



**ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA**  
INSTITUTO POLITÉCNICO DE CASTELO BRANCO

**LA RÉGULATION DES GÈNES DE L'HORLOGE CIRCADIANNE INTESTINALE  
PAR LES NUTRIMENTS:  
MODÉLISATION SUR UNE LIGNÉE CELLULAIRE  
DE CARCINOME COLIQUE**

**Engenharia das Ciências Agrárias – Ramo Animal**

**Relatório do Trabalho de Fim de Curso**

**Jéssica de Matos Pintado**

—◆—  
**CASTELO BRANCO**

**2005**

# Table des matières

<b>TABLE DES MATIERES</b> .....	I
<b>TABLE DES FIGURES</b> .....	III
<b>TABLE DES TABLEAUX</b> .....	V
<b>TABLE DES ANNEXES</b> .....	VI
<b>RESUME</b> .....	VII
<b>RESUMO</b> .....	VIII
<b>ABSTRACT</b> .....	IX
<b>ABREVIATIONS</b> .....	X
<b>1. INTRODUCTION</b> .....	1
<b>2. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	3
2.1. LA NOTION DE RYTHME BIOLOGIQUE .....	3
2.1.1. Paramètres caractérisant un rythme biologique .....	4
2.1.2. Méthodes utilisées au laboratoire pour caractériser les rythmes biologiques .....	5
2.1.3. Composantes des rythmes biologiques .....	5
2.2. QU'EST-CE QU'UN OSCILLATEUR BIOLOGIQUE ? QU'ENTEND-ON PAR HORLOGE ? .....	7
2.3. CARACTERISTIQUES MOLECULAIRES DES GENES CODANT POUR UN COMPOSANT MOLECULAIRE DE L'HORLOGE.....	11
2.3.1. Les membres de la famille des gènes du complexe moléculaire central : CLOCK :BMAL1 ou NPAS2 :BMAL1 .....	11
2.3.2. Les gènes Period sont des gènes membres de la famille des gènes codant pour la réponse génique immédiate .....	13
2.3.3. Les Cryptochromes, des gènes qui ont perdu l'activité photolyase chez les mammifères ....	16
2.3.4. Timeless, un gène dont la fonction a été supplantée par celle d'autres gènes .....	17
2.3.5. Les caséines kinase I, des composants critiques de l'horloge circadienne chez les mammifères .....	18
2.3.6. Les autres gènes .....	19
2.3.6.1. Dec1 et Dec2 .....	19
2.3.6.2. Rev-erb alpha et Rev-erb beta.....	20
2.3.6.3. Ror-alpha .....	21
2.3.6.4. Les intrants .....	21
2.3.6.4.1. Le facteur de réponse au sérum (SRF).....	21
2.3.6.4.2. Le facteur de croissance transformant alpha et le récepteur à l'EGF.....	22
2.3.6.4.3. Les prokinéticines.....	22
2.3.6.5. Les sortants.....	23
2.3.6.5.1. Les transporteurs de glucose (GLUT).....	23

2.3.6.5.2. DBP, TEF et HLF .....	24
2.4. LES DIFFERENTES CLASSES D'HORLOGES CIRCADIENNES .....	25
2.5. LES SYNCHRONISEURS ET LA NOTION D'ENTRAINEMENT .....	27
2.6. CONCLUSION SUR L'ETUDE EXPERIMENTALE.....	30
<b>3. MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>31</b>
3.1. EXPRESSION DES ARN MESSAGERS CODANT POUR LES PROTEINES DE L'HORLOGE PAR DES COLONOCYTES DE 4 PATIENTS SAINS ET DES CELLULES DE CARCINOME COLIQUE EN CULTURE.....	31
3.2. CHOC SERIQUE ET FORMULATION DES MILIEUX DE CULTURE.....	32
3.3. IMMUNODETECTION DES PROTEINES SRF ET PERIOD1 .....	32
3.4. SEMI-QUANTIFICATION DES SIGNAUX EMIS PAR LES CELLULES CACO-2.....	34
3.4.1. Semi-quantification de SRF sur tapis de cellules Caco-2 .....	34
3.4.2. Semi-quantification des signaux (ADN et PERIOD1) émis par les noyaux de cellules Caco-2 .....	34
3.5. DOSAGES DU D-GLUCOSE ET DU BUTYRATE .....	35
3.5.1. Dosages du D-glucose .....	35
3.5.2. Dosages du butyrate.....	36
3.6. CO-CULTURE ENTRE NEURONES DE NOYAUX SUPRACHIASMATIQUES ET CELLULES CACO-2 .....	37
<b>4. RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>39</b>
4.1. EXPRESSION DES ARN MESSAGERS CODANT POUR LES PROTEINES DE L'HORLOGE PAR DES COLONOCYTES DE 4 PATIENTS SAINS ET DES CELLULES DE CARCINOME COLIQUE EN CULTURE.....	39
4.2. SUIVI DE L'EXPRESSION DE PERIOD1 ET DE SRF AU COURS DU TEMPS .....	40
4.2.1. Suivi de l'expression de SRF sur 18h.....	40
4.2.2. Suivi de l'expression de PERIOD1 au cours du temps .....	42
4.2.2.1. Suivi de l'expression de PERIOD1 sur 18h.....	42
4.2.2.2. Suivi de l'expression de PERIOD1 sur 48h.....	43
4.3. EFFETS DE LA FORMULE DU MILIEU DE CULTURE SUR LES TAUX D'EXPRESSION DE PERIOD1 .....	46
4.3.1. Révélation de l'expression de PERIOD1 avec différents milieux de culture.....	46
4.3.2. Evolution des taux de butyrate au cours du temps .....	49
4.4. CO-CULTURE ENTRE NEURONES DE NOYAUX SUPRACHIASMATIQUES ET CELLULES CACO-2 .....	55
<b>5. CONSIDERATIONS FINALES.....</b>	<b>58</b>

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## REMERCIEMENTS

## ANNEXES

## Resumo

Este estudo foi realizado na UFDNH do centro INRA de Nantes (França), de Março a Agosto de 2005. Foi efectuado sobre células Caco-2, sobre as quais tentamos ver se a glucose e o butirato podiam regular a expressão dos genes do relógio circadiano intestinal humano. O seguimento da expressão do factor de resposta ao soro sobre 18h por imunodeteção por epifluorescência confirmou o facto de se tratar de um factor de entrada do relógio. A imunodeteção por epifluorescência sobre 2h, 18h e sobre 48h (com um intervalo de 6h) da expressão oscilatória de PERIOD1 apoia a ideia segundo a qual *Period1* é um gene da resposta imediata, mas também um gene importante para o relógio. Além disso, foram testados quatro meios de cultura diferentes (DMEM 10% FCS, 25mM D-glucose, 1 mM butirato e sem glucose nem butirato) para ver se têm um efeito sobre a expressão de PERIOD1. Observamos que um meio suplementado em butirato era um sincronizador eficaz relativamente aos outros meios, e que a concentração de butirato (0,5, 1 e 2 mM) que permanece nos sobrenadantes de monocamadas de células Caco-2 foi reduzida significativamente sobre mais de 50h em relação aos sobrenadantes incubados em placas sem células (ANOVA em triplo, 5% de significância). Esses dados sugerem que o butirato poderia ser consumido pelas células Caco-2.

**Palavras-chave:** Caco-2, PERIOD1, sincronização, butirato.