



A new immune competent mouse model for the study of hepatitis D virus infection

LIENS D'INTÉRÊT

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

RÉFÉRENCES

- Alfaiaite D, Dény P, Durantel D. Hepatitis delta virus: From biological and medical aspects to current and investigational therapeutic options. *Antiviral Res* 2015 ; 122 : 112-29.
- Bordier BB, Ohkanda J, Liu P, et al. In vivo antiviral efficacy of prenylation inhibitors against hepatitis delta virus. *J Clin Invest* 2003 ; 112 : 407-14.
- Aldabe R, Suárez-Amarán L, Usai C, et al. Animal models of chronic hepatitis delta virus infection host-virus immunologic interactions. *Pathog Basel Switz* 2015 ; 4 : 46-65.
- Gilgenkrantz H. Des souris humanisées pour l'étude du virus de l'hépatite C. *Med. Sci (Paris)* 2011 ; 27 : 587-9.
- Dandri M, Lütgehetmann M. Mouse models of hepatitis B and delta virus infection. *J. Immunol. Methods* 2014 ; 410 : 39-49.
- Urban S, Bartenschlager R, Kubitz R, et al. Strategies to inhibit entry of HBV and HDV into hepatocytes. *Gastroenterology* 2014 ; 147 : 48-64.
- Yan H, Zhong G, Xu G, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife* 2012 ; 3.
- He W, Ren B, Mao F, et al. Hepatitis D Virus Infection of Mice Expressing Human Sodium Taurocholate Co-transporting Polypeptide. *PLoS Pathog* 2015 ; 11 : e1004840.
- Yan H, Peng B, He W, et al. Molecular determinants of hepatitis B and D virus entry restriction in mouse sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *J Virol* 2013 ; 87 : 7977-91.
- Ni Y, Lempp FA, Mehrle S, et al. Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes. *Gastroenterology* 2014 ; 146 : 1070-83.
- He W, Cao Z, Mao F, et al. Modification of three amino acids in sodium taurocholate cotransporting polypeptide renders mice susceptible to infection with hepatitis D virus *in vivo*. *J Virol* 2016 ; 90 : 8866-74.
- Lempp FA, Mutz P, Lipps C, et al. Evidence that hepatitis B virus replication in mouse cells is limited by the lack of a host cell dependency factor. *J Hepatol* 2016 ; 64 : 556-64.

NOUVELLE

Mise en évidence de la physiologie rythmique du foie par protéomique nucléaire

Daniel Mauvoisin^{1,2}, Frédéric Gachon^{1,3}

¹ Diabetes and circadian rhythms

department, Nestlé institute of health sciences, CH-1015 Lausanne, Suisse ;

² Institute of bioengineering, School of life sciences, École polytechnique fédérale de Lausanne, CH-1015 Lausanne, Suisse ;

³ School of life sciences, École polytechnique fédérale de Lausanne, CH-1015 Lausanne, Suisse.

frederic.gachon@rd.nestle.com

Les balbutiements de la protéomique circadienne

Le rôle de l'horloge circadienne dans la régulation des rythmes d'expression des gènes a été intensivement étudié au niveau transcriptionnel [1] (→). Cependant, jusqu'à récemment, nous n'avions que très

(→) Voir la Synthèse de H. Duez et al., *m/s* n° 8-9, août-septembre 2013, page 772

peu d'informations concernant la régulation rythmique au niveau traductionnel et son impact sur l'accumulation des protéines. Si de nombreux travaux suggéraient que des mécanismes post-transcriptionnels contribuaient à la génération de rythmes circadiens au niveau protéique [2], ce n'est que récemment qu'une régulation de la traduction a été démontrée [3, 4]. Des études pionnières, utilisant l'électrophorèse en deux dimensions, avaient permis de quantifier quelques dizaines de protéines rythmiques au niveau hépatique, dont une grande partie était codée par des ARN messagers (ARNm) non rythmiques, soulignant l'implication

de mécanismes post-transcriptionnels dans leur régulation [5].

La protéomique circadienne à grande échelle

Afin d'améliorer la résolution de ces études protéomiques et pour découvrir de nouvelles fonctions biologiques régulées par l'horloge biologique ou les rythmes alimentaires, nous avons utilisé une technique de spectrométrie de masse quantitative à haute résolution incluant un marquage *in vivo* par des isotopes non radioactifs (SILAC, *stable isotope labeling with amino acids in cell culture*) [6] et évalué le profil protéique hépatique journalier chez la souris. Nous avons ainsi quantifié pas moins de 5 000 protéines parmi lesquelles 6 % présentaient un profil d'accumulation rythmique. En comparant les rythmes d'accumulation des ARNm correspondants à ce protéome rythmique, nous avons mis en évidence que seule la moitié de celui-ci était effectivement codée par des ARNm rythmiques. L'analyse

ontologique de ce premier groupe de protéines révèle que celui-ci est impliqué dans les fonctions du foie, comme le métabolisme lipidique (en phase diurne) ou comme celui du glucose et des xénotobiotiques (en phase nocturne). L'autre moitié du protéome rythmique codé par des ARNm non rythmiques est fortement enrichie en protéines qui sont sécrétées. Ce groupe inclut, notamment, l'albumine et les serpinines¹, qui présentent un rythme d'accumulation synchrone dans le plasma. Le rythme de ce groupe de protéines persiste chez les souris déficientes pour les gènes régulant l'horloge circadienne et nourries uniquement en phase nocturne. Il disparaît pendant le jeûne. Cela suggère que des signaux d'entraînement reliés à l'alimentation influencent le rythme d'expression de ces protéines et plus généralement des facteurs circulants dans le plasma [7].

¹ Superfamille de protéines présentant une activité inhibitrice de protéases.

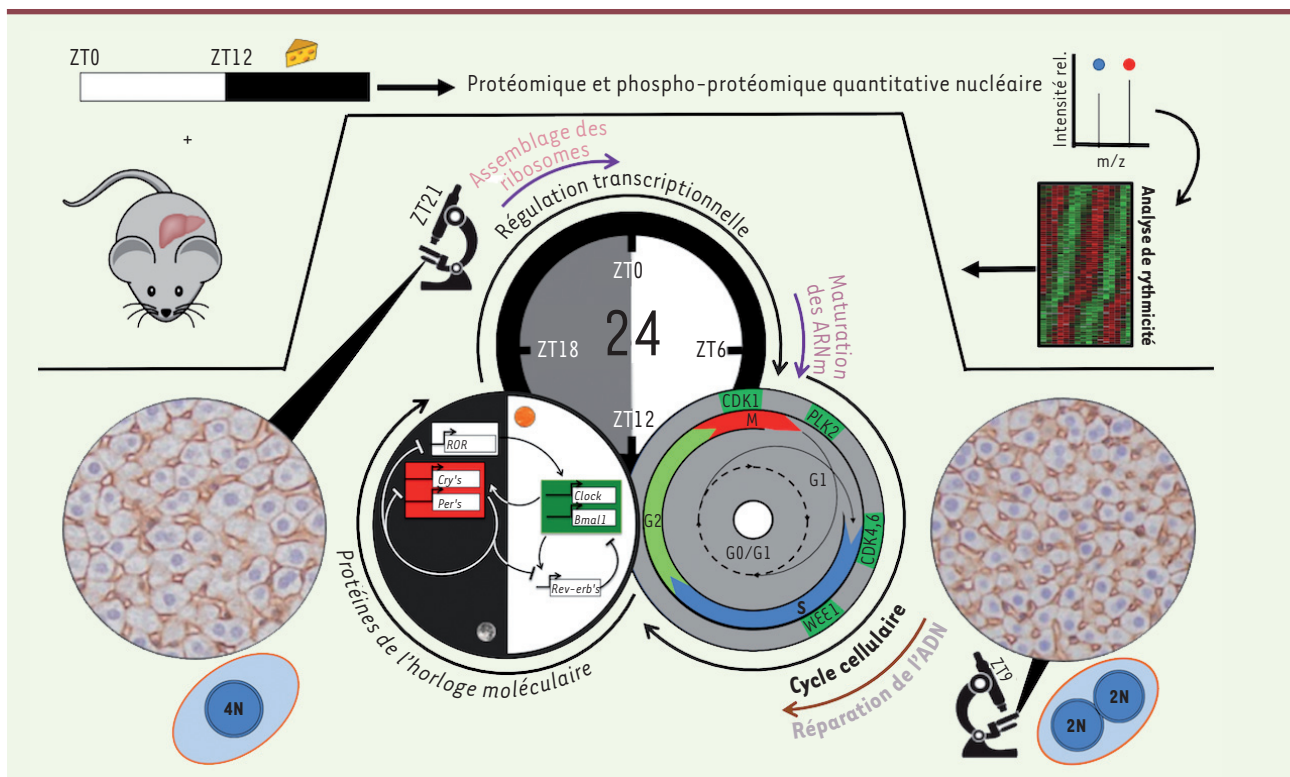


Figure 1. Orchestration de la physiologie rythmique du foie mise en évidence par protéomique nucléaire quantitative. La combinaison de l'analyse quantitative et temporelle du protéome et du phosphoprotéome nucléaire *in vivo* a permis de mettre en évidence la rythmicité de nombreux processus cellulaires fondamentaux tels que la régulation transcriptionnelle, l'assemblage des ribosomes et la réparation de l'ADN. Les cycles cellulaire et diurne (imagés en noir et blanc) semblent alignés et la polyploïdie rythmique que nous observons serait une conséquence de ce lien. La quantification de l'intensité relative des différents isotopes est symbolisée en haut à droite (m/z représente le rapport de la masse [m] sur la charge [Z]). À la suite de la quantification du protéome en fonction du temps, sa rythmicité est ensuite évaluée (symbolisée par la carte thermique). Les gènes codants les protéines de l'horloge moléculaire quantifiées dans [9] sont indiqués. Cry's : *cryptochrome1* et *cryptochrome2* ; Per's : *period1* et *period2* ; Clock : *circadian locomotor output cycles kaput* ; Bmal1 : *brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein-1* ; Rev-erbs : Rev-erb- α ou Nr1d1 : *nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1* ; Rev-erb- β ou Nr1d2 : *nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2* ; ROR α/γ : *RAR-related orphan receptor alpha/ gamma*. Les protéines du contrôle du cycle cellulaire sont les kinases WEE1 et *polo-kinase -2* (PLK2) et les kinases dépendantes des cyclines ou CDK1, 4, 6. ZT : *zeitgeber time* ou temps donné.

L'avènement de la protéomique circadienne à l'échelle subcellulaire

L'analyse d'extraits protéiques provenant de cellules entières reste toujours difficile malgré les progrès technologiques récents. La quantification des protéines faiblement exprimées, comme les facteurs de transcription, reste complexe. Pour contourner cet inconvénient, nous avons effectué une analyse de protéomique et de phosphoprotéomique² quantitative sur des noyaux provenant d'hépatocytes purifiés. Une approche similaire a été récemment utilisée pour

les mitochondries [8]. Nous avons combiné l'approche *in vivo* SILAC précédemment utilisée [7] et l'enrichissement de noyaux, pour quantifier plus de 4 000 protéines nucléaires. Le taux de détection des protéines nucléaires du foie est alors sans précédent, puisque 70 % du protéome nucléaire connu selon UNIPROT³ est représenté dans nos données, ainsi que 90 % des composants des compartiments nucléaires connus. Une analyse de rythmicité très sélective (présentant un taux inférieur à 5 % de faux positifs – dont l'expression est faussement attribué au rythme) de ce protéome

nucléaire révèle qu'environ 10 % des protéines présentent une accumulation rythmique. Cependant, ce taux de protéines rythmiques atteint 45 % dès lors que nous utilisons les mêmes critères de sélection que ceux de l'étude précédente [7], évoquant une régulation diurne importante au niveau nucléaire. Ces protéines rythmiques présentent des maximums d'accumulation en fin de journée et de nuit. En comparant les profils d'accumulation des ARNm correspondant à ce protéome nucléaire rythmique, on s'aperçoit que seulement le quart de ces protéines est codé par des ARNm rythmiques, suggérant une importante régulation post-transcriptionnelle, voire post-traductionnelle [9].

² Phosphoprotéomique : identification et analyse des protéines phosphorylées.

³ Base de données de séquences de protéines.



Les complexes protéiques présentent des accumulations nucléaires rythmiques et mettent en évidence la coordination temporelle de processus cellulaires fondamentaux

La plupart des protéines nucléaires détectées appartiennent à des complexes protéiques. Beaucoup de sous-unités de complexes connus, rythmiques ou non, présentent en effet des rythmes d'accumulation synchrones dans le noyau. Il est donc probable que la régulation diurne du transport nucléaire de ces complexes soit un élément important de la régulation du protéome nucléaire rythmique. La rythmicité de ces complexes a été décomposée en valeurs singulières. Le résultat de cette analyse montre que les complexes exprimés le jour sont plutôt impliqués dans la réparation de l'ADN et la régulation transcriptionnelle, tandis que les complexes exprimés de nuit sont impliqués dans la régulation de l'organisation du cytosquelette, du transport protéique et de la protéolyse. Ainsi, en accord avec des travaux précédents portant notamment sur la synthèse rythmique des protéines et des ARN ribosomiaux (ARNr) [3, 4], nous avons montré que la majorité des protéines impliquées dans les différentes étapes de la biogenèse des ribosomes s'accumulait de façon séquentielle. Celles-ci représentent environ 20 % du protéome nucléaire rythmique. Ces résultats constituent un exemple supplémentaire du rôle fondamental de l'horloge biologique dans la régulation temporelle de processus biologiques énergivores, même au niveau nucléaire [9].

Phosphoprotéome rythmique et activités des protéine-kinases associées

Afin d'obtenir plus d'informations sur la dynamique du protéome diurne, nous avons également analysé sa régulation au niveau post-traductionnel. Nous avons ainsi évalué le phosphoprotéome rythmique et analysé les activités kinases associées. Nous avons quantifié près de

1 500 sites phosphorylés, dont 10 % présentaient un profil rythmique. Deux tiers de ces sites étaient situés sur des protéines nucléaires non rythmiques et montraient une répartition d'accumulation en fin de journée et de nuit. Ces données nous ont permis de déduire la rythmicité de 39 motifs consensus de kinases, dont une grande partie est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire [9].

Orchestration rythmique de la transcription nucléaire

Parmi les protéines et les motifs phosphorylés rythmiques nucléaires, nous avons identifié de nombreux facteurs de transcription. Nos données montrent, en effet, que 99 facteurs et 80 co-régulateurs de transcription nucléaires sont rythmiques. Parmi ceux-ci, 16 facteurs et 17 co-régulateurs de transcription conservent leur rythme chez des souris dépourvues d'horloge circadienne. Ils sont donc principalement régulés par des signaux d'entraînement indépendants de l'horloge moléculaire, tels que le rythme alimentaire [9], comme c'est le cas pour la protéine SREBP1 (*sterol regulatory element binding protein 1*) impliquée dans la régulation du métabolisme des lipides.

La polypléidie hépatique orchestrée de manière rythmique

Les différentes analyses réalisées ont montré l'existence d'événements qui sont relatifs au cycle cellulaire comme l'activité de nombreuses kinases et de facteurs de transcription, liés au cycle cellulaire. Cela est en accord avec des travaux précédents portant sur le lien entre le cycle cellulaire et l'horloge circadienne [10]. Ainsi, il semblerait que les cycles cellulaire et circadien soient alignés, bien que le foie soit un organe principalement quiescent. Le foie étant un tissu sujet à la polypléidie [11], nous avons examiné si un lien pouvait éventuellement exister entre le cycle circadien et la polypléidie. Nous avons donc analysé la quantité d'ADN présente dans les noyaux et observé une

proportion anti-phasique des noyaux diploïdes, comparés aux noyaux tétraploïdes. Indépendamment, nous avons également évalué, par analyse de coupes histologiques, la proportion des différentes populations hépatocytaires. Nous avons constaté que la proportion des hépatocytes binucléés diploïdes (2 x 2N) est anti-phasique par rapport à celle des hépatocytes mononucléés tétraploïdes (1 x 4N). Cette polypléidie rythmique pourrait donc être la conséquence d'un lien entre les cycles cellulaire et diurne [9]. Ces différents phénomènes sont résumés dans la Figure 1.

Conclusion

La combinaison de l'analyse quantitative et temporelle du protéome et du phosphoprotéome nucléaires *in vivo* constitue une approche puissante pour découvrir de nouvelles fonctions biologiques rythmiquement orchestrées et qui sont non identifiables sur des extraits cellulaires totaux. Les données obtenues représentent une étape importante vers l'identification de nouvelles fonctions biologiques orchestrées par l'horloge circadienne et/ou les rythmes alimentaires. La purification d'organelles associée à la protéomique quantitative *in vivo* est une nouvelle voie prometteuse, non seulement pour la biologie circadienne, mais également pour l'étude de nombreuses fonctions dans divers modèles et systèmes dont les mécanismes moléculaires sont encore peu et mal décrits. ♦

Characterization of rhythmic liver physiology by nuclear proteomics

LIENS D'INTÉRÊT

Daniel Mauvoisin et Frédéric Gachon sont employés de Nestlé Institute of Health Sciences SA.

RÉFÉRENCES

1. Duez H, Sebti Y, Staels B. Horloges circadiennes et métabolisme : intégration des signaux métaboliques et environnementaux. *Med Sci (Paris)* 2013 ; 29 : 772-7.
2. Doherty CJ, Kay SA. Circadian control of global gene expression patterns. *Annu Rev Genet* 2010 ; 44 : 419-44.
3. Atger F, Gobet C, Marquis J, et al. Circadian and feeding rhythms differentially affect rhythmic mRNA transcription and translation in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015 ; 112 : E6579-E88.

RÉFÉRENCES

- Jouffe C, Cretenet G, Symul L, *et al.* The circadian clock coordinates ribosome biogenesis. *PLoS Biol* 2013 ; 11 : e1001455.
- Reddy AB, Karp NA, Maywood ES, *et al.* Circadian orchestration of the hepatic proteome. *Curr Biol* 2006 ; 16 : 1107-15.
- Krüger M, Moser M, Ussar S, *et al.* SILAC Mouse for quantitative proteomics uncovers kindlin-3 as an essential factor for red blood cell function. *Cell* 2008 ; 134 : 353-64.
- Mauvoisin D, Wang J, Jouffe C, *et al.* Circadian clock-dependent and -independent rhythmic proteomes implement distinct diurnal functions in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014 ; 111 : 167-72.
- Neufeld-Cohen A, Robles MS, Aviram R, *et al.* Circadian control of oscillations in mitochondrial rate-limiting enzymes and nutrient utilization by PERIOD proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016 ; 113 : E1673-E82.
- Wang J, Mauvoisin D, Martin E, *et al.* Nuclear proteomics uncovers diurnal regulatory landscapes in mouse liver. *Cell Metab* 2017 ; 25 : 102-17.
- Matsuo T, Yamaguchi S, Mitsui S, *et al.* Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division *in vivo*. *Science* 2003 ; 302 : 255-9.
- Gentric G, Desdouets C. Polyploidization in liver tissue. *Am J Pathol* 2014 ; 184 : 322-31.

NOUVELLE

Des sondes fluorescentes hybrides pour l'imagerie « à la demande » des protéines cellulaires

Ludovic Jullien^{1,2}, Arnaud Gautier^{1,2}

¹École Normale Supérieure, PSL Research University, UPMC Univ Paris 06, CNRS, Département de Chimie, PASTEUR, 24, rue Lhomond, 75005 Paris, France.

²Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, ENS, CNRS, PASTEUR, 75005 Paris, France.

ludovic.jullien@ens.fr

arnaud.gautier@ens.fr

Les systèmes vivants sont régis par un jeu d'événements biologiques dynamiques finement orchestrés de l'échelle moléculaire à celle de l'organisme entier. Comprendre les mécanismes complexes contrôlant les cellules et les organismes nécessite des méthodes d'imagerie efficaces pour observer et quantifier les biomolécules en temps réel avec une grande résolution spatiotemporelle. L'imagerie biologique a bénéficié ces dernières décennies d'interactions synergiques entre l'instrumentation physique et l'élaboration de sondes moléculaires permettant de visualiser les biomolécules en action. La microscopie de fluorescence est de nos jours la méthode de choix pour réaliser des images des systèmes vivants. Permettant d'observer les constituants cellulaires et tissulaires avec une très grande sensibilité et une très haute résolution spatiale et temporelle, cette technique a été indispensable à notre compréhension actuelle des processus biologiques.

La découverte de la protéine fluorescente verte GFP (*green fluorescent protein*) dans la méduse *Aequorea victoria*,

pour laquelle les chercheurs Osamu Shimomura, Martin Chalfie et Roger Y. Tsien ont reçu le prix Nobel de chimie en 2008, a révolutionné l'imagerie biomoléculaire [1] (→). Pour la première fois, il était possible d'étudier la dynamique des protéines dans des systèmes vivants simplement en fusionnant génétiquement la séquence codant la protéine GFP à celle d'une protéine d'intérêt. La découverte, puis l'ingénierie de nouvelles protéines autofluorescentes, ont facilité le développement de l'imagerie multi-couleur, la conception de biosenseurs, et ont contribué à l'essor de nouvelles techniques de microscopie comme la microscopie de super-résolution [2,3].

Un nombre grandissant d'études a cependant révélé que les protéines auto-fluorescentes n'étaient pas toujours des sondes optimales. Leur taille et leur tendance naturelle à oligomériser conduisent parfois à des protéines de fusion non fonctionnelles. De plus, la

maturation de leur chromophore nécessite la présence de dioxygène empêchant leur utilisation en conditions anaérobiques. Ce processus de maturation est en outre un mécanisme relativement lent (pouvant durer de quelques dizaines de minutes à quelques heures selon les protéines), limitant la résolution temporelle de certaines expériences [4]. Enfin, certaines protéines fluorescentes possèdent des propriétés photophysiques/photochimiques inattendues qui compliquent l'interprétation quantitative des expériences [4].

L'importance des protéines fluorescentes pour l'imagerie biologique a motivé les chimistes et les biologistes à développer des stratégies alternatives pour rendre fluorescentes les protéines. Une approche qui a été explorée consiste à utiliser des chromophores fluorogéniques (appelés également fluorogènes) qui sont non-fluorescents s'ils sont libres en solution, mais le deviennent lorsqu'ils interagissent avec une cible donnée [5]. Des étiquettes protéiques, capables d'interagir avec ces fluorogènes et d'activer leur fluorescence,

(→) Voir la Nouvelle de H. Pasquier, *m/s* n° 11, novembre 2008, page 985