Figure 2. Régime de force de la sélection naturelle au cours de la vie, proportion de la génération en vie et impact de l'appui par les personnes âgées sur leur parentèle très jeune.

La force de sélection diminue avec l'âge (en jaune). Les allèles contribuant à des phénotypes qui ne sont exprimés qu'après la reproduction ne sont pas soumis à la sélection. Ainsi, lorsque la durée de vie reproductive est terminée, la sélection ne fonctionne plus. Toutefois, les personnes âgées qui sont protégées du déclin cognitif (en vert) peuvent encore diriger leur appui envers des individus plus jeunes. Lorsque ces avantages sont dirigés principalement à d'autres qui portent également le même allèle protecteur (la parentèle), la fréquence de l'allèle protecteur peut augmenter par la sélection de parentèle (en vert foncé).

RÉFÉRENCES

1. Varki NM, Strobert E, Dick EJJ, et al. Biomedical differences between human and nonhuman hominids: potential roles for uniquely human aspects of sialic acid biology. *Annu Rev Pathol* 2011 ; 6 : 365-93.
2. Crocker PR, Paulson JC, Varki A. Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2007 ; 7 : 255-66.
3. Malik M, Simpson JF, Parikh I, et al. CD33 Alzheimer's risk-altering polymorphism, CD33 expression, and exon 2 splicing. *J Neurosci* 2013 ; 33 : 13320-5.
4. Bradshaw EM, Chibnik LB, Keenan BT, et al. CD33 Alzheimer's disease locus: altered monocyte function and amyloid biology. *Nat Neurosci* 2013 ; 16 : 848-50.
5. Schwarz F, Springer SA, Altheide TK, et al. Human-specific derived alleles of CD33 and other genes protect against postreproductive cognitive decline. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016 ; 113 : 74-9.
6. Somel M, Franz H, Yan Z, et al. Transcriptional neoteny in the human brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009 ; 106 : 5743-8.
7. Enard D, Depaulis F, Roest Crollius H. Points chauds de sélection positive dans les génomes de primates. *Med Sci (Paris)* 2010 ; 26 : 579-81.
8. Springer SA, Schwarz F, Altheide TK, et al. Reply to Liu and Jiang: Maintenance of postreproductive cognitive capacity by inclusive fitness. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016 ; 113 : E1591-2.

NOUVELLE

Identification d'un nouveau facteur de restriction contre l'infection par le virus de l'hépatite B

Le complexe SMC5/6

Laetitia Gerossier¹, Adrien Decorsière², Fabien Abdul², Olivier Hantz¹

¹ Centre de recherche en cancérologie de Lyon (CRCL), Inserm U1052, CNRS 5286, université de Lyon, 151, cours Albert Thomas, 69424 Lyon Cedex, France ;
² Department of microbiology and molecular medicine, university medical centre (CMU), rue Michel Servet 1, 1211 Genève 4, Suisse.
laetitia.gerossier@inserm.fr

➤ L'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) constitue un problème majeur de santé publique. En effet, malgré l'existence d'un vaccin préventif efficace, environ 240 millions de personnes sont infectées de façon chronique par le virus au niveau mondial. La situation de por-

teur chronique du VHB est associée à un risque élevé de développer de graves pathologies du foie comme la cirrhose ou le carcinome hépatocellulaire (CHC). Le CHC représente 95 % des tumeurs malignes primitives du foie, pour lesquelles il n'existe que peu d'options de

traitement, et est responsable de 6 000 décès par an en France. L'incidence du CHC augmente du fait des infections virales, notamment celles par le virus de l'hépatite B, associées à presque la moitié des cas de CHC au niveau mondial [1].

Les traitements actuels contre l'hépatite B ne suffisent pas et ne permettent pas d'arrêter l'évolution vers la cirrhose et le cancer car l'ADN viral n'est pas éliminé des cellules [2]. Le VHB se maintient dans la cellule par formation d'un mini-chromosome viral (ou ADNccc pour ADN circulaire clos de façon covalente) utilisé comme matrice pour la transcription des ARN messagers (ARNm) et de l'ARN pré-génomique du VHB. La formation et le maintien de l'ADNccc est l'élément clé qui permet au virus de persister de façon chronique dans le foie des personnes infectées. De ce fait, l'ADNccc représente une cible thérapeutique importante.

La protéine HBx : élément clé de la transcription virale

La protéine régulatrice HBx (protéine X du VHB) possède des activités pléiotropes faisant intervenir des interactions avec de multiples partenaires cellulaires nucléaires ou cytoplasmiques (pour revue voir [3]). Parmi les rôles attribués à HBx, on distingue des implications dans de nombreux processus cellulaires tels que la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose ou des mécanismes de réparation de l'ADN.

Au niveau viral, HBx est aujourd'hui reconnue comme jouant un rôle déterminant dans le maintien de l'activité transcriptionnelle de l'ADNccc. L'absence de HBx inhibe la transcription de l'ADN viral et ainsi la réplication du virus. Les données les plus récentes montrent que HBx module l'activité transcriptionnelle et les modifications épigénétiques [4] (→). Nos travaux précédents ont montré que HBx, en plus de son action sur la stimulation de la transcription du génome du VHB, permet la transcription de toutes les matrices d'ADN sous forme épisomale¹. Cette capacité de HBx est liée à son interaction avec DDB1 (DNA damage-binding protein 1) [5],

(→) Voir la Nouvelle de L. Rivière et al., m/s n° 5, mai 2016, page 455

un composant d'un complexe E3 ubiquitine ligase², qui joue un rôle crucial dans de nombreux processus cellulaires, incluant réplication, réparation de l'ADN et régulation de la chromatine. Dans ce complexe, DDB1 sert de protéine adaptatrice recrutant, directement ou indirectement, les protéines qui vont être ubiquitinées par la E3 ligase et dégradées par le protéasome [6]. Cependant la cible cellulaire de ce complexe HBx-DDB1-E3 ubiquitine ligase était jusqu'à présent inconnue.

Identification du complexe SMC5/6 comme partenaire de HBx

L'identification de la cible de HBx s'est avérée particulièrement difficile, sans doute parce que l'interaction entre HBx et cette dernière est très transitoire dans des conditions naturelles. Pour pallier ce problème, nous avons mis en place une stratégie consistant à bloquer l'ubiquitination de la cible tout en maintenant la liaison entre DDB1 et HBx [7]. Pour cela, nous avons fusionné la protéine HBx avec un mutant de DDB1, incapable de s'incorporer au complexe E3 ubiquitine ligase. Cette protéine de fusion conserve sa capacité de fixation à la cible mais celle-ci n'est plus détruite. Une purification par chromatographie d'affinité suivie d'une analyse en spectrométrie de masse a permis d'identifier cette cible. De façon remarquable, les 6 protéines composant le complexe SMC5/6 (*structural maintenance of chromosomes proteins 5/6*) ont été retrouvées associées à la protéine de fusion HBx-DDB1 : les 2 protéines SMC 5 et SMC 6 ainsi que les 4 protéines NSE (*non SMC element*) (Figure 1).

Dans des hépatocytes primaires humains infectés *in vitro* par un VHB sauvage, nous avons pu montrer que SMC5/6 est dégradé par HBx via son interaction avec le com-

plexe DDB1-E3 ubiquitine ligase. L'utilisation d'un virus muté pour l'expression de HBx montre qu'en l'absence de HBx, SMC5/6 se fixe sur l'ADN épisomal du virus bloquant sa transcription. En provoquant sa dégradation, HBx active la transcription virale et permet la réplication du VHB (Figure 2). Cette dégradation implique DDB1 (ce qui est montré par l'utilisation de siARN [*small interfering RNA*] contre DDB1) et l'E3 ubiquitine ligase (qui peut être bloquée par le MNL4924, inhibiteur de la neddylation³).

Ce phénomène ne serait pas limité au VHB mais concernerait tout l'ADN épisomal comme le suggéraient nos travaux précédents [8]. SMC5/6 se fixe sur l'ADN épisomal et réprime sa transcription. La dégradation de SMC6 par HBx, ou artificiellement par des shARN (*small hairpin RNA*), provoque la destruction du complexe et restaure la transcription de cet ADN extra-chromosomique.

L'ensemble de ces résultats montre que le VHB utilise HBx pour dégrader un facteur cellulaire limitant sa capacité répllicative et que SMC5/6 agit comme un facteur de restriction⁴. Ces mécanismes sont retrouvés pour plusieurs virus : la protéine V du paramyxovirus⁵ SV5 (*simian virus 5*) se fixe à DDB1 pour permettre la dégradation de STAT (*signal transducer and activator of transcription*) et ainsi lutter contre les réponses interférons [9] (→) ; la protéine virale X (Vpx) du virus de l'immunodéficience humaine de type 2 (VIH-2) et simienne (SIV, *simian immunodeficiency virus*) détourne un partenaire cellulaire et le complexe DDB1/E3 ubiquitine ligase pour dégrader le facteur de restriction SMADH1 (*SAM [sterile alpha motif] domain and HD domain-containing protein 1*) afin d'augmenter le pool de nucléotides

(→) Voir la Nouvelle de G. Maarifi et al., m/s n° 2 février 2016, page 141

² L'ubiquitination s'effectue en trois étapes : activation de l'ubiquitine par la formation d'une liaison thioester avec une enzyme activatrice de l'ubiquitine (E1), puis transfert de l'ubiquitine sur une enzyme de conjugaison à l'ubiquitine (E2), et enfin transfert de l'ubiquitine sur la protéine cible, catalysé par une ubiquitine ligase (E3) qui forme la liaison peptidique entre l'ubiquitine et un résidu lysine ou la méthionine aminotermine de la protéine cible.

³ Modification protéique post-traductionnelle proche de l'ubiquitination, impliquant la protéine NEDD8.

⁴ Protéine cellulaire bloquant la réplication virale.

⁵ Famille de virus à ARN simple brin et polarité négative, incluant par exemple les oreillons et la rougeole.

¹ Un épisome est une molécule d'ADN extra-chromosomique circulaire pouvant se répliquer de façon autonome.

Figure 1. Représentation schématique du complexe SMC5/6. Le complexe SMC5/6 appartient à la famille des SMC (*structural maintenance of chromosomes*). Le complexe est composé de 2 protéines SMC5 et SMC6 formant un hétérodimère. Chaque SMC contient aux extrémités N-terminale et C-terminale un domaine globulaire contenant respectivement les motifs ATPase Walker A et Walker B (des motifs à la structure tridimensionnelle hautement conservée). Ces deux régions sont reliées par une longue queue avec des motifs *coiled-coil* (superhélice). Cette région est séparée en deux par un motif en épingle à cheveu permettant le repliement de la protéine et la formation d'un domaine ATPase fonctionnel. SMC 5 et SMC 6 sont associées à 4 protéines NSE (*non SMC element*) portant des activités enzymatiques (activité E3 ubiquitine ligase et activité E3 SUMO ligase) (adapté de [12]).

disponibles et ainsi faciliter la synthèse de l'ADN viral [10] (→); en revanche, le virus de l'herpès simplex utilise sa protéine ICP0 (*infected cell polypeptide 0*), ayant sa propre activité ubiquitine ligase, pour dégrader les corps nucléaires PML (*promyelocytic leukaemia nuclear bodies*) séquestrant le virus [11].

(→) Voir la Nouvelle de H. Lahouassa et al., m/s n° 11 novembre 2012, page 909

Questions en suspens

Une première question est : quelle est la cible directe du complexe E3 ubiquitine ligase ? En effet, toutes les sous-unités du complexe SMC5/6 ont été retrouvées associées au complexe HBx/DDB1. Tout le complexe SMC5/6 semble dégradé par

la présence de HBx, mais il est connu que l'absence d'un seul de ses composants le déstabilise entièrement. Nous n'avons pas pu identifier, en l'absence d'anticorps adéquats, la protéine directement ubiquitinée par le complexe HBx/DDB1/E3 ubiquitine ligase.

Par ailleurs, quel est le rôle de SMC5/6 sur l'ADNccc ? Les mécanismes mis en jeu pour bloquer la transcription restent à élucider. SMC5/6 permet-il le recrutement de facteurs de remodelage de la chromatine entraînant des modifications post-traductionnelles des histones conduisant au blocage de l'ADN ? Ou est-ce que SMC5/6 permet de relocaliser l'ADN étranger ? Il a été montré que le complexe SMC5/6 est

colocalisé avec les corps nucléaires PML. Il est donc possible d'imaginer que SMC5/6 recrute l'ADN viral ou épisomal pour le séquestrer au niveau de ces corps nucléaires.

Une dernière interrogation subsiste quant à l'origine de HBx en début d'infection. Aucune étude, à notre connaissance, n'a montré la présence de la protéine HBx dans la particule virale. Or comment expliquer la levée de l'inhibition de la transcription de l'ADNccc en l'absence de HBx ? En effet, la synthèse de HBx nécessite la transcription de l'ADNccc, elle-même bloquée par SMC5/6. Peut-on imaginer que le transcrit de HBx échappe à l'inhibition de transcription ? Ou que le temps nécessaire au recrutement de SMC5/6 sur l'ADNccc suffise à la transcription précoce du gène X viral ? Toutes ces questions demeurent et ouvrent de nombreuses pistes de recherche.

La dégradation de SMC5/6 : quelles conséquences pour la cellule ?

Le rôle de facteur de restriction est nouveau pour le complexe SMC5/6. En effet, SMC5/6 appartient au groupe de protéines SMC (*structural maintenance of chromosomes*) au même titre que la cohésine (composée par les protéines SMC1/3) et la condensine (SMC2/4), respectivement impliquées dans la cohésion et la condensation des chromatides. Le rôle du complexe SMC5/6 n'est pas totalement défini, d'où l'absence d'un nom plus suggestif. Néanmoins, une des fonctions de SMC5/6 connue, bien que contestée, est sa participation dans les réponses aux dommages à l'ADN (DDR, pour *DNA damage response*) [12] en agissant comme plate-forme permettant le recrutement de protéines aux points de cassures de l'ADN [13]. Ceci implique que la dégradation de SMC5/6 par HBx pourrait avoir un impact sur la structure de la chromatine et influencer la DDR. Il est également connu que l'absence de SMC5/6 dans les souris est létale lors des stades précoces de développement. Les changements de

Figure 2. HBx détourne le complexe E3 ubiquitine ligase pour dégrader le facteur de restriction SMC5/6. Lors d'une infection par le virus de l'hépatite B (VHB), l'ADNccc (pour circulaire clos de façon covalente) est reconnu par le facteur de restriction SMC5/6 (*structural maintenance of chromosomes proteins 5/6*) et subit des modifications épigénétiques conduisant à l'inhibition de la transcription de l'ADN. Le VHB a mis en place un mécanisme d'échappement pour lutter contre ce phénomène. Pour cela, la protéine virale HBx (protéine X du VHB), par le biais de son interaction avec DDB1 (*DNA damage-binding protein 1*), recrute le complexe SMC5/6 au sein du complexe E3 ubiquitine ligase pour permettre l'ubiquitination et la dégradation de SMC5/6. Ainsi, l'ADNccc n'est plus inhibé (on observe des marques épigénétiques de transcription active), la transcription des ARN viraux et de l'ARN pré-génomique (ARN pg) est possible et permet la sécrétion de nouveaux virions. En gris apparaissent les points qui restent à éclaircir à la suite de notre étude, à savoir : quel est le lien entre le complexe SMC5/6 et la présence des modifications épigénétiques sur l'ADNccc ? La liaison entre ADN viral et SMC5/6 engendre-t-elle la séquestration de l'ADNccc dans des corps nucléaires PML (*promyelocytic leukaemia nuclear bodies*) ? Quelle est l'origine de HBx ? Vient-il de la particule virale ou la transcription du gène x échappe-t-elle à l'inhibition ? Et, enfin, quelles sont les conséquences de la dégradation de SMC5/6 sur la survie et l'intégrité des cellules ? U : ubiquitine.

chromatine associés et leurs impacts sur le DDR pourraient permettre une meilleure compréhension de l'activité pro-oncogénique de HBx et de la transformation cellulaire engendrée par le virus de l'hépatite B. Ceci pourrait ouvrir, à terme, une nouvelle voie de traitement pour les CHC avec une telle étiologie. ♦

A new restriction factor against HBV infection: the SMC5/6 complex

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

NOTE AJOUTÉE AUX ÉPREUVES

Des résultats publiés très récemment confirment nos observations et l'importance de la dégradation du complexe SMC5/6 par HBx pour la réplication du VHB [14].

RÉFÉRENCES

1. Buendia MA, Neuveut C. Hepatocellular carcinoma. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015; 5 : a021444.
2. Revill P, Testoni B, Locarnini S, Zoulim F. Global strategies are required to cure and eliminate HBV infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2016; 13 : 239-48.
3. Benhenda S, Cougot D, Buendia MA, Neuveut C. Hepatitis B virus X protein molecular functions and its role in virus life cycle and pathogenesis. *Adv Cancer Res* 2009; 103 : 75-109.
4. Rivière L, Gérossier L, Hantz O, Neuveut C. Virus de l'hépatite B et chromatine - Une protéine virale, HBx, interfère avec la machinerie épigénétique de la cellule. *Med Sci (Paris)* 2016; 32 : 455-8.
5. Li T, Robert El, van Bruegel PC, et al. A promiscuous alpha-helical motif anchors viral hijackers and substrate receptors to the CUL4-DDB1 ubiquitin ligase machinery. *Nat Struct Mol Biol* 2010; 17 : 105-11.
6. Iovine B, Iannella ML, Bevilacqua MA. Damage-specific DNA binding protein 1 (DDB1): a protein with a wide range of functions. *Int J Biochem Cell Biol* 2011; 43 : 1664-7.
7. Decorsiere A, Mueller H, van Bruegel PC, et al. Hepatitis B virus X protein identifies the SMC5/6 complex as a host restriction factor. *Nature* 2016; 531 : 386-9.

RÉFÉRENCES

8. van Breugel PC, Robert EI, Mueller H, et al. Hepatitis B virus X protein stimulates gene expression selectively from extrachromosomal DNA templates. *Hepatology* 2012 ; 56 : 2116-24.
9. Maarifi G, Dianoux L, Nisole S, Chelbi-Alix MK. Les paralogues de SUMO et la réponse interféron. *Med Sci (Paris)* 2016 ; 32 : 141-3.
10. Lahouassa H, Dragin L, Transy C, Margottin-Goguet F. SAMHD1 prive le VIH des nucléotides essentiels à la synthèse d'ADN viral. *Med Sci (Paris)* 2012 ; 28 : 909-10.
11. Calistri A, Munegato D, Carli I, et al. The ubiquitin-conjugating system: multiple roles in viral replication and infection. *Cells* 2014 ; 3 : 386-417.
12. Potts PR. The Yin and Yang of the MMS21-SMC5/6 SUMO ligase complex in homologous recombination. *DNA repair* 2009 ; 8 : 499-506.
13. Lukas J, Lukas C, Bartek J. More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. *Nat Cell Biol* 2011 ; 13 : 1161-9.
14. Murphy CM, Xu Y2, Li F1, et al. Hepatitis B virus X protein promotes degradation of SMC5/6 to enhance HBV replication. *Cell Rep* 2016 ; 16 : 2846-54.

NOUVELLE

Un modèle murin pour une infection chronique méconnue : l'hépatite E !

Hélène Gilgenkrantz¹, Jérôme Gouttenoire², Vincent Mallet³

Un virus oublié, une maladie émergente...

L'hépatite E est reconnue comme la première cause d'hépatite à transmission entérique dans le monde [1] (→).

Si la première épidémie a été décrite dans les

(→) Voir la Nouvelle de J. Izopet et N. Kamar, *m/s* n° 12, décembre 2008, page 1023

années 1950 en Inde, le virus n'a été identifié qu'en 1983 par un chercheur soviétique, Mikhaïl Balayan, et le génome cloné quelques années plus tard, en 1990. Cette infection oubliée ne fait pourtant parler à nouveau d'elle que depuis quelques années dans les meilleurs journaux scientifiques, notamment depuis que l'on connaît sa prévalence en France et sa gravité chez les individus fragiles.

Le virus de l'hépatite E (VHE) appartient à la famille *Herpesviridae*. C'est un petit virus non enveloppé qui possède un génome à ARN simple brin à polarité positive, comportant 3 phases ouvertes de lecture (ORF, *open reading frame*) qui conduisent à la traduction de seulement 3 protéines virales : ORF1, 2 et 3.

Grâce à l'avènement des puissantes techniques de séquençage à haut-rendement, le VHE a pu être identifié dans de nombreuses espèces animales. La diversité

d'animaux susceptibles d'être infectés par ce virus constitue un réservoir potentiel de transmission zoonotique à l'homme. Actuellement, on connaît quatre génotypes majeurs : les VHE1 et 2 sont restreints à l'homme et sont endémiques dans les régions en voie de développement, alors que les VHE3 et 4 peuvent également infecter certains mammifères et sont surtout présents dans les pays industrialisés. En France, le génotype VHE3 est particulièrement représenté avec une nette prévalence dans le sud toulousain, sans que la raison en soit actuellement comprise. L'origine de la majorité des infections serait essentiellement l'ingestion d'eau contaminée dans les régions endémiques et la consommation de viande (porc, gibier) insuffisamment cuite dans les pays industrialisés. De nouveaux modes de contamination ne cessent néanmoins d'être rapportés. La transfusion sanguine par exemple, effectuée en général chez des individus fragiles, est un mode de transmission qui a été récemment mis en exergue dans plusieurs publications [2]. Un vaccin très efficace a été développé à partir de la protéine recombinante de la capsid virale mais son utilisation et sa commercialisation restent cependant restreintes à l'Asie.

¹ Institut Cochin, Inserm U1016, CNRS UMR 8104, Université Paris-Descartes, 24, rue du faubourg saint-Jacques, 75005 Paris, France ;

² Division de gastro-entérologie et d'hépatologie, centre hospitalier universitaire vaudois, université de Lausanne, Suisse ;

³ Université Paris Descartes, assistance publique-hôpitaux de Paris, groupe hospitalier Cochin Port Royal, service d'hépatologie, Inserm U1223, Institut Pasteur, Paris, France. helene.gilgenkrantz@inserm.fr

Dans la majorité des cas, l'infection par le VHE est asymptomatique et spontanément résolutive. Cependant, l'infection par VHE1, chez la femme enceinte, peut avoir des conséquences dramatiques, avec un taux de mortalité atteignant 25 %. C'est en 2008 que le VHE fait son entrée parmi les causes de cirrhose, au même titre que les hépatites B et C [3]. Cependant, la persistance du virus, définie par une virémie enregistrée au-delà de 6 mois, n'est observée qu'en cas d'immunosuppression, notamment chez des patients traités par chimiothérapie, ou infectés par le VIH (virus de l'immuno-déficience humaine) présentant de faibles taux de lymphocytes CD4 ou, plus couramment, chez les patients transplantés d'organes (rein, cœur, poumon, foie). L'histoire naturelle de l'hépatite chronique E se caractérise par une progression rapide vers la cirrhose et ses complications, et ce de façon beaucoup plus rapide qu'au cours des hépatites chroniques B et C. Les personnes âgées, ou avec une maladie du foie sous-jacente, sont à risque d'insuffisance hépatite sévère. Des atteintes extrahépatiques, dont le mécanisme sous-jacent n'est pour l'instant pas compris, sont également rapportées.