{-\gamma_D(t-t_0)} - \frac{V_D V_B V_R}{2 \gamma_D} (t^2 - t_0^2) + (V_D (\frac{V_B V_R t_0}{\gamma_D} + C_1) - V_R)(t - t_0) + \frac{V_D A_1}{\gamma_D}$$

B.2 Illustration of Assumptions A.6-A.8

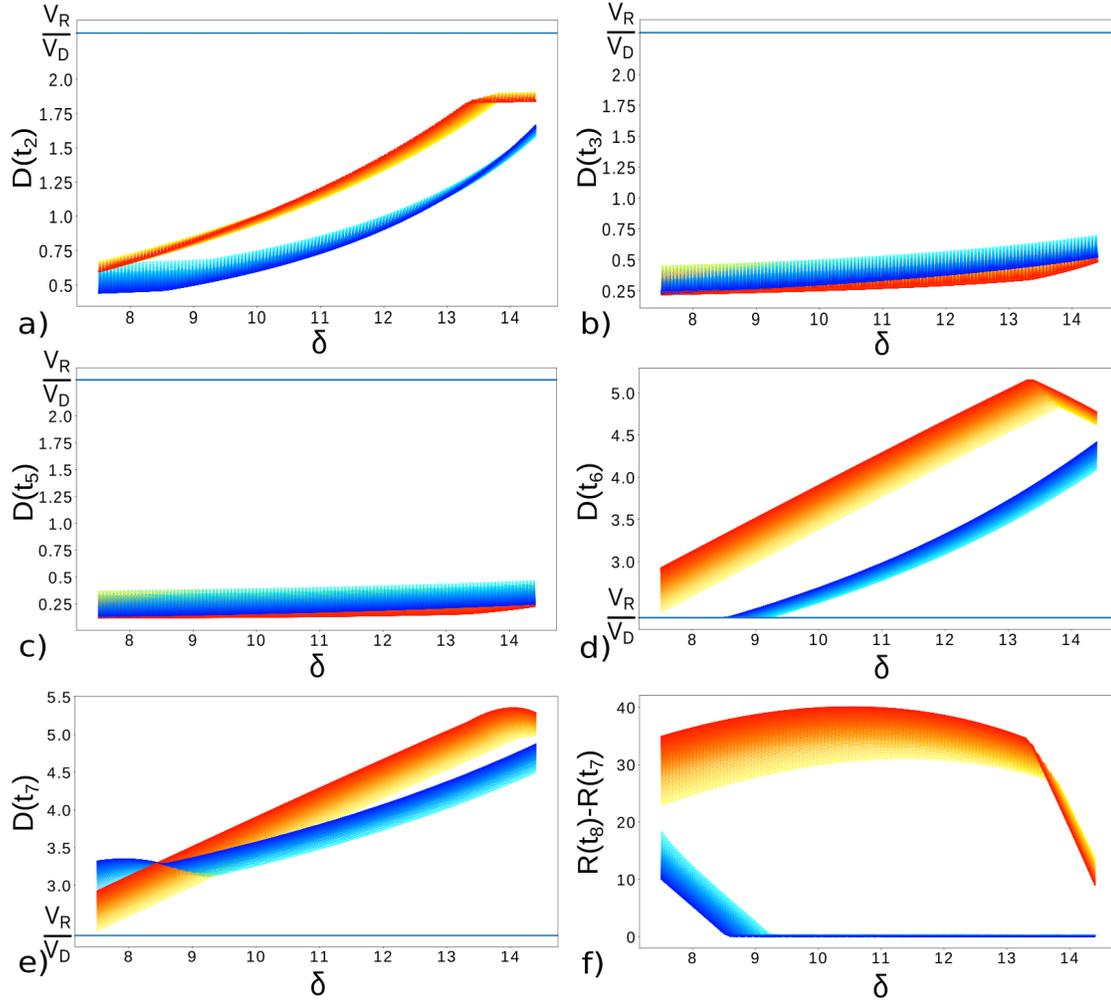


FIGURE B.1 – Numerical simulations justifying Assumptions A.6-A.8 (see Section 3.3.2). (a-e) Values of $D(t_i)$, $i \in \{2, 3, 5, 6, 7\}$ to compare with $\frac{V_R}{V_D}$: illustration of Assumptions A.6 and A.7. (f) $R(t_8) - R(t_7)$ to compare with 0 : illustration of Assumption A.8. Each ending stage value depends on δ , P_{low} (a darker line corresponds to a bigger P_{low}), the duration of stage 6 (lines in blue tones for $d_{6_{min}}$ and in orange tones for $d_{6_{max}}$) and the duration of stage 8 (dashed lines for $d_{8_{min}}$ and solid lines for $d_{8_{max}}$). See caption of Figure 3.9 for more details.

B.3 Proofs of Propositions 1 to 4

B.3.1 Proof of Proposition 1

Proof. Consider the system during stage 6, that is to say for $t_5 < t < t_6$. Since $\dot{B} = V_R - \gamma_B \delta$, Assumption A.1 implies that $B(t)$ strictly increases, so $B(t)$ remains higher than B_{high} .

Then, we can show that in $[t_5, t_6]$, $D(t)$ increases. Indeed, $\dot{D}(t) = V_B B(t) - \gamma_D D(t)$. Replacing $B(t)$ and $D(t)$ by their analytical solutions during stage 6, with initial conditions $B_{high} < B_0 \leq B_{eq}$ and $D_0 = \frac{V_B B_0}{\gamma_D}$,

$$\dot{D}(t) = \frac{V_B(V_R - \delta\gamma_B)}{\gamma_D} (1 - e^{-\gamma_D(t-t_5)}).$$

Assumption A.1 gives $\frac{V_B(V_R - \delta\gamma_B)}{\gamma_D} > 0$. Since $t - t_5 > 0$, $\dot{D}(t) > 0$ and $D(t)$ increases.

Conditions A.1 and A.3 imply a decrease of $P(t)$ at the beginning of stage 6 :

$$\dot{P}(t_5) = V_D D(t_5) - \delta\gamma_B \leq \frac{V_D V_B V_R}{\gamma_D \gamma_B P_{low}} - \delta\gamma_B < 0.$$

Next, set $\sigma = \frac{V_D V_B (V_R - \gamma_B \delta)}{\gamma_D}$ and notice that,

$$\dot{R}(t) = V_D D(t) - \gamma_R R(t) = \frac{\sigma}{\gamma_D - \gamma_R} (e^{-\gamma_D(t-t_5)} - e^{-\gamma_R(t-t_5)}) + \frac{\sigma}{\gamma_R} (1 - e^{-\gamma_R(t-t_5)})$$

which satisfies $\dot{R}(t_5) > 0$, so $\dot{R}(t) > 0$ for some time interval after entering stage 6. To guarantee that the system evolves to stage 7, it is necessary that $P(t)$ increases at the end of stage 6 and that $R(t)$ reaches R_{int} before $P(t)$ reaches P_{low} . This is assured by conditions 1(i) and 1(ii), which provide appropriate conditions on the duration $d_6 = t_6 - t_5$. The system enters stage 7.

Consider the system during stage 7, that is $t_6 < t < t_7$. Since $\dot{B}(t) = -V_R$ in this interval, $B(t)$ decreases according to the expression $B(t) = B(t_6) - V_R(t - t_6)$. By Assumption A.7, $D(t_6) > \frac{V_R}{V_D}$. At the beginning of stage 7 we have $R(t_6) = R_{int} < \frac{V_R}{\gamma_R}$ (by Assumption A.4). Then, for an interval $t \in (t_6, t_6 + o_7)$, with $o_7 > 0$ both $R(t)$ and $P(t)$ increase :

$$\begin{aligned} \dot{R}(t) &= V_D D(t) - \gamma_R R(t) > V_D \frac{V_R}{V_D} - \gamma_R R_{int} > 0 \\ \dot{P}(t) &= V_D D(t) - V_R \approx V_D D(t_6) - V_R > 0. \end{aligned}$$

Now, we want to find a duration d_7 such that $P(t)$ crosses its threshold P_{low} before $B(t)$ decreases to B_{high} . To achieve this, set $P(t_6 + d_7) = P_{low}$ and $B(t_6 + d_7) = B(t_6) - V_R d_7 > B_{high}$. Substituting for $B(t_6)$ obtains :

$$B(t_5) + (V_R - \gamma_B \delta) d_6 - V_R d_7 > B_{high} \Leftrightarrow V_R d_7 < B(t_5) - B_{high} + (V_R - \gamma_B \delta) d_6$$

This last inequality holds by condition 1(i) and since $B(t_5) = B_0 > B_{high}$, ensuring that the system enters stage 8. \square

B.3.2 Proof of Proposition 2

Proof. Consider the system during stage 8, that is $t_7 < t < t_8$. Since $\dot{B}(t) = -V_R$ in this interval, $B(t)$ decreases according to the expression $B(t) = B(t_7) - V_R(t - t_7)$. By Assumption A.8, $R(t_8) > R_{int}$. By Assumption A.7, $D(t_7) > \frac{V_R}{V_D}$, which implies $\dot{P}(t_7) = V_D D(t_7) - V_R > 0$ and $P(t)$ increases in an interval $[t_7, t_7 + o_8)$, with $o_7 > 0$.

By condition 2(ii), $P(t_7 + d_{8max}) < P_{high}$. To check that B is the first variable to cross its threshold, compute the values of $B(t)$ at the instants $t_7 + d_{8min}$ and $t_7 + d_{8max}$, as given by equalities 2(i) :

$$\begin{aligned} B(t_7 + d_{8min}) &= B(t_7) - V_R(t_7 + d_{8min} - t_7) = B(t_7) - (B(t_7) - B_{eq}) = B_{eq}, \\ B(t_7 + d_{8max}) &= B(t_7) - V_R(t_7 + d_{8max} - t_7) = B(t_7) - B(t_7) = 0, \end{aligned}$$

and recall that $B_{eq} > B_{high}$. So, since $B(t)$ is continuous, there exists some d_8 with $d_{8min} < d_8 < d_{8max}$, such that $B(t_7 + d_8) = B_{high}$. The system enters stage 1. \square

B.3.3 Proof of Proposition 3

Proof. Consider the system during stage 1, that is $t_8 < t < t_1$. During this interval, $\dot{B}(t) = 0$, implying that $B(t)$ remains constant. Since $B(t)$ enters stage 1 as $B(t)$ crosses below B_{high} , we can write $B(t) \approx B_{high}$.

The equation for P is $\dot{P}(t) = V_D D(t) > 0$ implying that $P(t)$ increases. Then, condition 3(i) implies that $P(t)$ will cross its threshold P_{high} before $R(t)$ crosses R_{int} . The system enters stage 2. \square

B.3.4 Proof of Proposition 4

Proof. In $[t_8, t_3]$, $\dot{B}(t) = 0$ implies that $B(t)$ is constant, with $B(t) \approx B_{high}$. While $B(t)$ is constant, $D(t)$ satisfies $\dot{D}(t) = V_B B_{high} - \gamma_D D(t)$ and has the form :

$$D(t) = \left(D(t_8) - \frac{V_B B_{high}}{\gamma_D} \right) e^{-\gamma_D(t-t_8)} + \frac{V_B B_{high}}{\gamma_D}. \quad (\text{B.1})$$

Since $D_{min} > \frac{V_B B_{eq}}{\gamma_D} > \frac{V_B B_{high}}{\gamma_D}$ (by Assumption A.5), $D(t)$ decreases and approaches D_{min} as t increases. Eventually, $R(t)$ also decreases for $t < t_3$ and approaches $R(t_3) = \frac{V_D V_B B_{high}}{\gamma_R \gamma_D}$.

In $[t_1, t_2]$, $\dot{P}(t) = V_D D(t) > 0$ implies that $P(t)$ increases and will remain above P_{high} . Therefore, the next variable to cross a threshold is $R(t)$, it decreases and will reach $R(t_2) =$

R_{int} , so the system enters stage 3.

In $[t_2, t_3]$, $D(t_2) < \frac{V_R}{V_D}$ by Assumption A.6, and $D(t)$ is still decreasing. Now this implies $\dot{P} = V_D D - V_R < 0$, so P decreases until it crosses $P_{high} = P(t_3)$, and the system enters stage 4.

Consider next the system during stage 4, that is to say $t_3 < t < t_4$. As the oscillator enters stage 4, $B(t_3) \lesssim B_{high}$, $R(t_3) \ll R_{int}$ and $P(t_3) = P_{high}$.

Since $B_{high} < B_{eq} = \frac{V_R}{\gamma_B P_{low}}$ (see Assumption A.2), in an interval $[t_3, t_3 + o_4]$, with $o_4 > 0$, $B(t)$ will increase since $\dot{B}(t) = V_R - \gamma_B B(t) P_{low} > 0$. But, notice that $B(t_3) \lesssim B_{high}$ at the end of stage 3, which implies that $B(t_3 + \varepsilon) > B_{high}$ for any $\varepsilon > 0$. Therefore, $B(t)$ will cross its threshold with $B(t_4) = B_{high}$, the system enters stage 5, and $d_4 = t_4 - t_3$ is necessarily a very short interval.

Finally, consider the system during stage 5, that is to say $t_4 < t < t_5$. For $t_3 < t < t_4$ we had $B(t) \approx B_{high}$ so, at the beginning of stage 5, B satisfies $\dot{B}(t) = V_R - \gamma_B B(t) P_{low} > 0$. $B(t)$ increases and converges quickly to B_{eq} . Thus, we can write $B(t) \approx B_{eq}$ during stage 5.

On some interval $[t_4, t_4 + o_5)$, with $o_5 > 0$ both $D(t)$ and $R(t)$ continue to decrease, as indicated by equation (B.1). Namely $R(t) < R_{int}$.

In stage 5, $P(t)$ is governed by the equation $\dot{P}(t) = V_D D(t) - \gamma_B B(t) P_{low}$. By Assumption A.6, during stage 4 and 5, $D(t) < \frac{V_R}{V_D}$. $\dot{P}(t) \approx V_D D(t) - \gamma_B B_{eq} P_{low} \approx V_D D(t) - V_R < 0$ P decreases until it crosses P_{low} at $P(t_5)$, defining the entry of the system into stage 6. \square

B.4 Transitions from refuted stages

In this Section, to complete our analysis, we provide a piecewise affine model for the biologically refuted stages 9-12 and draw the possible transitions. These stages are characterized by combinations of values for the complexes CLOCK:BMAL1 and PER:CRY that are contradictory to the phase opposition typically observed between those two complexes, since the variables B and P are both below their minimal thresholds in stages 9 and 10, and both above their maximal thresholds in stages 11 and 12. In this context, the equations governing the dynamics in stages 9-12 do not play a role in the algorithm which prevents transitions into these stages. However, it may be conceived that the system might be temporarily shifted to one of these stages, as in the case of a perturbation. To treat these cases, we next show that all trajectories starting in either of these four stages eventually leave them to enter one of the healthy cycle stages.

To define the PWA model in stages 9-12, we need the corresponding approximation of the nonlinear inactivation term $\gamma_B B P$. For low B and low P (stages 9 and 10), the inactivation term is quite small and we use the same approximations as in the adjacent stages with low B

and intermediate P (stages 4 and 1, respectively). For high B and P (stages 11 and 12), the inactivation term should be significant and we assume that it is proportional to P while B is fixed at large value :

$$\gamma_B B P \approx \begin{cases} \gamma_B B P_{low}, & R < R_{int}, B < B_{high}, P < P_{low} \\ 0, & R > R_{int}, B < B_{high}, P < P_{low} \\ \gamma_B B_{eq} P, & R < R_{int}, B > B_{high}, P > P_{high} \\ \gamma_B B_{eq} P, & R > R_{int}, B > B_{high}, P > P_{high}. \end{cases}$$

We can now check that any trajectory starting in one of these four stages eventually enters a stage in the healthy circadian cycle.

Proposition 6. *Consider the PWA system as defined in Tables 3.2 and B.1, and satisfying Assumptions A.1 to A.4. Then, a trajectory starting in one of stages 9 - 12 eventually crosses to another stage, as follows :*

- Stage 9 to 4, 6 or 10;
- Stage 10 to 1 or 9;
- Stage 11 to 3, 5, or 12;
- Stage 12 to 2, 8, or 11.

Proof : In stage 9, $\dot{B} = V_R - \gamma_B B P_{low}$ and $\dot{P} = V_D D - \gamma_B B P_{low}$. From Assumption A.2, $B < B_{high} < \frac{V_R}{\gamma_B P_{low}}$, so $\dot{B} > 0$ and B will increase until it crosses its threshold. Since no specific information is available on D or R , we assume that, depending on their initial conditions, trajectories starting in 9 may also cross either the P_{low} or R_{int} thresholds first. That is from 9 to 4, 6, or 10.

In stage 10, $\dot{B} = 0$ and $\dot{P} = V_D D$ so B remains constant while P increases and trajectories will eventually cross the P_{low} threshold. Depending on the B value, some trajectories may cross R_{int} first. From 10 to 1 or 9.

We analyse stages 11 and 12 as a single state : the equations for P , D and R are the same, while that for B is $\dot{B} = V_R - \gamma_B B_{eq} P$ in stage 11 and $\dot{B} = -\gamma_B B_{eq} P$ in stage 12. Since $P_{high} > \frac{V_R}{\gamma_B B_{eq}} = P_{low}$ (by definition of B_{eq}), it follows that $\dot{B} < V_R - \gamma_B B_{eq} P_{high}$ strictly decreases on stages 11 and 12. However, we do not have enough knowledge of D and R to establish a specific order in crossing for all trajectories. Since trajectories may depend on initial condition, we consider that either of the three thresholds can be crossed from 11 and 12, enabling three transitions from each of these stages (from 11 to 3, 5 or 12 and from 12 to 2, 8 or 11). \square

Note that this set of transitions theoretically allows the existence of (artificial) cycles of the form $9 \rightleftharpoons 10$ or $11 \rightleftharpoons 12$. But we next show that such cycles are unstable, in the sense that the trajectories always leave them after finite time.

Proposition 7. *Consider the PWA system as defined in Tables 3.2 and B.1, and satisfying Assumptions A.1 to A.4. Any cycles of the form $9 \rightleftharpoons 10$ or $11 \rightleftharpoons 12$ are unstable, that is, any trajectory leaves in finite time.*

Proof: An infinite cycle of the form $9 \rightleftharpoons 10$ may happen, if R_{int} is always the first threshold to be crossed for all times. On crossing between these two stages, the equations of R and D remain unchanged. Hence, by continuity of solutions, the derivative of R doesn't immediately change sign upon switching, and we may assume that $R(t)$ continues increasing (for transition $9 \rightarrow 10$) or decreasing (for transition $10 \rightarrow 9$) for some time ϵ after the switch. Suppose that there exists a sequence of R_{int} crossings between 9 and 10, starting by the transition $9 \rightarrow 10$: $t_{9,0} < t_{10,1} < t_{9,2} < t_{10,3} < \dots < t_{i,j} < \dots$, tending to infinity, and where $t_{i,j}$ denotes the exit time of stage i at the j^{th} transition between stages 9 and 10 ($i = 9, 10$ and j tends to infinity). To get a contradiction and show that trajectories must leave such a cycle after a finite time interval, note that B stays constant in 10 but increases and tends to $\frac{V_R}{\gamma_B P_{low}}$ in 9 according to :

$$B(t) = e^{-\gamma_B P_{low}(t-t_0)} \left(B(t_0) - \frac{V_R}{\gamma_B P_{low}} \right) + \frac{V_R}{\gamma_B P_{low}}$$

with $B_{high} < \frac{V_R}{\gamma_B P_{low}}$ (from Assumption A.2).

We have that : $B(t_{9,0}) = B(t_{10,1}) < B(t_{9,2}) = B(t_{10,3}) < \dots < B(t_{9,j}) = B(t_{10,j+1}) < B_{high} < B(t_{9,j+2}) < \frac{V_R}{\gamma_B P_{low}}$. Therefore, there exists a finite instant $t_{9,*}$ such that : $B(t_{9,*}) > B_{high}$.

At $t_{9,*}$, B_{high} is the first threshold to be crossed, and hence the trajectory crosses from 9 to 6, breaking the artificial cycle and entering the healthy cycle. Notice that since in stage 10 P increases ($\dot{P} = V_D D > 0$), it may be possible that P increases above its threshold P_{low} before B crosses B_{high} but, since we don't know the tendency of P in stage 9, it is easier to guarantee the exit from stages 9-10 with the crossing of B_{high} by B .

Similarly, suppose that a trajectory follows a cycle of the form $11 \rightleftharpoons 12$, with a sequence of switches at times $t_{11,0} < t_{12,1} < t_{11,2} < t_{12,3} < \dots < t_{i,j} < \dots$, with $i = 11, 12$ and $j \rightarrow \infty$. Recall that $B > B_{high}$ and $P > P_{high}$ in stages 11 and 12, recall also $B_{eq} = \frac{V_R}{\gamma_B P_{low}}$ and note that B equation satisfies $\dot{B} = V_R - \gamma_B B_{eq} P < V_R - \gamma_B B_{eq} P_{high} < 0$ in stage 11 and $\dot{B} = -\gamma_B B_{eq} P < -\gamma_B B_{eq} P_{high} < V_R - \gamma_B B_{eq} P_{high} < 0$ in stage 12.

Therefore, B decreases along both stages 11 and 12, with $B(t) < B(t_0) + V_R - \gamma_B B_{eq} P_{high} t$. Thus, starting from the transition $11 \rightarrow 12$ we have that : $B(t_{11,0}) > B(t_{12,1}) > B(t_{11,3}) > \dots > B_{high} > B(t_{i,j})$. There is a finite instant $t_{*,*} = \frac{B_{high} - B(t_0)}{(V_R - \gamma_B B_{eq} P_{high})}$ at which the trajectory

will cross to either stage 2 or 3, breaking the $11 \rightleftharpoons 12$ cycle and entering the healthy cycle. Similarly to the first part of the proof, notice that determining the tendency of P in stages 11 and 12 is difficult, and P may cross P_{high} first but to guarantee the exit from stages 11-12, it is easier to consider the crossing of B_{high} by B . \square

The state transition graph corresponding to the PWA system in Table 3.2 together with the equations for stages 9-12 in Table B.1, is shown in Figure B.2. The healthy cycle is represented by green arrows and each transition from the next stage is ensured by Assumptions A.1-A.8, by conditions from Propositions 1-4 and provided that the cycle started at the point (B_0, D_0, R_0, P_0) at the boundary between stages 5 and 6 (as defined by Eq. 3.10). The arrows in black are the transitions eliminated by Propositions 1-4. The gray arrows represent transitions from the biologically refuted stages and assume no hypothesis on the initial conditions of trajectories. Therefore, a trajectory evolving from one of the refuted stages 9-12 into one of the healthy cycle may not immediately follow the healthy cycle sequence of transitions. However, simulations show that trajectories do follow this sequence after a finite time (an example is given by Figure B.3).

TABLE B.1 – Equations describing the dynamics of the circadian clock in stages 9-12.

| Stage | 9 (stage refuted) | 10 (stage refuted) | 11 (stage refuted) | 12 (stage refuted) |
|----------------------------|--|--|---|---|
| Stage conditions | $R < R_{int}$ $B < B_{high}$ $P < P_{low}$ | $R > R_{int}$ $B < B_{high}$ $P < P_{low}$ | $R < R_{int}$ $B > B_{high}$ $P > P_{high}$ | $R > R_{int}$ $B > B_{high}$ $P > P_{high}$ |
| CLOCK:BMAL1 $\dot{B} =$ | \nearrow $V_R - \gamma_B B P_{low} > 0$ | \rightarrow 0 | \searrow $V_R - \gamma_B B_{eq} P < 0$ | \searrow $-\gamma_B B_{eq} P < 0$ |
| $\dot{D} =$ | $V_B B - \gamma_D D$ | $V_B B - \gamma_D D$ | $V_B B - \gamma_D D$ | $V_B B - \gamma_D D$ |
| $\dot{R} =$ | $V_D D - \gamma_R R$ | $V_D D - \gamma_R R$ | $V_D D - \gamma_R R$ | $V_D D - \gamma_R R$ |
| PER:CRY $\dot{P} =$ | $V_D D - \gamma_B B P_{low}$ | \nearrow $V_D D > 0$ | $V_D D - \gamma_B B_{eq} P$ | $V_D D - \gamma_B B_{eq} P$ |

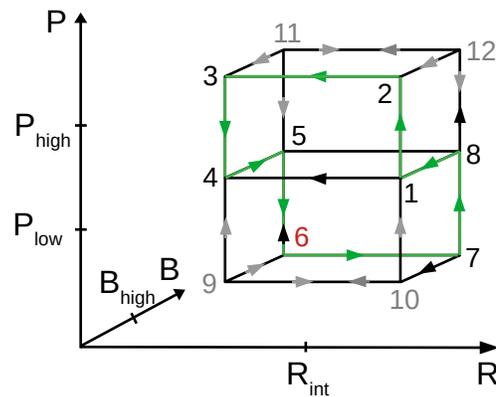


FIGURE B.2 – Considering that the starting point of the cycle is at the boundary between stages 5 and stage 6 (in red) : green arrows show the healthy cycle, black arrows show the unexpected transitions from the healthy cycle but which are prevented by conditions from Propositions 1 to 4. Otherwise, other possible transitions from the healthy cycle are excluded by definition of the model equations and by Assumptions A.1-A.8. Considering that the starting point is in a biologically refuted stage (stages 9 to 12) : grey arrows show transitions from these stages.

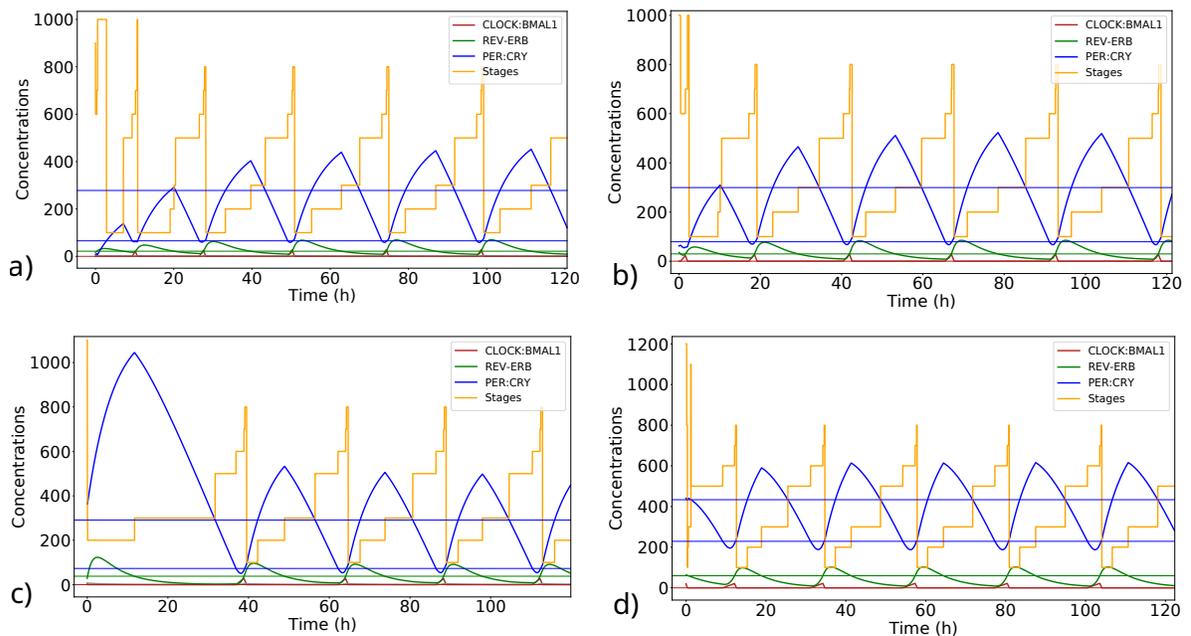


FIGURE B.3 – Time series for oscillators starting from (a) stage 9, (b) stage 10, (c) stage 11 and (d) stage 12. Horizontal lines represent the thresholds associated to each variable (same color code). Stages are represented by the orange line : stage 1 has 100 as ordinate, stage 2 has 200, etc.

Annexe C

Supplementary Information of Chapter 4

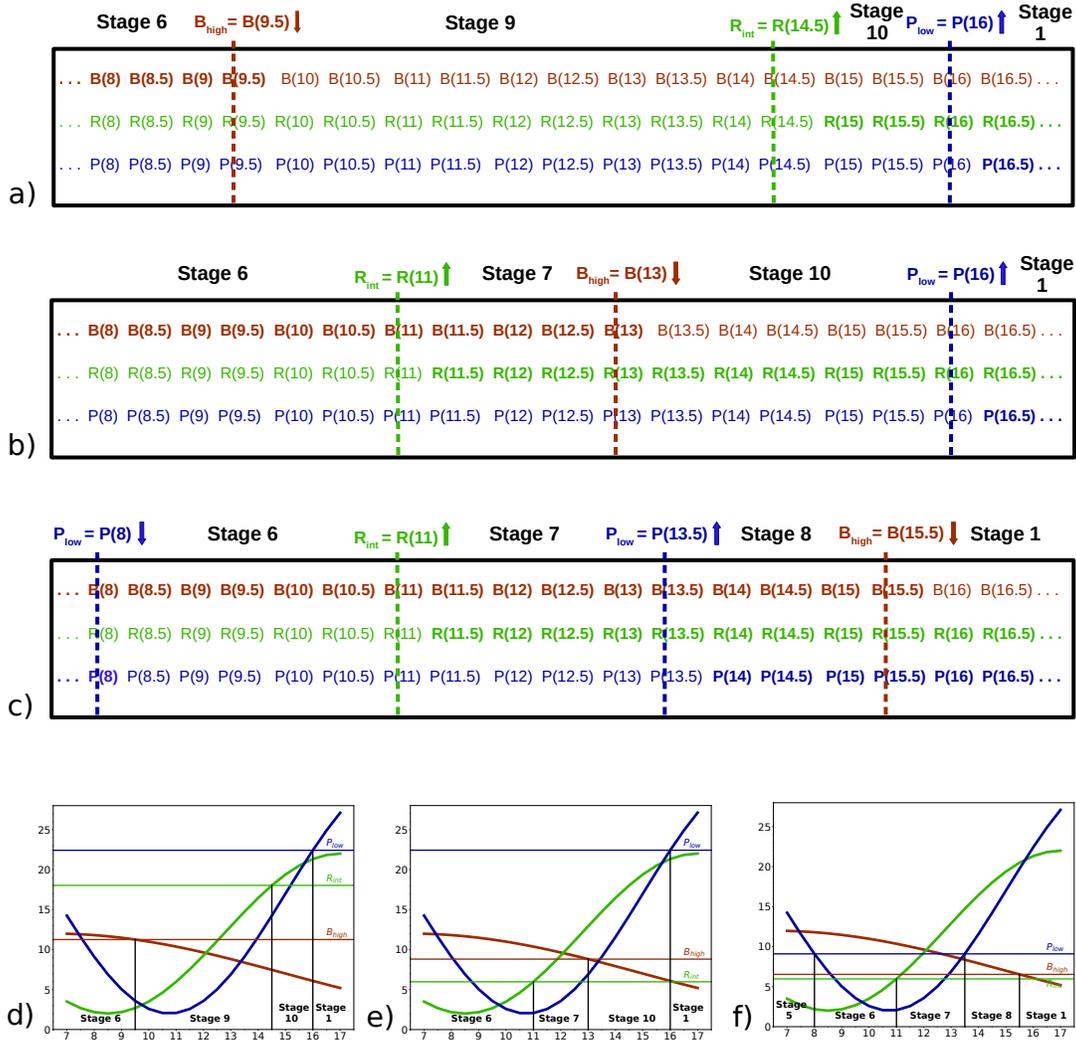


FIGURE C.1 – **Illustration of Step 10 of Algorithm 1.** Each row corresponds to time series values of respectively B , R and P (in bold when the variable is above its threshold), with $dt = 0.5$. Dashed vertical lines represent the times of thresholds crossing and thus mark the transition between two stages. Down (resp. up) arrow means that a given threshold is crossed while the corresponding variable is decreasing (resp. increasing). Figures (d), (e) and (f) illustrate respectively tables (a), (b) and (c). (a) Stage 6 is followed by stage 9 instead of stage 7, because B_{high} is crossed instead of R_{int} : the values of these two thresholds are updated according to Eq. 4.2 and 4.3, and shown in (b). (b) Stage 7 is followed by stage 10 instead of stage 8, because B_{high} is crossed instead of P_{low} : the values of these two thresholds are updated according to Eq. 4.2 and 4.3, and shown in (c). (c) The expected order of stages on this time period is reached.

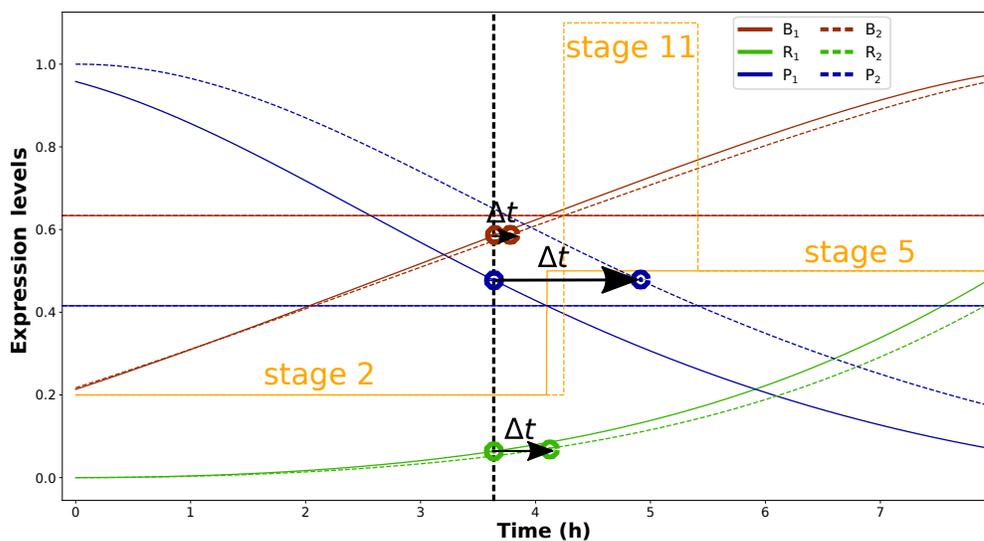


FIGURE C.2 – Illustration of a phase difference computation at one time point between oscillator 1 (solid line) and oscillator 2 (dashed line) for the Hesse *et al.* model.

Bibliographie

- [1] Y. O. Abe, H. Yoshitane, D. W. Kim, S. Kawakami, M. Koebis, K. Nakao, A. Aiba, J. K. Kim, and Y. Fukada. Rhythmic transcription of *bmal1* stabilizes the circadian timekeeping system in mammals. *Nature Communications*, 13(1) :4652, 2022.
- [2] Y. Adamovich, R. Aviram, and G. Asher. The emerging roles of lipids in circadian control. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(8) :1017–1025, 2015.
- [3] S. Almeida, M. Chaves, and F. Delaunay. Control of synchronization ratios in clock/cell cycle coupling by growth factors and glucocorticoids. *Royal Society Open Science*, 7(2) :192054, 2020.
- [4] S. Almeida, M. Chaves, and F. Delaunay. Transcription-based circadian mechanism controls the duration of molecular clock states in response to signaling inputs. *Journal of theoretical biology*, 484 :110015, 2020.
- [5] S. An, R. Harang, K. Meeker, D. Granados-Fuentes, C. A. Tsai, C. Mazuski, J. Kim, F. J. Doyle III, L. R. Petzold, and E. D. Herzog. A neuropeptide speeds circadian entrainment by reducing intercellular synchrony. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(46) :E4355–E4361, 2013.
- [6] M. P. Antoch, E.-J. Song, A.-M. Chang, M. H. Vitaterna, Y. Zhao, L. D. Wilsbacher, A. M. Sangoram, D. P. King, L. H. Pinto, and J. S. Takahashi. Functional identification of the mouse circadian clock gene by transgenic bac rescue. *Cell*, 89(4) :655–667, 1997.
- [7] A. Atwood, R. DeConde, S. S. Wang, T. C. Mockler, J. S. Sabir, T. Ideker, and S. A. Kay. Cell-autonomous circadian clock of hepatocytes drives rhythms in transcription and polyamine synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(45) :18560–18565, 2011.
- [8] C. L. Baker, J. J. Loros, and J. C. Dunlap. The circadian clock of *neurospora crassa*. *FEMS microbiology reviews*, 36(1) :95–110, 2012.
- [9] A. Balsalobre. Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell and tissue research*, 309 :193–199, 2002.
- [10] A. Balsalobre, F. Damiola, and U. Schibler. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell*, 93(6) :929–937, 1998.

- [11] A. Balsalobre, L. Marcacci, and U. Schibler. Multiple signaling pathways elicit circadian gene expression in cultured rat-1 fibroblasts. *Current Biology*, 10(20) :1291–1294, 2000.
- [12] S. Banerjee, Y. Wang, L. A. Solt, K. Griffett, M. Kazantzis, A. Amador, B. M. El-Gendy, S. Huitron-Resendiz, A. J. Roberts, Y. Shin, et al. Pharmacological targeting of the mammalian clock regulates sleep architecture and emotional behaviour. *Nature communications*, 5(1) :5759, 2014.
- [13] J. Behaegel, J.-P. Comet, G. Bernot, E. Cornillon, and F. Delaunay. A hybrid model of cell cycle in mammals. *Journal of bioinformatics and computational biology*, 14(01) :1640001, 2016.
- [14] S. Ben-Moshe and S. Itzkovitz. Spatial heterogeneity in the mammalian liver. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 16(7) :395–410, 2019.
- [15] J. Berg, J. Tymoczko, and L. Stryer. Biochemistry 5th ed. 2002w. h.
- [16] E. Berry, B. Cummins, R. R. Nerem, L. M. Smith, S. B. Haase, and T. Gedeon. Using extremal events to characterize noisy time series. *Journal of mathematical biology*, 80(5) :1523–1557, 2020.
- [17] N. Bolshette, H. Ibrahim, H. Reinke, and G. Asher. Circadian regulation of liver function : from molecular mechanisms to disease pathophysiology. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 20(11) :695–707, 2023.
- [18] T. Börding, A. N. Abdo, B. Maier, C. Gabriel, and A. Kramer. Generation of human cry1 and cry2 knockout cells using duplex crispr/cas9 technology. *Frontiers in Physiology*, 10 :577, 2019.
- [19] C. Brandes, J. D. Plautz, R. Stanewsky, C. F. Jamison, M. Straume, K. V. Wood, S. A. Kay, and J. C. Hall. Novel features of drosophila period transcription revealed by real-time luciferase reporting. *Neuron*, 16(4) :687–692, 1996.
- [20] A. J. Brown, J. S. Pendergast, and S. Yamazaki. Focus : Clocks and cycles : Peripheral circadian oscillators. *The Yale journal of biology and medicine*, 92(2) :327, 2019.
- [21] L. S. Brown and F. J. Doyle III. A dual-feedback loop model of the mammalian circadian clock for multi-input control of circadian phase. *PLoS Computational Biology*, 16(11) :e1008459, 2020.
- [22] A. Bugge, D. Feng, L. J. Everett, E. R. Briggs, S. E. Mullican, F. Wang, J. Jager, and M. A. Lazar. Rev-erb α and rev-erb β coordinately protect the circadian clock and normal metabolic function. *Genes & development*, 26(7) :657–667, 2012.
- [23] O. Burckard and M. Chaves. Analytic solutions for the circadian oscillator characterize cycle dynamics and its robustness. *Journal of Mathematical Biology*, 90(1) :1–28, 2025.
- [24] O. Burckard, M. Teboul, F. Delaunay, and M. Chaves. Cycle dynamics and synchronization in a coupled network of peripheral circadian clocks. *Interface Focus*, 12(3) :20210087, 2022.

- [25] O. Burckard, M. Teboul, F. Delaunay, and M. Chaves. Benchmark for quantitative characterization of circadian clock cycles. *BioSystems*, 247 :105363, 2025.
- [26] X. Cao, Y. Yang, C. P. Selby, Z. Liu, and A. Sancar. Molecular mechanism of the repressive phase of the mammalian circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(2) :e2021174118, 2021.
- [27] R. Casey, H. d. Jong, and J.-L. Gouzé. Piecewise-linear models of genetic regulatory networks : equilibria and their stability. *Journal of mathematical biology*, 52(1) :27–56, 2006.
- [28] A.-M. Chang, D. Aeschbach, J. F. Duffy, and C. A. Czeisler. Evening use of light-emitting ereaders negatively affects sleep, circadian timing, and next-morning alertness. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(4) :1232–1237, 2015.
- [29] I. Chaves, G. T. van der Horst, R. Schellevis, R. M. Nijman, M. G. Koerkamp, F. C. Holstege, M. P. Smidt, and M. F. Hoekman. Insulin-foxo3 signaling modulates circadian rhythms via regulation of clock transcription. *Current Biology*, 24(11) :1248–1255, 2014.
- [30] A. H. Chen, D. Lubkowitz, V. Yeong, R. L. Chang, and P. A. Silver. Transplantability of a circadian clock to a noncircadian organism. *Science advances*, 1(5) :e1500358, 2015.
- [31] S. Chen, M. Feng, S. Zhang, Z. Dong, Y. Wang, W. Zhang, and C. Liu. Angptl8 mediates food-driven resetting of hepatic circadian clock in mice. *Nature Communications*, 10(1) :3518, 2019.
- [32] Y.-Y. Chiou, Y. Yang, N. Rashid, R. Ye, C. P. Selby, and A. Sancar. Mammalian period represses and de-represses transcription by displacing clock-bmal1 from promoters in a cryptochrome-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(41) :E6072–E6079, 2016.
- [33] H. Cho, X. Zhao, M. Hatori, R. T. Yu, G. D. Barish, M. T. Lam, L.-W. Chong, L. DiTacchio, A. R. Atkins, C. K. Glass, et al. Regulation of circadian behaviour and metabolism by rev-erb- α and rev-erb- β . *Nature*, 485(7396) :123–127, 2012.
- [34] T.-P. C. Clock. Ordered phosphorylation governs oscillation of. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 :6947, 1996.
- [35] P. Crosby, R. Hamnett, M. Putker, N. P. Hoyle, M. Reed, C. J. Karam, E. S. Maywood, A. Stangherlin, J. E. Chesham, E. A. Hayter, et al. Insulin/igf-1 drives period synthesis to entrain circadian rhythms with feeding time. *Cell*, 177(4) :896–909, 2019.
- [36] B. Cummins, T. Gedeon, S. Harker, and K. Mischaikow. Model rejection and parameter reduction via time series. *SIAM journal on applied dynamical systems*, 17(2) :1589–1616, 2018.
- [37] B. Cummins, T. Gedeon, S. Harker, K. Mischaikow, and K. Mok. Combinatorial representation of parameter space for switching networks. *SIAM journal on applied dynamical systems*, 15(4) :2176–2212, 2016.

- [38] F. Damiola, N. Le Minh, N. Preitner, B. Kornmann, F. Fleury-Olela, and U. Schibler. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes & development*, 14(23) :2950–2961, 2000.
- [39] H. De Jong. Modeling and simulation of genetic regulatory systems : a literature review. *Journal of computational biology*, 9(1) :67–103, 2002.
- [40] H. De Jong, J.-L. Gouzé, C. Hernandez, M. Page, T. Sari, and J. Geiselmann. Qualitative simulation of genetic regulatory networks using piecewise-linear models. *Bulletin of mathematical biology*, 66(2) :301–340, 2004.
- [41] D. DeWoskin, J. Myung, M. D. Belle, H. D. Piggins, T. Takumi, and D. B. Forger. Distinct roles for gaba across multiple timescales in mammalian circadian timekeeping. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(29) :E3911–E3919, 2015.
- [42] J. F. Duffy, S. W. Cain, A.-M. Chang, A. J. Phillips, M. Y. Münch, C. Gronfier, J. K. Wyatt, D.-J. Dijk, K. P. Wright Jr, and C. A. Czeisler. Sex difference in the near-24-hour intrinsic period of the human circadian timing system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(supplement_3) :15602–15608, 2011.
- [43] L. Edelstein-Keshet. *Mathematical models in biology*. SIAM, 2005.
- [44] R. Edwards. Analysis of continuous-time switching networks. *Physica D : Nonlinear Phenomena*, 146(1-4) :165–199, 2000.
- [45] R. Edwards, E. Farcot, and E. Foxall. Explicit construction of chaotic attractors in glass networks. *Chaos, Solitons & Fractals*, 45(5) :666–680, 2012.
- [46] R. Edwards and L. Ironi. Periodic solutions of gene networks with steep sigmoidal regulatory functions. *Physica D : Nonlinear Phenomena*, 282 :1–15, 2014.
- [47] P. Emery, W. V. So, M. Kaneko, J. C. Hall, and M. Rosbash. Cry, a drosophila clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell*, 95(5) :669–679, 1998.
- [48] E. Farcot. Geometric properties of a class of piecewise affine biological network models. *Journal of Mathematical Biology*, 52 :373–418, 2006.
- [49] E. Farcot and J.-L. Gouzé. Periodic solutions of piecewise affine gene network models with non uniform decay rates : the case of a negative feedback loop. *Acta biotheoretica*, 57(4) :429–455, 2009.
- [50] C. Feillet, P. Krusche, F. Tamanini, R. C. Janssens, M. J. Downey, P. Martin, M. Teboul, S. Saito, F. A. Lévi, T. Bretschneider, et al. Phase locking and multiple oscillating attractors for the coupled mammalian clock and cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(27) :9828–9833, 2014.

- [51] D. Feng, T. Liu, Z. Sun, A. Bugge, S. E. Mullican, T. Alenghat, X. S. Liu, and M. A. Lazar. A circadian rhythm orchestrated by histone deacetylase 3 controls hepatic lipid metabolism. *Science*, 331(6022) :1315–1319, 2011.
- [52] A.-M. Finger, S. Jäschke, M. Del Olmo, R. Hurwitz, A. E. Granada, H. Herzl, and A. Kramer. Intercellular coupling between peripheral circadian oscillators by $\text{tgf-}\beta$ signaling. *Science advances*, 7(30) :eabg5174, 2021.
- [53] A.-M. Finger and A. Kramer. Mammalian circadian systems : Organization and modern life challenges. *Acta Physiologica*, 231(3) :e13548, 2021.
- [54] D. B. Forger and C. S. Peskin. A detailed predictive model of the mammalian circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(25) :14806–14811, 2003.
- [55] J. Fox, B. Cummins, R. C. Moseley, M. Gameiro, and S. B. Haase. A yeast cell cycle pulse generator model shows consistency with multiple oscillatory and checkpoint mutant datasets. *Mathematical Biosciences*, 367 :109102, 2024.
- [56] P. François. A model for the neurospora circadian clock. *Biophysical journal*, 88(4) :2369–2383, 2005.
- [57] C. H. Gabriel, M. Del Olmo, A. Zehtabian, M. Jäger, S. Reischl, H. van Dijk, C. Ulbricht, A. Rakhymzhan, T. Korte, B. Koller, et al. Live-cell imaging of circadian clock protein dynamics in crispr-generated knock-in cells. *Nature communications*, 12(1) :3796, 2021.
- [58] M. Gameiro. Dynamic signatures generated by regulatory networks. <https://github.com/marciogameiro/DSGRN>, 2018.
- [59] D. Gatfield, G. Le Martelot, C. E. Vejnar, D. Gerlach, O. Schaad, F. Fleury-Olela, A.-L. Ruskeepää, M. Oresic, C. C. Esau, E. M. Zdobnov, et al. Integration of microRNA mir-122 in hepatic circadian gene expression. *Genes & development*, 23(11) :1313–1326, 2009.
- [60] L. Glass. Combinatorial and topological methods in nonlinear chemical kinetics. *The Journal of chemical physics*, 63(4) :1325–1335, 1975.
- [61] L. Glass and S. A. Kauffman. Co-operative components, spatial localization and oscillatory cellular dynamics. *Journal of theoretical biology*, 34(2) :219–237, 1972.
- [62] L. Glass and S. A. Kauffman. The logical analysis of continuous, non-linear biochemical control networks. *Journal of theoretical Biology*, 39(1) :103–129, 1973.
- [63] L. Glass and J. S. Pasternack. Prediction of limit cycles in mathematical models of biological oscillations. *Bulletin of mathematical biology*, 40(1) :27–44, 1978.
- [64] L. Glass and J. S. Pasternack. Stable oscillations in mathematical models of biological control systems. *Journal of Mathematical Biology*, 6 :207–223, 1978.
- [65] D. Gonze, S. Bernard, C. Waltermann, A. Kramer, and H. Herzl. Spontaneous synchronization of coupled circadian oscillators. *Biophysical journal*, 89(1) :120–129, 2005.

- [66] D. Gonze, J. Halloy, and A. Goldbeter. Robustness of circadian rhythms with respect to molecular noise. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(2) :673–678, 2002.
- [67] B. C. Goodwin. Oscillatory behavior in enzymatic control processes. *Advances in enzyme regulation*, 3 :425–437, 1965.
- [68] J. J. Gooley. Treatment of circadian rhythm sleep disorders with light. *Ann Acad Med Singapore*, 37(8) :669–676, 2008.
- [69] J.-L. Gouzé. Positive and negative circuits in dynamical systems. *Journal of Biological Systems*, 6(01) :11–15, 1998.
- [70] J.-L. Gouzé and T. Sari. A class of piecewise linear differential equations arising in biological models. *Dynamical systems*, 17(4) :299–316, 2002.
- [71] A. Gréchez-Cassiau, B. Rayet, F. Guillaumond, M. Teboul, and F. Delaunay. The circadian clock component *bmal1* is a critical regulator of *p21waf1/cip1* expression and hepatocyte proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, 283(8) :4535–4542, 2008.
- [72] B. J. Greenwell, A. J. Trott, J. R. Beytebiere, S. Pao, A. Bosley, E. Beach, P. Finegan, C. Hernandez, and J. S. Menet. Rhythmic food intake drives rhythmic gene expression more potently than the hepatic circadian clock in mice. *Cell reports*, 27(3) :649–657, 2019.
- [73] J. S. Griffith. Mathematics of cellular control processes i. negative feedback to one gene. *Journal of theoretical biology*, 20(2) :202–208, 1968.
- [74] C. J. Guenther, M. E. Luitje, L. A. Pyle, P. C. Molyneux, J. K. Yu, A. S. Li, T. L. Leise, and M. E. Harrington. Circadian rhythms of *per2* : : *Luc* in individual primary mouse hepatocytes and cultures. *PloS one*, 9(2) :e87573, 2014.
- [75] F. Guillaumond, H. Dardente, V. Giguère, and N. Cermakian. Differential control of *bmal1* circadian transcription by *rev-erb* and *ror* nuclear receptors. *Journal of biological rhythms*, 20(5) :391–403, 2005.
- [76] H. Guo, J. M. Brewer, A. Champhekar, R. B. Harris, and E. L. Bittman. Differential control of peripheral circadian rhythms by suprachiasmatic-dependent neural signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(8) :3111–3116, 2005.
- [77] A. Gupta, B. Hepp, and M. Khammash. Noise induces the population-level entrainment of incoherent, uncoupled intracellular oscillators. *Cell systems*, 3(6) :521–531, 2016.
- [78] E. Harms, S. Kivimäe, M. W. Young, and L. Saez. Posttranscriptional and posttranslational regulation of clock genes. *Journal of biological rhythms*, 19(5) :361–373, 2004.
- [79] E. D. Herzog, S. J. Aton, R. Numano, Y. Sakaki, and H. Tei. Temporal precision in the mammalian circadian system : a reliable clock from less reliable neurons. *Journal of biological rhythms*, 19(1) :35–46, 2004.

- [80] J. Hesse, J. Martinelli, O. Aboumanify, A. Ballesta, and A. Relógio. A mathematical model of the circadian clock and drug pharmacology to optimize irinotecan administration timing in colorectal cancer. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19 :5170–5183, 2021.
- [81] G. T. v. d. Horst, M. Muijtjens, K. Kobayashi, R. Takano, S.-i. Kanno, M. Takao, J. d. Wit, A. Verkerk, A. P. Eker, D. v. Leenen, et al. Mammalian cry1 and cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature*, 398(6728) :627–630, 1999.
- [82] S. Hughes, A. Jagannath, M. W. Hankins, R. G. Foster, and S. N. Peirson. Photic regulation of clock systems. *Methods in enzymology*, 552 :125–143, 2015.
- [83] E. M. Jeong, Y. M. Song, and J. K. Kim. Combined multiple transcriptional repression mechanisms generate ultrasensitivity and oscillations. *Interface Focus*, 12(3) :20210084, 2022.
- [84] A. Jniene, L. Errguig, A. J. El Hangouche, H. Rkain, S. Aboudrar, M. El Ftouh, and T. Dakka. Perception of sleep disturbances due to bedtime use of blue light-emitting devices and its impact on habits and sleep quality among young medical students. *BioMed research international*, 2019, 2019.
- [85] C. Jud, I. Schmutz, G. Hampp, H. Oster, and U. Albrecht. A guideline for analyzing circadian wheel-running behavior in rodents under different lighting conditions. *Biological procedures online*, 7 :101–116, 2005.
- [86] A. Kalsbeek, R. Cutrera, J. Van Heerikhuize, J. Van Der Vliet, and R. Buijs. Gaba release from suprachiasmatic nucleus terminals is necessary for the light-induced inhibition of nocturnal melatonin release in the rat. *Neuroscience*, 91(2) :453–461, 1999.
- [87] J. K. Kim, Z. P. Kilpatrick, M. R. Bennett, and K. Josić. Molecular mechanisms that regulate the coupled period of the mammalian circadian clock. *Biophysical Journal*, 106(9) :2071–2081, 2014.
- [88] D. P. King, Y. Zhao, A. M. Sangoram, L. D. Wilsbacher, M. Tanaka, M. P. Antoch, T. D. Steeves, M. H. Vitaterna, J. M. Kornhauser, P. L. Lowrey, et al. Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell*, 89(4) :641–653, 1997.
- [89] A. Klarsfeld, S. Birman, and F. Rouyer. L’horloge circadienne à l’heure nobel. *médecine/sciences*, 34(5) :480–484, 2018.
- [90] A. Klarsfeld and J.-J. d’Ortous. At the dawn of chronobiology. *Translated by Helen Tomlin*, 2013.
- [91] E. Klipp, W. Liebermeister, C. Wierling, and A. Kowald. *Systems biology : a textbook*. John Wiley & Sons, 2016.
- [92] C. H. Ko and J. S. Takahashi. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human molecular genetics*, 15(suppl_2) :R271–R277, 2006.

- [93] A. Kohsaka, A. D. Laposky, K. M. Ramsey, C. Estrada, C. Joshi, Y. Kobayashi, F. W. Turek, and J. Bass. High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice. *Cell metabolism*, 6(5) :414–421, 2007.
- [94] N. Koike, S.-H. Yoo, H.-C. Huang, V. Kumar, C. Lee, T.-K. Kim, and J. S. Takahashi. Transcriptional architecture and chromatin landscape of the core circadian clock in mammals. *science*, 338(6105) :349–354, 2012.
- [95] R. J. Konopka and S. Benzer. Clock mutants of drosophila melanogaster. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68(9) :2112–2116, 1971.
- [96] A. D. Koopman, S. P. Rauh, E. van ‘t Riet, L. Groeneveld, A. A. Van Der Heijden, P. J. Elders, J. M. Dekker, G. Nijpels, J. W. Beulens, and F. Rutters. The association between social jetlag, the metabolic syndrome, and type 2 diabetes mellitus in the general population : the new hoorn study. *Journal of biological rhythms*, 32(4) :359–368, 2017.
- [97] A. Korenčič, G. Bordyugov, R. Košir, D. Rozman, M. Goličnik, and H. Herzog. The interplay of cis-regulatory elements rules circadian rhythms in mouse liver. *PloS one*, 7(11) :e46835, 2012.
- [98] K. B. Koronowski and P. Sassone-Corsi. Communicating clocks shape circadian homeostasis. *Science*, 371(6530) :eabd0951, 2021.
- [99] J.-C. Leloup and A. Goldbeter. A model for circadian rhythms in drosophila incorporating the formation of a complex between the per and tim proteins. *Journal of biological rhythms*, 13(1) :70–87, 1998.
- [100] J.-C. Leloup and A. Goldbeter. Toward a detailed computational model for the mammalian circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(12) :7051–7056, 2003.
- [101] J.-C. Leloup and A. Goldbeter. Modeling the mammalian circadian clock : sensitivity analysis and multiplicity of oscillatory mechanisms. *Journal of theoretical biology*, 230(4) :541–562, 2004.
- [102] F. Lévi, A. Okyar, S. Dulong, P. F. Innominato, and J. Clairambault. Circadian timing in cancer treatments. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 50 :377–421, 2010.
- [103] X.-M. Li, A. Mohammad-Djafari, M. Dumitru, S. Dulong, E. Filipinski, S. Siffroi-Fernandez, A. Mteyrek, F. Scaglione, C. Guettier, F. Delaunay, et al. A circadian clock transcription model for the personalization of cancer chronotherapy. *Cancer research*, 73(24) :7176–7188, 2013.
- [104] A. C. Liu, H. G. Tran, E. E. Zhang, A. A. Priest, D. K. Welsh, and S. A. Kay. Redundant function of *rev-erba* and β and non-essential role for *bmal1* cycling in transcriptional regulation of intracellular circadian rhythms. *PLoS genetics*, 4(2) :e1000023, 2008.

- [105] L. Lopez-Molina, F. Conquet, M. Dubois-Dauphin, and U. Schibler. The dbp gene is expressed according to a circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus and influences circadian behavior. *The EMBO journal*, 1997.
- [106] J. Martinelli, S. Dulong, X.-M. Li, M. Teboul, S. Soliman, F. Lévi, F. Fages, and A. Ballega. Model learning to identify systemic regulators of the peripheral circadian clock. *Bioinformatics*, 37(Supplement_1) :i401–i409, 2021.
- [107] E. S. Maywood. Synchronization and maintenance of circadian timing in the mammalian clockwork. *European Journal of Neuroscience*, 51(1) :229–240, 2020.
- [108] T. Mestl, C. Lemay, and L. Glass. Chaos in high-dimensional neural and gene networks. *Physica D : Nonlinear Phenomena*, 98(1) :33–52, 1996.
- [109] T. Mestl, E. Plahte, and S. W. Omholt. Periodic solutions in systems of piecewise-linear differential equations. *Dynamics and stability of systems*, 10(2) :179–193, 1995.
- [110] Y. Minami, K. L. Ode, and H. R. Ueda. Mammalian circadian clock : the roles of transcriptional repression and delay. *Circadian clocks*, pages 359–377, 2013.
- [111] J. A. Mohawk and J. S. Takahashi. Cell autonomy and synchrony of suprachiasmatic nucleus circadian oscillators. *Trends in neurosciences*, 34(7) :349–358, 2011.
- [112] M.-A. Moralia, C. Quignon, M. Simonneaux, and V. Simonneaux. Environmental disruption of reproductive rhythms. *Frontiers in neuroendocrinology*, 66 :100990, 2022.
- [113] A. Mukherji, S. M. Bailey, B. Staels, and T. F. Baumert. The circadian clock and liver function in health and disease. *Journal of hepatology*, 71(1) :200–211, 2019.
- [114] R. Narumi, Y. Shimizu, M. Ukai-Tadenuma, K. L. Ode, G. N. Kanda, Y. Shinohara, A. Sato, K. Matsumoto, and H. R. Ueda. Mass spectrometry-based absolute quantification reveals rhythmic variation of mouse circadian clock proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(24) :E3461–E3467, 2016.
- [115] B. Novák and J. J. Tyson. Design principles of biochemical oscillators. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(12) :981–991, 2008.
- [116] D. Ono, K.-i. Honma, and S. Honma. Roles of neuropeptides, vip and avp, in the mammalian central circadian clock. *Frontiers in neuroscience*, 15 :650154, 2021.
- [117] S. Panda, M. P. Antoch, B. H. Miller, A. I. Su, A. B. Schook, M. Straume, P. G. Schultz, S. A. Kay, J. S. Takahashi, and J. B. Hogenesch. Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell*, 109(3) :307–320, 2002.
- [118] D. A. Paranjpe and V. Kumar Sharma. Evolution of temporal order in living organisms. *Journal of Circadian Rhythms*, 3(1) :1–13, 2005.
- [119] A. Patke, M. W. Young, and S. Axelrod. Molecular mechanisms and physiological importance of circadian rhythms. *Nature reviews Molecular cell biology*, 21(2) :67–84, 2020.

- [120] D. J. Pincus, T. R. Humeston, and R. J. Martin. Further studies on the chronotherapy of asthma with inhaled steroids : the effect of dosage timing on drug efficacy. *Journal of allergy and clinical immunology*, 100(6) :771–774, 1997.
- [121] D. J. Pincus, S. J. Szefer, L. M. Ackerson, and R. J. Martin. Chronotherapy of asthma with inhaled steroids : the effect of dosage timing on drug efficacy. *Journal of allergy and clinical immunology*, 95(6) :1172–1178, 1995.
- [122] E. Plahte, T. Mestl, and S. W. Omholt. Global analysis of steady points for systems of differential equations with sigmoid interactions. *Dynamics and Stability of Systems*, 9(4) :275–291, 1994.
- [123] J. D. Plautz, M. Kaneko, J. C. Hall, and S. A. Kay. Independent photoreceptive circadian clocks throughout drosophila. *Science*, 278(5343) :1632–1635, 1997.
- [124] O. A. Podkolodnaya, N. N. Tverdokhle, and N. L. Podkolodnyy. Computational modeling of the cell-autonomous mammalian circadian oscillator. *BMC systems biology*, 11(Suppl 1) :27–42, 2017.
- [125] J. Price, M. Dembinska, M. Young, and M. Rosbash. Suppression of period protein abundance and circadian cycling by the drosophila clock mutation timeless. *The EMBO journal*, 14(16) :4044–4049, 1995.
- [126] C. Ramanathan, H. Xu, S. K. Khan, Y. Shen, P. J. Gitis, D. K. Welsh, J. B. Hogenesch, and A. C. Liu. Cell type-specific functions of period genes revealed by novel adipocyte and hepatocyte circadian clock models. *PLoS genetics*, 10(4) :e1004244, 2014.
- [127] A. Relógio, P. O. Westermark, T. Wallach, K. Schellenberg, A. Kramer, and H. Herzl. Tuning the mammalian circadian clock : robust synergy of two loops. *PLoS computational biology*, 7(12) :e1002309, 2011.
- [128] S. M. Reppert and D. R. Weaver. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, 418(6901) :935–941, 2002.
- [129] A. Richard and J.-P. Comet. Stable periodicity and negative circuits in differential systems. *Journal of mathematical biology*, 63(3) :593–600, 2011.
- [130] J. A. Ripperger, C. Jud, and U. Albrecht. The daily rhythm of mice. *FEBS letters*, 585(10) :1384–1392, 2011.
- [131] J. A. Ripperger and U. Schibler. Rhythmic clock-bmal1 binding to multiple e-box motifs drives circadian dbp transcription and chromatin transitions. *Nature genetics*, 38(3) :369–374, 2006.
- [132] T. Roenneberg and M. Meroz. Circadian clocks—the fall and rise of physiology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(12) :965–971, 2005.
- [133] P. Sacre and R. Sepulchre. Sensitivity analysis of oscillator models in the space of phase-response curves : Oscillators as open systems. *IEEE Control Systems Magazine*, 34(2) :50–74, 2014.

- [134] S. Sewlall, V. Pillay, M. P. Danckwerts, Y. E. Choonara, V. MK Ndesendo, and L. C. du Toit. A timely review of state-of-the-art chronopharmaceuticals synchronized with biological rhythms. *Current drug delivery*, 7(5) :370–388, 2010.
- [135] F. Sinturel, P. Gos, V. Petrenko, C. Hagedorn, F. Kreppel, K.-F. Storch, D. Knutti, A. Liani, C. Weitz, Y. Emmenegger, et al. Circadian hepatocyte clocks keep synchrony in the absence of a master pacemaker in the suprachiasmatic nucleus or other extrahepatic clocks. *Genes & development*, 35(5-6) :329–334, 2021.
- [136] L. A. Solt, Y. Wang, S. Banerjee, T. Hughes, D. J. Kojetin, T. Lundasen, Y. Shin, J. Liu, M. D. Cameron, R. Noel, et al. Regulation of circadian behaviour and metabolism by synthetic rev-erb agonists. *Nature*, 485(7396) :62–68, 2012.
- [137] M. Sujino, K.-h. Masumoto, S. Yamaguchi, G. T. van der Horst, H. Okamura, and S.-I. T. Inouye. Suprachiasmatic nucleus grafts restore circadian behavioral rhythms of genetically arrhythmic mice. *Current biology*, 13(8) :664–668, 2003.
- [138] E. R. Sutherland. Nocturnal asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 116(6) :1179–1186, 2005.
- [139] J. S. Takahashi. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nature Reviews Genetics*, 18(3) :164–179, 2017.
- [140] R. Thomas. Boolean formalization of genetic control circuits. *Journal of theoretical biology*, 42(3) :563–585, 1973.
- [141] I. P. Torra, V. Tsibulsky, F. Delaunay, R. Saladin, V. Laudet, J.-C. Fruchart, V. Kosykh, and B. Staels. Circadian and glucocorticoid regulation of rev-erb α expression in liver. *Endocrinology*, 141(10) :3799–3806, 2000.
- [142] Y. Touitou, A. Reinberg, and D. Touitou. Association between light at night, melatonin secretion, sleep deprivation, and the internal clock : Health impacts and mechanisms of circadian disruption. *Life sciences*, 173 :94–106, 2017.
- [143] Z. Travnickova-Bendova, N. Cermakian, S. M. Reppert, and P. Sassone-Corsi. Bimodal regulation of mperiod promoters by creb-dependent signaling and clock/bmal1 activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(11) :7728–7733, 2002.
- [144] G. Triqueneaux, S. Thenot, T. Kakizawa, M. P. Antoch, R. Safi, J. S. Takahashi, F. Delaunay, and V. Laudet. The orphan receptor rev-erb α gene is a target of the circadian clock pacemaker. *Journal of molecular endocrinology*, 33(3) :585–608, 2004.
- [145] H. R. Ueda, S. Hayashi, W. Chen, M. Sano, M. Machida, Y. Shigeyoshi, M. Iino, and S. Hashimoto. System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. *Nature genetics*, 37(2) :187–192, 2005.
- [146] M. Ukai-Tadenuma, R. G. Yamada, H. Xu, J. A. Ripperger, A. C. Liu, and H. R. Ueda. Delay in feedback repression by cryptochrome 1 is required for circadian clock function. *Cell*, 144(2) :268–281, 2011.

- [147] A. Vandenberghe, M. Lefranc, and A. Furlan. An overview of the circadian clock in the frame of chronotherapy : from bench to bedside. *Pharmaceutics*, 14(7) :1424, 2022.
- [148] K. Vanselow, J. T. Vanselow, P. O. Westermarck, S. Reischl, B. Maier, T. Korte, A. Herrmann, H. Herzog, A. Schlosser, and A. Kramer. Differential effects of per2 phosphorylation : molecular basis for the human familial advanced sleep phase syndrome (fasps). *Genes & development*, 20(19) :2660–2672, 2006.
- [149] M. H. Vitaterna, C. P. Selby, T. Todo, H. Niwa, C. Thompson, E. M. Fruechte, K. Hitomi, R. J. Thresher, T. Ishikawa, J. Miyazaki, et al. Differential regulation of mammalian period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(21) :12114–12119, 1999.
- [150] M. H. Vitaterna, J. S. Takahashi, and F. W. Turek. Overview of circadian rhythms. *Alcohol research & health*, 25(2) :85, 2001.
- [151] A. Woller, H. Duez, B. Staels, and M. Lefranc. A mathematical model of the liver circadian clock linking feeding and fasting cycles to clock function. *Cell reports*, 17(4) :1087–1097, 2016.
- [152] A. Woller and D. Gonze. Modeling clock-related metabolic syndrome due to conflicting light and food cues. *Scientific reports*, 8(1) :1–10, 2018.
- [153] S. Yamaguchi, H. Isejima, T. Matsuo, R. Okura, K. Yagita, M. Kobayashi, and H. Okamura. Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science*, 302(5649) :1408–1412, 2003.
- [154] S. Yamazaki, R. Numano, M. Abe, A. Hida, R.-i. Takahashi, M. Ueda, G. D. Block, Y. Sakaki, M. Menaker, and H. Tei. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science*, 288(5466) :682–685, 2000.
- [155] R. Ye, C. P. Selby, Y.-Y. Chiou, I. Ozkan-Dagliyan, S. Gaddameedhi, and A. Sancar. Dual modes of clock : Bmal1 inhibition mediated by cryptochrome and period proteins in the mammalian circadian clock. *Genes & development*, 28(18) :1989–1998, 2014.
- [156] E. L. Zelinski, S. H. Deibel, and R. J. McDonald. The trouble with circadian clock dysfunction : multiple deleterious effects on the brain and body. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 40 :80–101, 2014.
- [157] H. Zeng, P. E. Hardin, and M. Rosbash. Constitutive overexpression of the drosophila period protein inhibits period mrna cycling. *The EMBO Journal*, 13(15) :3590–3598, 1994.
- [158] E. E. Zhang, A. C. Liu, T. Hirota, L. J. Miraglia, G. Welch, P. Y. Pongsawakul, X. Liu, A. Atwood, J. W. Huss, J. Janes, et al. A genome-wide rna screen for modifiers of the circadian clock in human cells. *Cell*, 139(1) :199–210, 2009.

-
- [159] M. J. Zylka, L. P. Shearman, D. R. Weaver, and S. M. Reppert. Three period homologs in mammals : differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron*, 20(6) :1103–1110, 1998.