

Rôle de l'horloge biologique dans l'établissement des rythmes protéiques au niveau hépatique.

Daniel Mauvoisin Ph.D

Les rythmes circadiens

Les rythmes biologiques sont un domaine de choix dans l'étude des systèmes biologiques et se rencontrent à tous les niveaux (Goldbeter, Gérard et al. 2010). Dans ce contexte, les rythmes circadiens constituent un système acquis durant l'évolution par les organismes vivants, leur permettant d'anticiper les variations diurnes des différentes sources énergétiques telles

que la lumière et la chaleur indispensable à la vie. L'horloge circadienne, du latin «circa-diem» qui signifie «environ un jour» influence grandement la physiologie et le comportement animal. Des perturbations au niveau de cette horloge ont une influence sur l'apparition de certains désordres métaboliques (Bass 2012, Duez, Sebti et al. 2013).

Un rythme biologique est caractérisé par

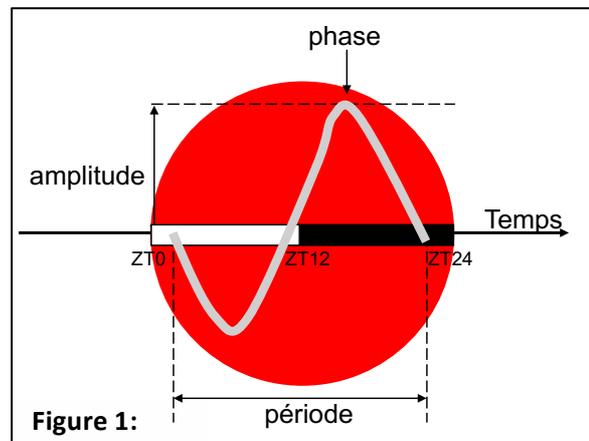
-sa **période** = temps pour effectuer un cycle

-sa **phase** = temps où le niveau atteint son maximum

-son **amplitude** = différence entre un extrême du cycle et le milieu moyen

ZT : Zeitgeber Time : littéralement minuteur ou donneur de temps. Les horloges biologiques reçoivent des signaux exogènes qui contrôlent leur fonctionnement. Dans le cadre de nos expériences, la lumière est le principal synchroniseur (Zeitgeber) et sur un cycle de lumière/nuit de 12h/12h, ZT0 indique l'aube et ZT12 le crépuscule (Figure

1). Notons que d'autres facteurs comme la prise alimentaire sont aussi de puissants Zeitgeber pour les organes périphériques comme le foie.



Organisation de l'horloge biologique et horloge moléculaire chez les mammifères

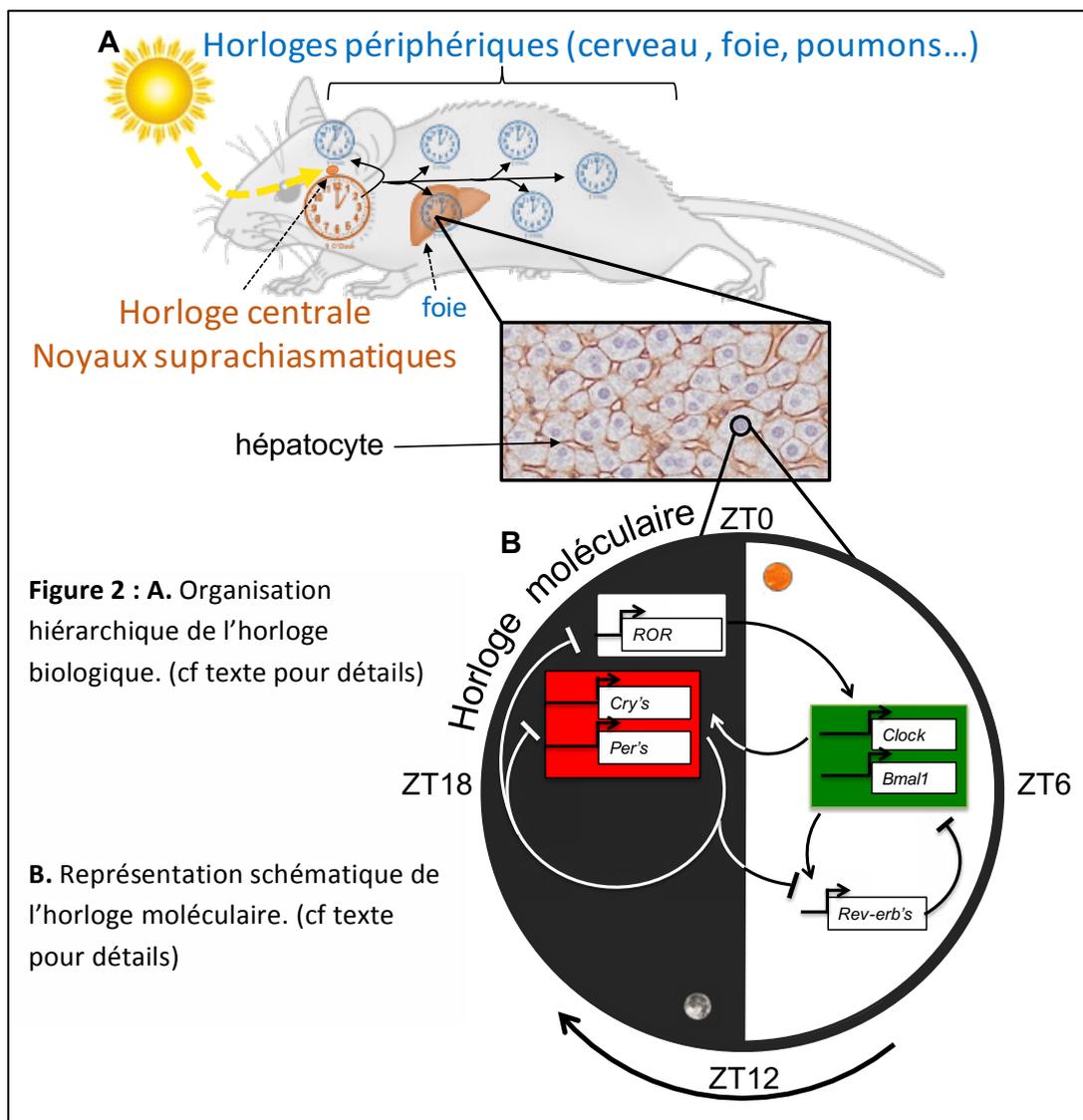
Sur la base d'expériences d'ablation des [noyaux suprachiasmatiques](#) chez l'animal, l'horloge biologique était considérée comme centrale (*i.e* résidant uniquement dans les noyaux suprachiasmatiques) (Figure 2.A). Cependant, il apparaît que l'horloge biologique est présente dans chaque cellule de l'organisme (Balsalobre, Damiola et al. 1998) et qu'elle est constituée au niveau moléculaire de deux

boucles principales de rétroaction transcriptionnelle et traductionnelle induisant un rythme d'expression de gènes d'environ 24h. En effet, le fonctionnement de l'horloge moléculaire des mammifères repose sur des activateurs stimulant l'expression de leurs propres répresseurs. La charpente de cette horloge repose sur les protéines BMAL1 (brain and muscle Arnt-like protein-1) et CLOCK (circadian locomotor

output cycles kaput) qui forment un dimère et activent l'expression de PER (Période) et CRY (Cryptochrome). Ces deux protéines PER et CRY forment aussi un dimère et sont responsables de l'inhibition de l'activité des deux premières. BMAL1 et CLOCK activent aussi l'expression d'une boucle de régulation additionnelle constituée des protéines REV-ERB et ROR qui respectivement réprime et active l'expression du gène *Bmal1* renforçant ainsi la stabilité et la robusticité de l'horloge (Figure 2.B).

Certes, chaque cellule constituant les organes périphériques présente sa propre horloge moléculaire, néanmoins l'horloge biologique est organisée de

façon hiérarchique au niveau de l'organisme (Figure 2.A): En effet, l'horloge centrale, au niveau des noyaux suprachiasmatiques, est régulée principalement par la lumière et coordonne l'action des horloges périphériques, comme celle du foie, via des signaux systémiques comme les glucocorticoïdes (Balsalobre, Brown et al. 2000) mais aussi via d'autres facteurs indirects influencés, par exemple, par le rythme alimentaire (Damiola, Le Minh et al. 2000, Kornmann 2007, Mohawk, Green et al. 2012). Ainsi, les oscillations journalières de l'expression des gènes contrôlés par l'horloge circadienne déterminent la physiologie rythmique chez la plupart des organismes vivants.



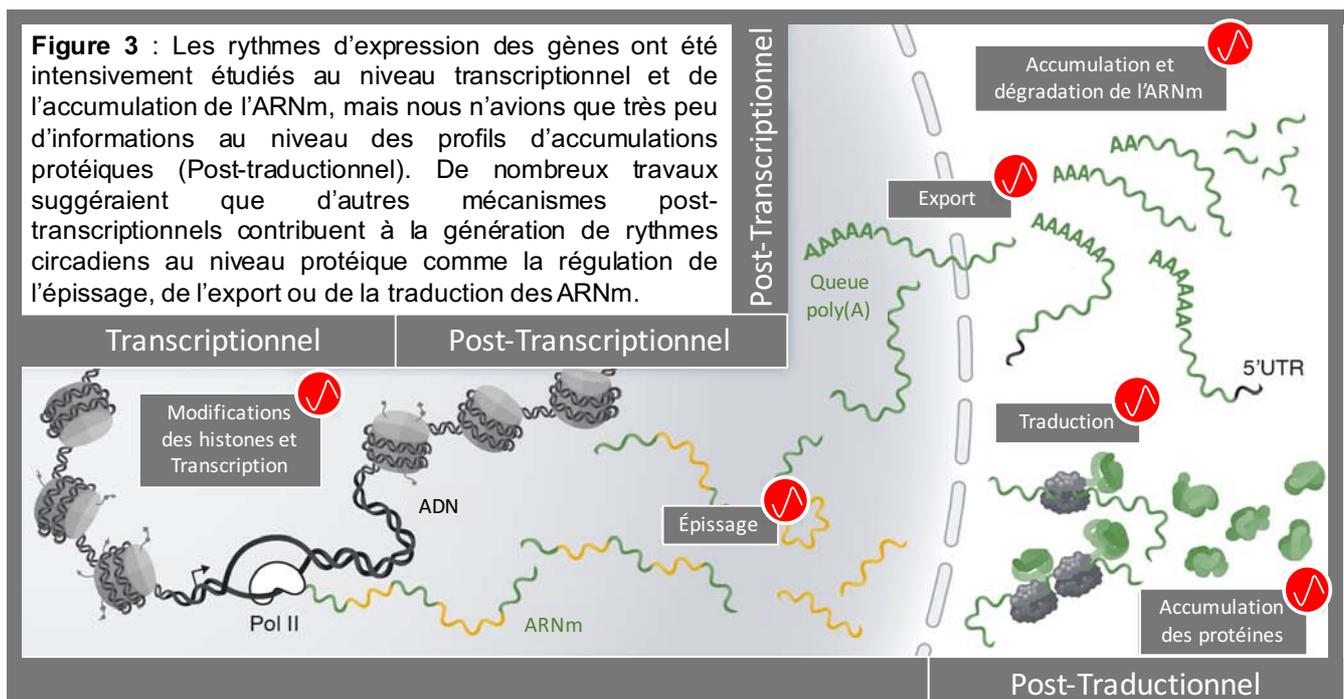
Rôle de l'horloge biologique au niveau de l'expression génique hépatique

Le foie est, après la peau, l'organe le plus grand de notre corps. Ses fonctions vitales, comme la régulation du niveau de glucose circulant ou encore la détoxification, sont remplies par les hépatocytes, mais il est aussi constitué de cellules non-parenchymales incluant notamment les cellules de Kupffer et les cellules endothéliales (Baratta, Ngo et al. 2009). Dans le domaine de la chronobiologie, de part sa position physiologique, le foie a constitué et constitue toujours un terrain fertile pour une multitude d'études.

Avant d'entreprendre nos travaux sur les rythmes d'expression des gènes au niveau de la protéine, les rythmes d'expression géniques ont été intensivement étudiés au niveau [transcriptionnel](#) et de l'accumulation de [l'ARNm](#), mais nous n'avons que très peu d'informations au niveau des profils d'accumulations des [protéines](#) (Doherty and Kay 2010). De nombreux travaux suggéraient fortement que des mécanismes transcriptionnels (Koike,

Yoo et al. 2012, Le Martelot, Canella et al. 2012) et post-transcriptionnels (Kojima, Shingle et al. 2011), notamment au niveau de la [traduction](#) de l'ARNm en protéine, contribuaient à la génération de rythmes circadiens au niveau protéique (Kim, Woo et al. 2007, Kojima, Sher-Chen et al. 2012, Jouffe, Cretenet et al. 2013, Atger, Gobet et al. 2015, Janich, Arpat et al. 2015) (Figure 3 adaptée de (Mermet, Yeung et al. 2016)).

De façon intéressante, deux études utilisant la technologie de l'électrophorèse 2D avaient permis la quantification de rythmes d'expression protéique au niveau hépatique et des noyaux suprachiasmatiques et de conclure que 10 à 20% des protéines identifiées s'accumulaient de façon rythmique. Beaucoup de ces protéines étaient encodées par des ARNm non rythmiques soulignant l'implication de mécanismes post-transcriptionnels dans la régulation de ces protéomes identifiés (Reddy, Karp et al. 2006, Deery, Maywood et al. 2009).



Quantification du protéome hépatique total « autour de l'horloge »

Pour pouvoir aller plus loin au niveau de la caractérisation de nouvelles fonctions biologiques régulées par l'horloge biologique, nous avons besoin d'augmenter le nombre de protéines quantifiées. Afin d'obtenir une meilleure résolution, nous avons utilisé une technique de pointe en matière de protéomique quantitative : le SILAC (Stable isotope labeling with amino acids in cell culture) *in-vivo* couplé à la spectrométrie de masse (Emadali and Gallagher-Gambarelli 2009). Grâce à cette approche nous avons quantifié pas moins de 5800 protéines tout au long du jour et de la nuit chez la souris. Nos analyses au niveau du rythme d'expression de ces protéines ont révélé que 6% du protéome hépatique est rythmique avec des maximums d'accumulation de protéines à la fois tôt le matin et en fin de nuit (Figure 4.A).

En comparant les rythmes des ARNm correspondant à ces protéines rythmiques, nous avons séparé ces protéines en deux groupes : la moitié des protéines rythmiques sont issues de la traduction d'ARNm eux-mêmes présentant un rythme d'accumulation avec un délai moyen de 6h. L'analyse des fonctions biologiques des gènes impliqués révèle que ce groupe de protéines est impliqué dans les fonctions du foie tel que le métabolisme des lipides, mais aussi du glucose et

de la détoxification (Figure 4.B).

L'autre moitié des protéines rythmiques présente un pic majeur d'accumulation à ZT19 (Figure 4.C). Ce groupe n'est pas issu de la traduction d'ARNm présentant un profil d'accumulation rythmique et est en majorité constitué de protéines destinées à être sécrétées. Il inclut, par exemple, l'ALBUMINE qui présente aussi un rythme d'accumulation synchronisé dans le plasma. À la différence des autres protéines identifiées, si on les compare aux souris

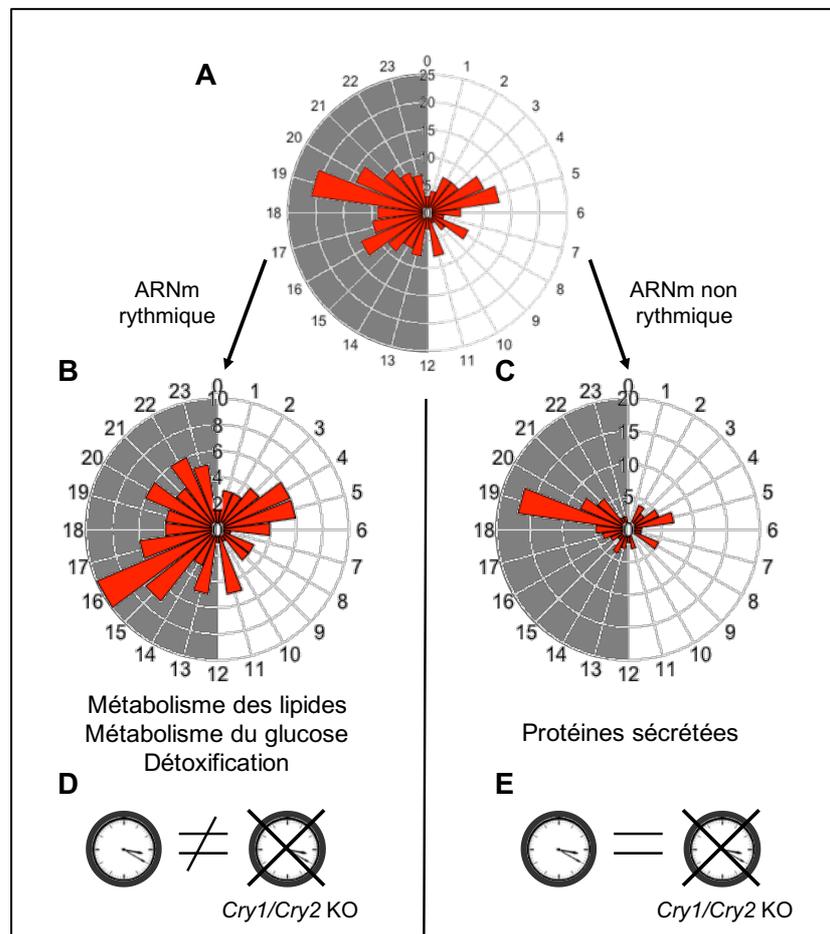


Figure 4 : A. Représentation des pics d'accumulation des protéines rythmiques identifiées. La position des pics correspond au temps de l'expérience (ZT0 à ZT24) et la longueur indique le nombre de protéines.

B et C. Représentation des pics d'accumulation des protéines rythmiques issues de la traduction d'ARNm présentant une accumulation rythmique (**B**) ou non (**C**).

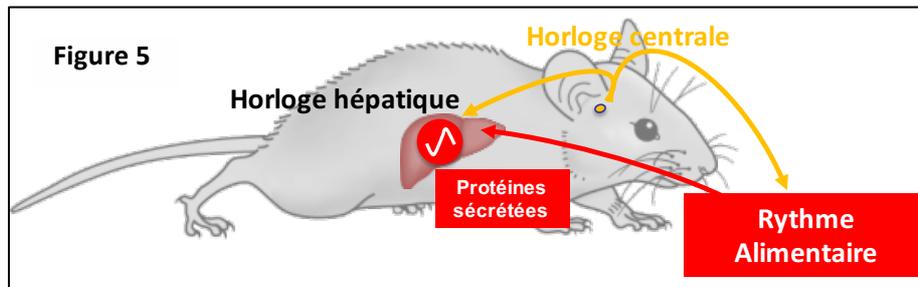
D et E. Les rythmes d'accumulations des protéines du groupe présenté en **B** ne sont pas corrélés dans des animaux présentant une horloge biologique dysfonctionnelle à la différence des protéines du groupe **C**.

contrôles, les rythmes d'accumulation de ces protéines sécrétées persistent dans les souris présentant une horloge dysfonctionnelle (*Cry1/Cry2* KO) soumises à un régime alimentaire nocturne (Figure 4.E).

Ainsi cette étude nous a permis de quantifier à grande échelle le protéome

hépatique rythmique et de constater que celui-ci est riche en protéines sécrétées. Nos résultats suggèrent aussi que des signaux d'entraînements liés à l'alimentation influencent le rythme des facteurs circulant dans le plasma.

(Mauvoisin, Wang et al. 2014) (Figure 5).

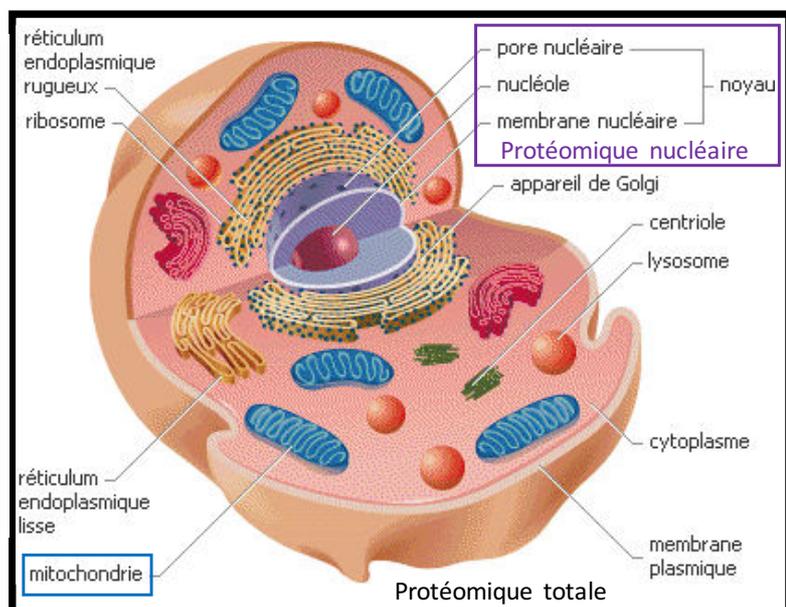


Quantification du protéome hépatique nucléaire « autour de l'horloge »

Nos travaux sur le protéome total ainsi que des travaux publiés en parallèle par d'autres groupes de recherche ont permis d'élever le niveau de caractérisation du protéome circadien notamment dans le foie et les noyaux suprachiasmatiques (Chiang, Mehta et al. 2014, Mauvoisin, Wang et al. 2014, Robles, Cox et al. 2014). Cependant, l'analyse d'extraits protéiques complexes provenant de cellules entières (Figure 6 encadré en noir : protéomique totale) reste toujours difficile car il est compliqué, par

exemple, de quantifier des protéines très faiblement exprimées comme c'est le cas des facteurs de transcription. Pour contourner cet inconvénient, nous avons effectué une deuxième analyse de protéomique quantitative sur des noyaux d'hépatocytes purifiés (Figure 6 ; encadré en violet : Protéomique nucléaire). Une approche similaire a été récemment utilisée sur des extraits de mitochondries purifiées (Figure 6 ; encadré en bleu) (Neufeld-Cohen, Robles et al. 2016).

Figure 6 : La cellule et ses principales organelles. Un extrait total de protéines, réalisé à partir de cellules entières, est complexe au niveau de sa composition et rend difficile l'identification de protéines faiblement exprimées. Pour contourner cette difficulté nous pouvons utiliser des extraits protéiques réalisés à partir d'organelles purifiées comme le noyau ou la mitochondrie.



Le protéome nucléaire est hautement rythmique

Dans notre étude nous avons utilisé comme précédemment l'approche *in-vivo* SILAC combinée à l'enrichissement en protéines nucléaires. Cette approche nous a permis d'identifier 4820 protéines. Le taux de recouvrement de ce protéome nucléaire est très élevé puisque, nos données contiennent 90% des protéines déjà annotées comme composantes des différents compartiments nucléaires. L'analyse du protéome nucléaire montre que plus de 500 protéines sont classifiées comme rythmiques. Ce protéome nucléaire rythmique présente des phases en fin de journée et en fin de nuit. De plus, nos résultats nous ont permis pour la première fois de quantifier le rythme de toutes les protéines de l'horloge moléculaire en

même temps (Horloge moléculaire décrite en Figure 1.B).

En comparant les rythmes des ARNm correspondant à ce protéome nucléaire rythmique, on s'aperçoit que 75% de ce protéome n'est pas encodé par des ARNm présentant une accumulation rythmique ce qui suggère une régulation post-transcriptionnelle voire même post-traductionnelle puisque la régulation au niveau de la traduction ne concerne qu'un petit groupe de gènes (Atger, Gobet et al. 2015). Il est donc probable que la régulation rythmique du transport de ces protéines vers le noyau de la cellule ou de la dégradation de ces protéines soient des éléments importants dans la régulation du protéome nucléaire.

Fonctions biologiques rythmiques révélées par la protéomique nucléaire

Pour obtenir plus d'informations sur les fonctions biologiques orchestrées de façon rythmique, nous avons aussi, en parallèle, effectué une quantification de ces protéines nucléaires au niveau de leur phosphorylation qui fait partie des modifications post-traductionnelles éventuelles pouvant avoir un impact sur l'activité ou la stabilité des protéines par exemple.

En combinant une analyse des données de protéomique et de phospho-protéomique nucléaire, nous avons

identifié que durant la journée les protéines impliquées dans la réparation de l'ADN et dans la régulation transcriptionnelle sont plus présentes au niveau du noyau tandis que durant la nuit on observe une accumulation de protéines impliquées dans la régulation de l'organisation du cytosquelette, du transport protéique et de la protéolyse. Ceci suggère une compartimentalisation temporelle des fonctions biologiques au niveau nucléaire.

Régulation rythmique de la transcription

Une des fonctions fondamentales du noyau est de décoder l'information contenue dans l'ADN qu'il renferme par l'intermédiaire de la transcription en ARNm. La transcription est un phénomène hautement régulé par des protéines appelées facteurs de transcription. De façon intéressante, nos données montrent

que 99 facteurs de transcription et 80 co-régulateurs de transcription sont rythmiques au niveau nucléaire. Des facteurs comme PPAR α /RXR α (phases=ZT12) et co-régulateurs tel que HDAC3 (phase=ZT8) sont des exemples de régulateurs rythmiques de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme

des lipides. On observe aussi 16 facteurs et 17 co-régulateurs de transcription qui conservent leur rythme dans les souris *Cry1/Cry2* DKO, comme pour SREBP-1 (phase=ZT19) un facteur aussi impliqué

dans la régulation du métabolisme des lipides. Ceci indique que leurs rythmes peuvent être régulés aussi par des facteurs comme le rythme alimentaire.

Organisation rythmique de la polyploïdie

Grâce aux analyses réalisées à partir des données de protéomique nucléaire et de façon similaire à ce qui a déjà été observé dans d'autres conditions et modèles (Matsuo, Yamaguchi et al. 2003, Bieler, Cannavo et al. 2014, Feillet,

Krusche et al. 2014), il semblerait que les cycles cellulaire et circadien soient alignés au niveau du foie (Figure 7), malgré le fait que le foie soit un organe quiescent ce que nous confirmons par un taux de marquage au Ki-67 (marqueur de cellule en

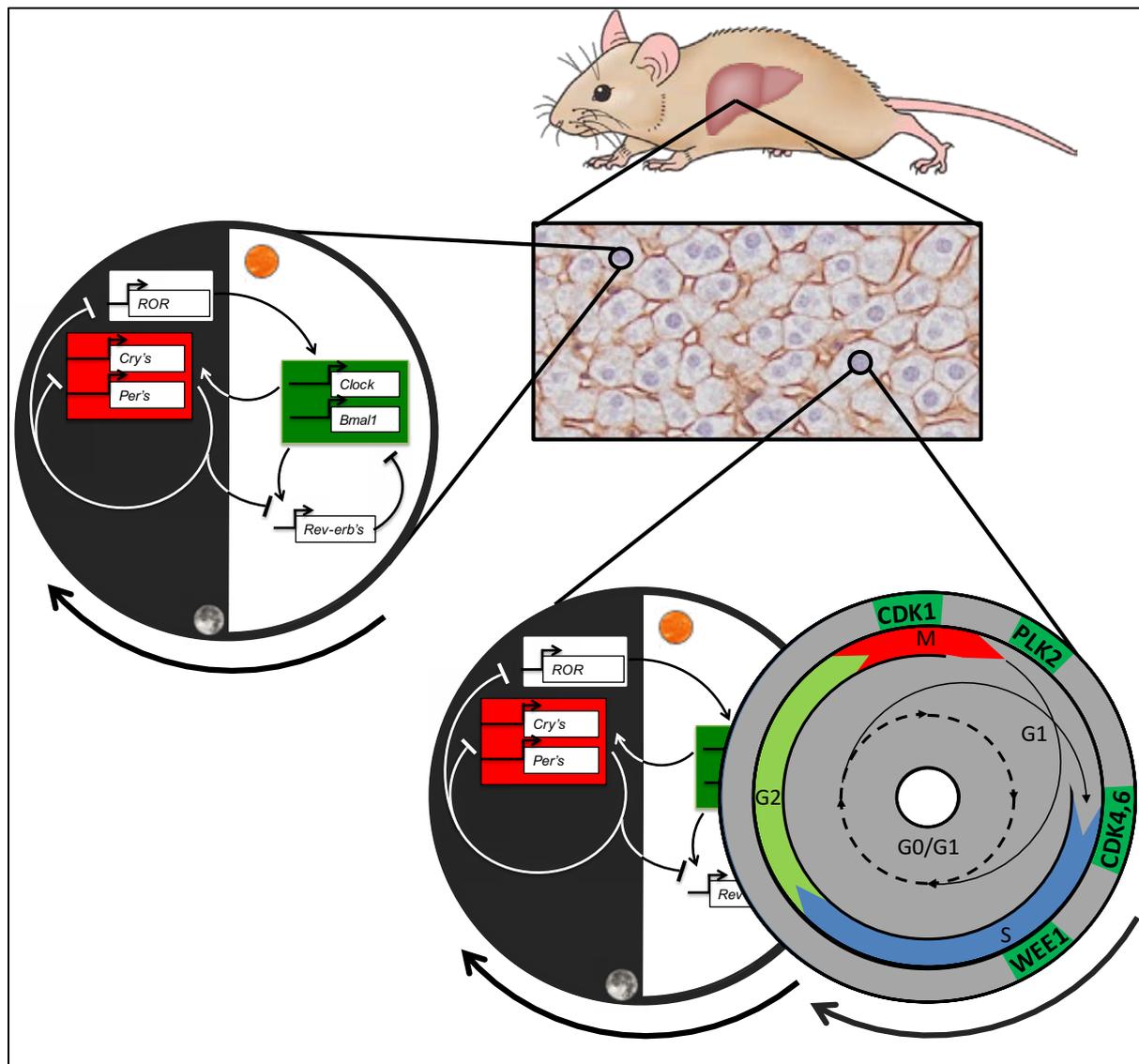


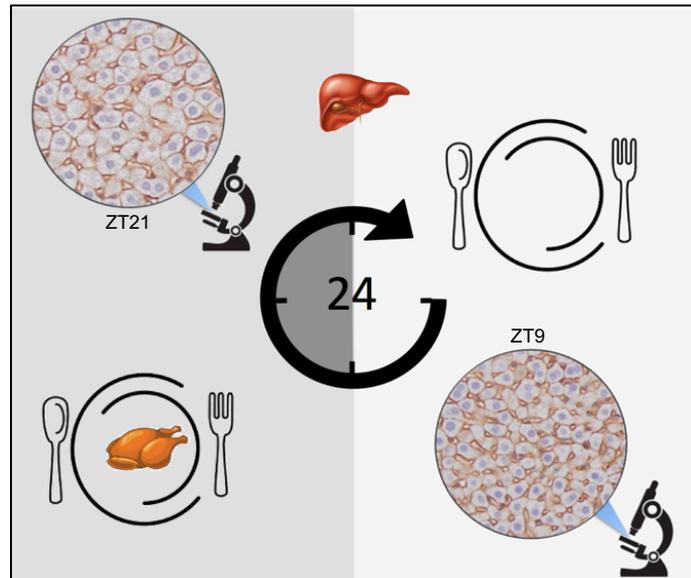
Figure 7. Alignement des cycles cellulaires et circadiens.

CDK1 (marqueur de mitose), PLK2 (marqueur de G1/S), CDK4,6 (marqueur d'entrée en phase S) et Wee1 (inhibiteur de CDK1) sont identifiées comme ayant une activité rythmique. Nous proposons cette organisation rythmique du cycle cellulaire, c'est-à-dire une phase G1 en début de jour, une entrée en phase S aux alentours de ZT6, une phase G2 après ZT15 et une synchronisation des mitoses en fin de nuit autour de ZT0.

prolifération) aux alentours de 5%. De plus, le nombre de cellules en prolifération ne semble pas rythmique. Etant donné que le foie est un organe polyploïde (Gentric and Desdouets 2014), nous nous sommes demandé si les activités liées au cycle cellulaire et la polyploïdie pouvaient être liées. Nous avons donc analysé la polyploïdie au niveau hépatique et nos données révèlent que la proportion des

hépatocytes binucléés 2N (2x2N) est antiphasique avec celle des hépatocytes mononucléés 4N (1x4N) (Figure 8). Bien que nous ne pouvons à ce stade pas proposer de mécanismes précis, il semblerait que le lien entre les cycles cellulaire et circadien pourrait être la polyploïdie rythmique (Wang, Mauvoisin et al. 2017).

Figure 8. Polyploïdie rythmique : Nos analyses révèlent que le nombre d'hépatocytes binucléés 2N (2x2N) et mononucléés 4N (1x4N) sont rythmiques avec respectivement des phases à ZT9 et ZT21.



Conclusion

Nous avons montré que la combinaison de l'analyse quantitative et temporelle du protéome nucléaire constitue un outil puissant pour découvrir de nouvelles fonctions biologiques rythmiquement orchestrées qui ne pouvaient pas être identifiées par des techniques de protéomique plus classiques. Les données obtenues ici constituent une étape importante vers l'identification de nouvelles fonctions biologiques orchestrées par l'horloge circadienne et/ou des rythmes d'alimentation comme cela semble être le

cas pour la sécrétion au niveau hépatique. Sachant que l'activité et/ou la présence de beaucoup de facteurs de transcription sont régulées par l'attachement de certains ligands (comme des acides gras ou certaines vitamines) nos résultats pourraient avoir un impact important dans le domaine de la chrononutrition. La purification d'organelle associée à la protéomique quantitative pourrait être généralisée à de nombreuses fonctions dans différents modèles et systèmes où les mécanismes moléculaires sont encore mal décrits.

Références Bibliographiques

- Atger, F., C. Gobet, J. Marquis, E. Martin, J. Wang, B. Weger, G. Lefebvre, P. Descombes, F. Naef and F. Gachon (2015). "Circadian and feeding rhythms differentially affect rhythmic mRNA transcription and translation in mouse liver." Proceedings of the National Academy of Sciences **112**(47): E6579-E6588.
- Balsalobre, A., S. A. Brown, L. Marcacci, F. Tronche, C. Kellendonk, H. M. Reichardt, G. Schutz and U. Schibler (2000). "Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling." Science **289**(5488): 2344-2347.
- Balsalobre, A., F. Damiola and U. Schibler (1998). "A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells." Cell **93**(6): 929-937.
- Baratta, J. L., A. Ngo, B. Lopez, N. Kasabwalla, K. J. Longmuir and R. T. Robertson (2009). "Cellular organization of normal mouse liver: a histological, quantitative immunocytochemical, and fine structural analysis." Histochem Cell Biol **131**(6): 713-726.
- Bass, J. (2012). "Circadian topology of metabolism." Nature **491**(7424): 348-356.
- Bieler, J., R. Cannavo, K. Gustafson, C. Gobet, D. Gatfield and F. Naef (2014). "Robust synchronization of coupled circadian and cell cycle oscillators in single mammalian cells." Mol Syst Biol **10**: 739.
- Chiang, C. K., N. Mehta, A. Patel, P. Zhang, Z. Ning, J. Mayne, W. Y. Sun, H. Y. Cheng and D. Figeys (2014). "The proteomic landscape of the suprachiasmatic nucleus clock reveals large-scale coordination of key biological processes." PLoS Genet **10**(10): e1004695.
- Damiola, F., N. Le Minh, N. Preitner, B. Kornmann, F. Fleury-Olela and U. Schibler (2000). "Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus." Genes Dev **14**(23): 2950-2961.
- Deery, M. J., E. S. Maywood, J. E. Chesham, M. Sládek, N. A. Karp, E. W. Green, P. D. Charles, A. B. Reddy, C. P. Kyriacou, K. S. Lilley and M. H. Hastings (2009). "Proteomic Analysis Reveals the Role of Synaptic Vesicle Cycling in Sustaining the Suprachiasmatic Circadian Clock." Curr Biol **19**(23): 2031-2036.
- Doherty, C. J. and S. A. Kay (2010). "Circadian Control of Global Gene Expression Patterns." Annu Rev Genet **44**(1): 419-444.
- Duez, H., Y. Sebti and B. Staels (2013). "Horloges circadiennes et métabolisme : intégration des signaux métaboliques et environnementaux." Med Sci (Paris) **29**(8-9): 772-777.
- Emadali, A. and M. Gallagher-Gambarelli (2009). "La protéomique quantitative par la méthode SILAC." Med Sci (Paris) **25**(10): 835-842.
- Feillet, C., P. Krusche, F. Tamanini, R. C. Janssens, M. J. Downey, P. Martin, M. Teboul, S. Saito, F. A. Levi, T. Bretschneider, G. T. van der Horst, F. Delaunay and D. A. Rand (2014). "Phase locking and multiple oscillating attractors for the coupled mammalian clock and cell cycle." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(27): 9828-9833.
- Gentric, G. and C. Desdouets (2014). "Polyploidization in liver tissue." Am J Pathol **184**(2): 322-331.
- Goldbeter, A., C. Gérard and J.-C. Leloup (2010). "Biologie des systèmes et rythmes cellulaires." Med Sci (Paris) **26**(1): 49-56.
- Janich, P., A. B. Arpat, V. Castelo-Szekely, M. Lopes and D. Gatfield (2015). "Ribosome profiling reveals the rhythmic liver transcriptome and circadian clock regulation by upstream open reading frames." Genome Res **25**(12): 1848-1859.

- Jouffe, C., G. Cretenet, L. Symul, E. Martin, F. Atger, F. Naef and F. Gachon (2013). "The circadian clock coordinates ribosome biogenesis." *PLoS Biol* **11**(1): e1001455.
- Kim, T.-D., K.-C. Woo, S. Cho, D.-C. Ha, S. K. Jang and K.-T. Kim (2007). "Rhythmic control of AANAT translation by hnRNP Q in circadian melatonin production." *Genes Dev* **21**(7): 797-810.
- Koike, N., S. H. Yoo, H. C. Huang, V. Kumar, C. Lee, T. K. Kim and J. S. Takahashi (2012). "Transcriptional architecture and chromatin landscape of the core circadian clock in mammals." *Science* **338**(6105): 349-354.
- Kojima, S., E. L. Sher-Chen and C. B. Green (2012). "Circadian control of mRNA polyadenylation dynamics regulates rhythmic protein expression." *Genes Dev* **26**(24): 2724-2736.
- Kojima, S., D. L. Shingle and C. B. Green (2011). "Post-transcriptional control of circadian rhythms." *J Cell Sci* **124**(Pt 3): 311-320.
- Kornmann, B. (2007). "L'horloge circadienne centrale et les horloges périphériques." *Med Sci (Paris)* **23**(4): 349-350.
- Le Martelot, G., D. Canella, L. Symul, E. Migliavacca, F. Gilardi, R. Liechti, O. Martin, K. Harshman, M. Delorenzi, B. Desvergne, W. Herr, B. Deplancke, U. Schibler, J. Rougemont, N. Guex, N. Hernandez and F. Naef (2012). "Genome-wide RNA polymerase II profiles and RNA accumulation reveal kinetics of transcription and associated epigenetic changes during diurnal cycles." *PLoS Biol* **10**(11): e1001442.
- Matsuo, T., S. Yamaguchi, S. Mitsui, A. Emi, F. Shimoda and H. Okamura (2003). "Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo." *Science* **302**(5643): 255-259.
- Mauvoisin, D., J. Wang, C. Jouffe, E. Martin, F. Atger, P. Waridel, M. Quadroni, F. Gachon and F. Naef (2014). "Circadian clock-dependent and -independent rhythmic proteomes implement distinct diurnal functions in mouse liver." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(1): 167-172.
- Mermet, J., J. Yeung and F. Naef (2016). "Systems chronobiology: global analysis of gene regulation in a 24-hour periodic world." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.
- Mohawk, J. A., C. B. Green and J. S. Takahashi (2012). "Central and Peripheral Circadian Clocks in Mammals." *Annu Rev Neurosci* **35**(1): 445-462.
- Neufeld-Cohen, A., M. S. Robles, R. Aviram, G. Manella, Y. Adamovich, B. Ladeux, D. Nir, L. Rousso-Noori, Y. Kuperman, M. Golik, M. Mann and G. Asher (2016). "Circadian control of oscillations in mitochondrial rate-limiting enzymes and nutrient utilization by PERIOD proteins." *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Reddy, A. B., N. A. Karp, E. S. Maywood, E. A. Sage, M. Deery, J. S. O'Neill, G. K. Y. Wong, J. Chesham, M. Odell, K. S. Lilley, C. P. Kyriacou and M. H. Hastings (2006). "Circadian Orchestration of the Hepatic Proteome." *Curr Biol* **16**(11): 1107-1115.
- Robles, M. S., J. Cox and M. Mann (2014). "In-vivo quantitative proteomics reveals a key contribution of post-transcriptional mechanisms to the circadian regulation of liver metabolism." *PLoS Genet* **10**(1): e1004047.
- Wang, J., D. Mauvoisin, E. Martin, F. Atger, A. N. Galindo, L. Dayon, F. Sizzano, A. Palini, M. Kussmann, P. Waridel, M. Quadroni, V. Dulić, F. Naef and F. Gachon (2017). "Nuclear Proteomics Uncovers Diurnal Regulatory Landscapes in Mouse Liver." *Cell Metab* **25**(1): 102-117.