

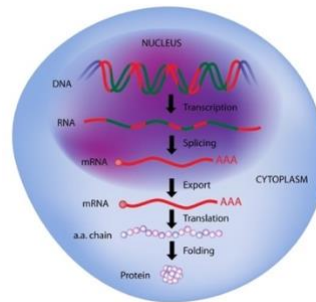
Structure et organisation fonctionnelle du noyau

I- Généralités sur l'expression génique

Aujourd'hui, grâce aux techniques d'analyses à haut débit, nanotechnologies, on a la possibilité d'étudier la science des X-omes : X étant le génome, protéome, transcriptome.

On rappelle les étapes d'expression d'un gène :

- 1) ADN (**génom**)
- 2) Transcription en ARN (**transcriptome**)
- 3) Épissage
- 4) Transport ARN en dehors du noyau
- 5) Traduction en protéine (**protéome**)
- 6) Maturation
- 7) Adressage de la protéine
- 8) Dégradation de la protéine



Rappel de différentes définitions :

Génotype : Ensemble des caractères génétiques d'un individu dont l'expression différentielle est visible dans le phénotype. Les individus d'une même espèce ont les mêmes gènes, mais des allèles différentes (=génotype).

Phénotype : expression des gènes dans un environnement donné.

Épigénome : Ce que l'on transmet à nos cellules filles : (séquence d'ADN + cette séquence d'ADN dans un environnement donné, cet environnement correspond à la structure de la chromatine)

→ Ainsi, dans le reste du cours on sera + amené à parler de **chromatine** plutôt que de l'ADN car **chromatine = ADN + protéines interagissant avec celui-ci**, et c'est cette chromatine qui est transcrite et répliquée !

Il y a 20 000 gènes dans nos cellules, mais ils ne sont pas tous exprimés (on dit qu'un gène s'exprime quand il est transcrit en ARN).

Les gènes qui s'expriment sont dits : **ON**, les autres, la plupart, sont : **OFF**
10% seulement des gènes s'expriment dans les 200 différents types cellules



Quels sont les mécanismes qui déterminent si un gène est ON ou OFF ?
 Ces mécanismes sont-ils transmissibles avec les divisions ?

A- Notion de programme transcriptionnel

Le programme transcriptionnel c'est justement ce qui détermine que certains gènes soient ON/OFF.

→ Tout cela est déterminé par la cellule en fonction de signaux externes (*hormones, molécules de signalisation...*) ou encore des signaux physiques (*lumière, signaux mécaniques...*) et aussi des signaux internes (*nombre de divisions*) qu'elle reconnaît et interprète.

Exemple 1 : Expression d'un facteur de transcription myogénique chez un fibroblaste

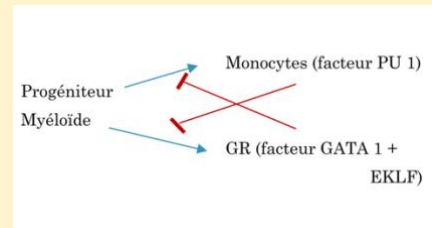
→ On prend un fibroblaste sur lequel on active un gène normalement OFF (comme un gène caractéristique des cellules musculaires). On peut ainsi **transformer ce fibroblaste en cellule musculaire** : c'est ce qu'on appelle une **transdifférenciation**. On en déduit que **ces programmes transcriptionnels sont essentiels dans les phénomènes de différenciation**.

Exemple 2 : Progéniteur myéloïde :

→ Processus servant à générer nos cellules sanguines. A partir d'un progéniteur myéloïde, on a **deux grands types de différenciation possibles pour une cellule** : la **voie monocytaire** et celle qui aboutit **aux globules rouges**.

La cellule décide de sa voie de différenciation selon les facteurs de transcription spécifique qu'elle reçoit (PUI pour les monocytes et GATA1 puis EKLF pour les érythrocytes.)

Les facteurs de transcription vont entraîner la différenciation vers une certaine lignée et vont **en même temps** inhiber l'autre voie de différenciation pour être sûr de bien se différencier.



→ On a certes établi qu'il existait un programme transcriptionnel, certains gènes s'expriment et d'autres non.

Mais comment la cellule va garder « en mémoire » les gènes qu'elle doit exprimer ou non ?

La régulation des gènes passe par la régulation de la conformation et l'organisation structurale des gènes.

En fait, les signaux que reçoit la cellule vont induire un changement de structure de chromatine. **Ces signaux modifient l'épigénome**, qui porte ainsi les marques d'activation et d'inactivation des gènes.

On aura ainsi :

Chromatine OUVERTE = Gène ON = expression du gène
Chromatine FERMÉE = Gène OFF = non-expression du gène

→ Quand on parle de chromatine « ouverte », on parle réellement de sa structure physique, le fait qu'elle soit ouverte permet à la machinerie de transcription d'y accéder et de transcrire le gène.

Ces modifications de l'épigénome sont **héréditaires**, c'est-à-dire qu'il suffit de stimuler une fois la cellule avec des signaux inducteurs pour que la chromatine garde en mémoire sa structure, et permettre ainsi le maintien du programme transcriptionnel au cours des mitoses successives.

La mémoire épigénétique est ainsi assurée par les changements chromatiniens.

B- Régulation de l'expression génique

On distingue 2 types de régulation de l'expression des gènes : le **contrôle proximal** de la transcription au niveau des promoteurs et le **contrôle distal** avec les **enhancers/silencers** et les **insulateurs**.

I- Le contrôle proximal

On a une séquence juste en amont du gène = **le promoteur**, où se fait l'initiation de la transcription et un certain nombre de régulation

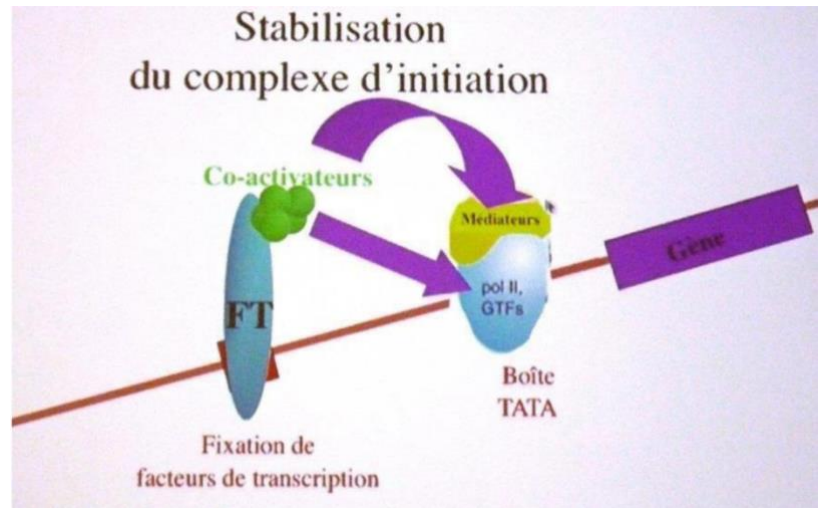
a- Le complexe d'initiation

- Le **complexe d'initiation** (ARN polymérase II + facteurs généraux de transcription) se fixe sur la **boîte TATA**, sur laquelle va se fixer le **médiateur**.

- Les **facteurs de transcription** stabilisent ce complexe en se fixant sur des régions spécifiques du promoteur. Ils vont éventuellement se coupler à d'autres protéines = les **co-activateurs**

- Les **interactions protéines/protéines** entre les **facteurs de transcription**, les **médiateurs** et le **complexe d'initiation** vont venir stabiliser le complexe. Le **médiateur** est un **intermédiaire** entre le **facteur de transcription** et **l'ARN polymérase**

→ **le gène s'exprime.**



b- Organisation modulaire des facteurs de transcription

On utilise en premier lieu un modèle de référence (levure) pour comprendre comment un complexe d'initiation agit chez l'eucaryote.

Ajout de galactose dans le milieu de culture :

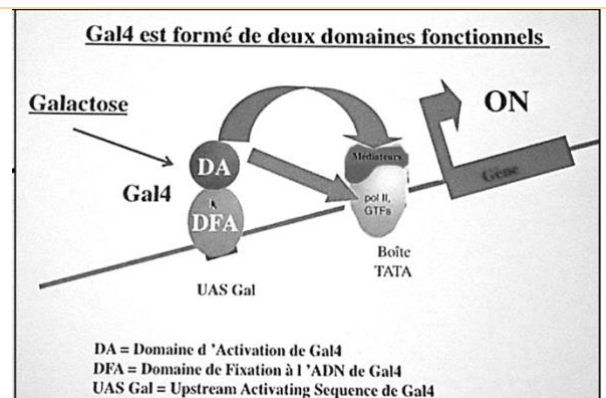
→ GAL4 (facteur de transcription) est **activé** ainsi que des gènes cibles du catabolisme du galactose : la levure veut dégrader le galactose pour faire de l'énergie.

Gal4 se fixe sur une séquence spécifique nommée **UAS** chez la levure et stabilise le complexe via des médiateurs.

► Gal4 (comme beaucoup de facteur de transcription) est **formé de deux domaines fonctionnels** :

- **DFA = Domaine de fixation** spécifique de Gal4 sur l'ADN qui va permettre le recrutement spécifique de facteur de transcription sur le site de réponse.

- **DA = Domaine d'activation** qui interagit avec les protéines du médiateur pour stabiliser le complexe et favoriser la transcription.



→ Donc ces deux domaines sont portés par la même protéine mais **peuvent être séparés et intervertis artificiellement**. Ils sont donc **d'organisation modulaire**

Différentes expériences vont montrer que les deux parties du facteur de transcription sont indépendantes et peuvent agir l'une indépendamment de l'autre si on remplace l'une ou l'autre des parties.

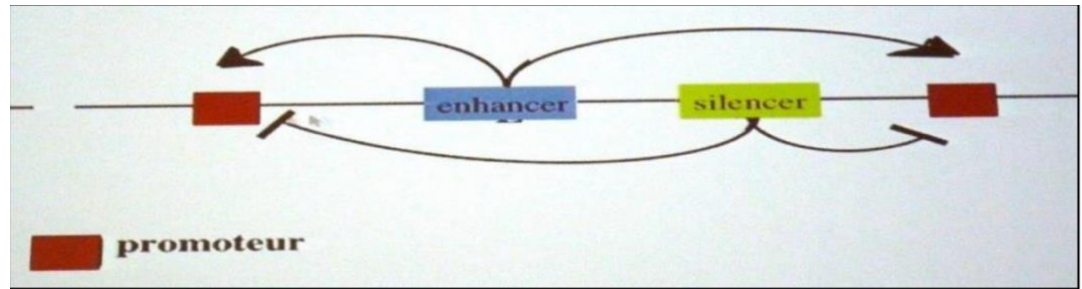
Ce sont des mécanismes très conservés avec des **phénomènes universels** (un domaine de fixation issu du virus de l'herpès fonctionne chez la levure).

→ Tout ceci sera transposé dans nos cellules, cependant on parlera **d'Élément Réponse (ER)** et pas d'UAS

2- Le contrôle distal : les enhancers et les silencers

Les promoteurs ne sont pas l'unique forme de régulation pour l'expression des gènes ! Il existe également des **contrôles distaux**. Il existe d'autres séquences (sur lesquelles se fixent des facteurs de transcription) qui vont déterminer si le gène est ON ou OFF.

- Les séquences **enhancers** sont **activatrices**
- Les séquences **silencers** sont **inhibitrices**



Les bactéries n'ont que des contrôles proximaux +++

Leurs mécanismes sont très différents des promoteurs :

- Ils ont une **position variable** par rapport au promoteur (en 5' ou 3' = en amont ou en aval) +++
- Ils peuvent être **très éloignés** (à des milliers voire des millions de paires de base)
- Ils agissent **indifféremment de l'orientation**.
- Ils agissent le plus souvent en **cis** (même chromosome) *mais quelques exceptions en trans*

On retrouve presque les mêmes facteurs de transcription au niveau des enhancers/silencers qu'au niveau des promoteurs, certains facteurs sont même communs aux silencers et enhancers qui ont pourtant des conséquences très différentes.

→ Ce n'est pas vraiment la fixation de ce facteur de transcription en particulier qui est important mais la **combinaison de différents facteurs qui agissent**.

Ainsi, un même facteur de transcription va être activateur ou répresseur en fonction des autres éléments qui l'entourent.

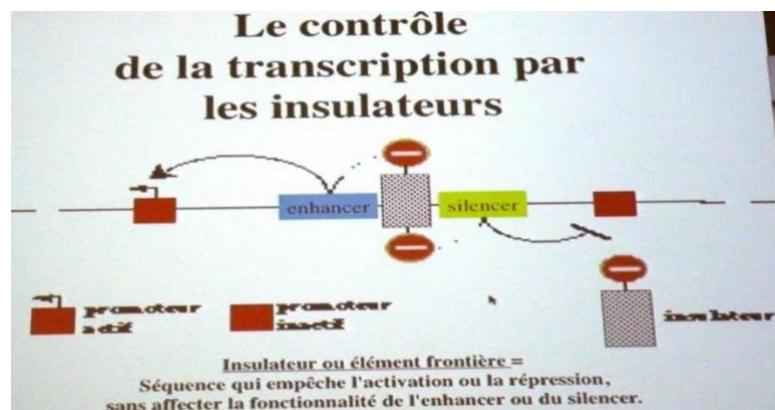
Sachant qu'il y a une multitude d'enhancers et de silencers, comment éviter qu'il y ait une cacophonie de régulation des gènes ?

3- Le contrôle distal : les insulateurs

Les insulateurs permettent de **donner un sens à l'action des silencers et des enhancers**.

Ce sont de véritables frontières, des murs, **ils n'empêchent pas l'action des silencers/enhancers ++**, ils vont juste les empêcher d'agir dans une direction (visualisez cela comme un panneau « sens interdit »)

Ces insulateurs définissent des domaines de régulation spécifique dans notre génome. +++



Exemple : l'érythropoïèse (pas à apprendre par cœur sur le bout des doigts, il faut juste comprendre le principe)

On a trois gènes : le récepteur folate, le gène β -globuline (les deux impliqués dans l'érythropoïèse) et celui des récepteurs olfactifs, qui sont tous les trois côte à côte dans notre génome et on va voir ce qu'il se passe dans différentes cellules.

Le tutorat est gratuit. Toute vente ou reproduction est interdite.

En début d'érythropoïèse : Le gène des récepteurs folate est **ON**. Le gène de la βglobine n'est pas encore utile, et celui des récepteurs olfactifs est totalement inutile : ils sont **OFF**.

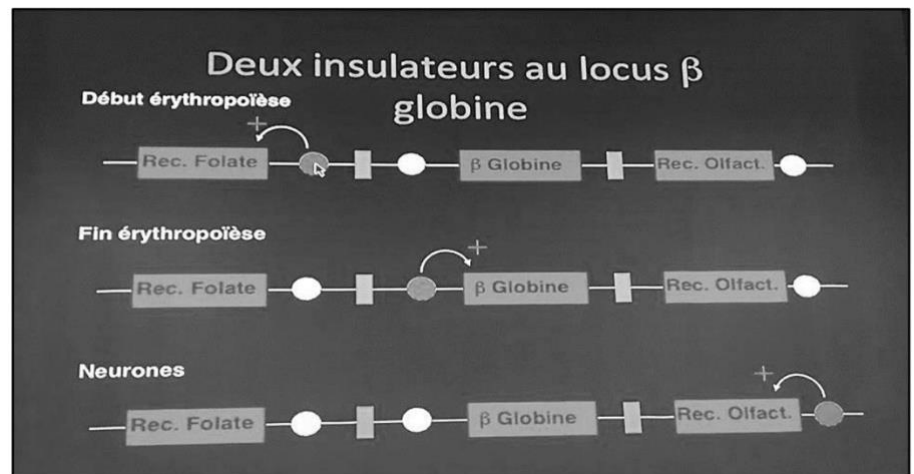
En fin d'érythropoïèse : on a plus besoin des récepteurs folate le gène est **OFF**, on a besoin de la β-globine il est **ON**, et le gène des récepteurs olfactifs est toujours **OFF**.

Dans les neurones : on ne fait pas d'érythropoïèse, les 2 premiers sont **OFF**, le gène des récepteurs olfactifs est **ON**

→ Le domaine du gène de la β-globine possède donc **deux insulateurs** (rectangles sur le schéma) pour pouvoir réguler ces trois gènes convenablement.

Les **insulateurs définissent des domaines de régulation spécifique**.

Ici ils sont monogéniques (un seul gène par zone) mais pas nécessairement : on peut avoir des domaines encadrés par des insulateurs composés de plusieurs gènes.



Contrôle proximal	Contrôle distal	Régulation différentielle/distale
Promoteur	Enhancers & Silencers	Insulateurs
En amont du gène	Position variable ++ à distance	A distance
Agit de manière unidirectionnelle	Agissent dans les deux directions	Réduisent les enhanceurs et les silencers à un domaine de régulation spécifique

Récap +++

II- Compaction de la chromatine

La chromatine est le support des modifications liées aux facteurs de transcriptions.

Les modifications de la chromatine sont héréditaires → **l'épigénome se transmet au fur et à mesure des mitoses ++**

A- Compaction de l'ADN nucléaire

Problème : La taille totale de tout l'ADN dans chaque cellule fait **2m** qu'il faut faire rentrer dans un noyau inférieur à **10 microns**

→ **Il faut donc compacter l'ADN**

Une conséquence de cette compaction est que 2 nucléotides A et B séparés de 80 paires de bases dans la séquence linéaire peuvent être côte à côte dans le noyau !

La structure en chromatine, c'est-à-dire très condensée, **bloque l'accès de la machinerie de transcription** (association à la TATA Box impossible)

La chromatine assure une organisation du matériel génétique qui :

♥Facilite la ségrégation lors de la mitose♥

♥Défavorise la transcription♥

Ce phénomène de compaction est dû aux nucléosomes = premier niveau de compaction de l'ADN +++

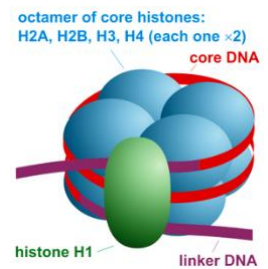
B- Structure du nucléosome

1- Le nucléosome

C'est un cylindre de 6nm de hauteur et 11nm de diamètre, composé de **4 paires d'histones** (8 histones= un octamère d'histones) : **2x H2A, 2x H2B, 2x H3, 2x H4**.

Un nucléosome est entouré de **146 paires de base d'ADN**.

Le maintien de l'ADN autour de l'octamère d'histones est assuré par des **interactions électrostatiques** entre l'ADN et les protéines



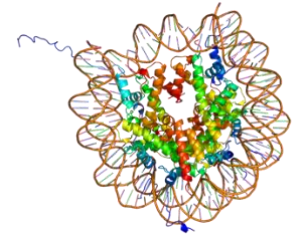
2- Les histones

Ces histones sont très conservées au cours de l'évolution (**dans tous les organismes eucaryotes**), ce qui montre leur **importance fonctionnelle**.

→ Il n'y en a **pas chez les bactéries**, elles ont des systèmes de compaction différents.

Elles font entre 20 et 30KD chacune, il y en a environ 60 millions par noyau.

Les histones sont des protéines basiques, donc chargées **POSITIVEMENT**, ce qui permet une interaction forte, un maintien de l'ADN autour du nucléosome, car l'ADN est chargé **NÉGATIVEMENT**. ++++



3- Les protéines chaperons

Les nucléosomes s'assemblent de manière spontanée mais peuvent être aidés des protéines chaperons.

Ces protéines stimulent l'assemblage du nucléosome de manière conformationnelle sans réaction enzymatique.

→ Aident les protéines à se replier et interagissent avec les dimères d'histones en plusieurs étapes :

- 1) ADN nu
- 2) Chaperons guident 2 x l'hétérodimère H3 H4 vers l'ADN => formant un « demi-nucléosome »
- 3) Chaperons guident 2 x l'hétérodimère H2A H2B vers l'ADN => formant un nucléosome complet



4- Expérience : étude d'histones

- 1) On utilise la **nucléase micrococcale**. C'est une enzyme qui **dégrade l'ADN linker** (l'ADN entre les nucléosomes) = à l'extérieur des nucléosomes.
 - **Digestion partielle**= la nucléase coupe en moyenne 1 fois entre 2 nucléosomes= 146pb + ADN linker → fragments de 200pb, donc les nucléosomes sont séparés de 200pb
 - **Digestion totale**= nucléase coupe « au maximum » → on obtient une particule cœur de 146pb (seulement l'ADN entourant l'octamère).
- 2) Ajout de **NaCl** (sel) → **détruit l'interaction ADN-protéine**= obtention du nucléosome sans son ADN autour
- 3) Utilisation d'un pH acide/urée= **dénaturation des protéines**= on obtient les différentes histones.