

# Biologie Cellulaire

Intitulé du cours : Fin Cytosquelette + Début Noyau

Rédacteur : Remy

Ronéo n° : 10



Corporation des Carabins Niçois

UFR Médecine  
28, av. de Valombrese  
06107 Nice Cedex 2  
<http://carabinsnicois.fr/>  
[roneo.c2n@gmail.com](mailto:roneo.c2n@gmail.com)

*Partenaires :*



# BNP PARIBAS

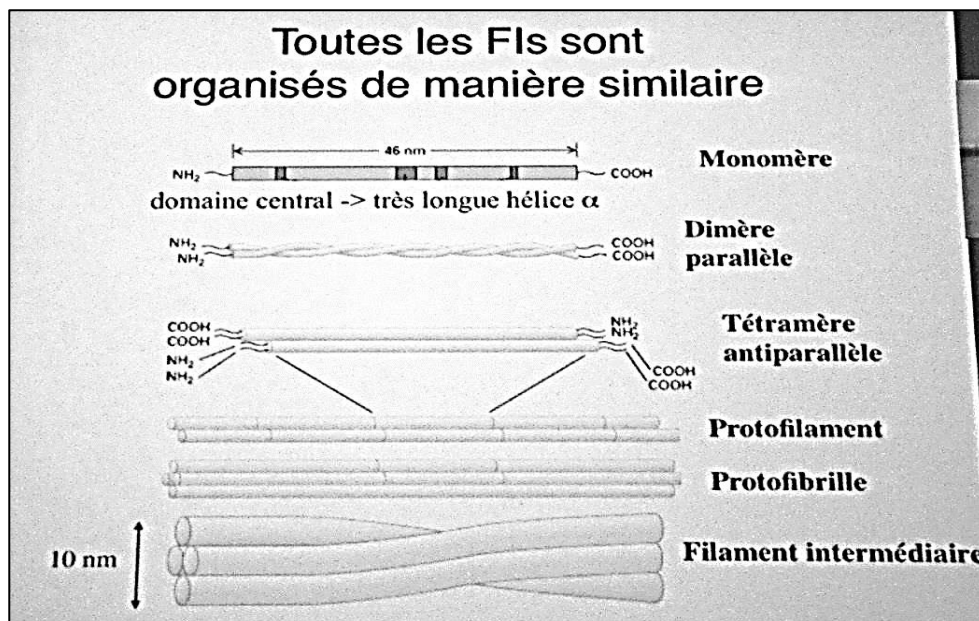
La banque et l'assurance d'un monde qui change

# CYTOSQUELETTE

## IV. LES FILAMENTS INTERMÉDIAIRES

### A. Introduction aux filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires du cytosquelette correspondent à des structures assez différentes dans la cellule mais ont tous en **commun** un type **d'organisation structurale**.



Ce sont des protéines qui, sous forme **monomérique**, ont pour structure protéique secondaire une très grande **hélice alpha**.

- Ces **monomères** auront intrinsèquement la propriété de s'assembler en **dimères parallèles** (les Cter et Nter des 2 monomères sont orientés du même côté).

L'orientation (parallèle ou antiparallèle) permet de comprendre pourquoi, à la différence des microtubules et des microfilaments, **les filaments intermédiaires ne sont, finalement, pas orientés**.

- Deux dimères s'associent avec un petit décalage en **antiparallèle** pour donner un **tétramère** : Il n'y a **plus d'orientation** (les deux extrémités sont identiques).
- Grâce au petit décalage, on associe bout à bout les tétramères pour former un **protofilament**.
- 4 protofilaments s'associent pour former une structure intermédiaire : **protofibrille**.
- 4 protofibrilles s'associent pour former le **filament intermédiaire constitué**.

**Monomères → Dimères → Tétramères → Protofilaments → Protofibrilles → Filaments Intermédiaires**  
On obtient un filament intermédiaire avec une section composée de **32 monomères**.

La structure commune entraîne des caractéristiques communes des filaments. Ce sont des structures :

- Ils sont **solides** mais **facilement dépolymérisables**.
- N'ont pas une structure aussi dynamique que les microtubules ou que les microfilaments.
- Ils ont une taille intermédiaire de **10nm de diamètre** ( $MF = 8\text{ nm}$  et  $MT = 24\text{ nm}$ ).
- Pas de fixation, ni d'hydrolyse d'ATP/GTP, **non polarisés**.

## B. Types de filaments intermédiaires

C'est une logique d'organisation **commune** aux filaments intermédiaires, mais qui correspond à des familles très différentes ; on distingue **quatre familles principales** de filaments intermédiaires :

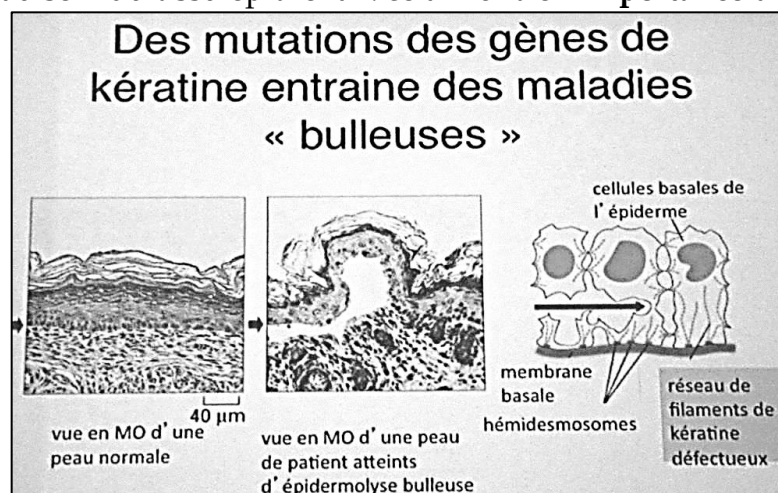
- **Kératine** = typique des cellules épithéliales et de leurs dérivés (poils et ongles...). La **cytokératine** correspond à des **filaments intermédiaires (FI) intracellulaires** contrairement à la kératine extracellulaire des ongles et des cheveux.
- **Vimentine** = dans les cellules du mésenchyme (fibroblastes...).
- **Lamines A et B** = forment un réseau (lamina nucléaire) plaqué contre la membrane nucléaire interne de toutes les cellules, elles se retrouvent dans les **noyaux**.
- **Neurofilaments** = ils sont présents dans les axones.

Le prof mentionne aussi cette année la desmine (FI présent dans les cellules musculaire) mais n'insiste pas.

Ces spécificités tissulaires, intéressantes en biologie et utiles en diagnostic médical, permettent avec des anticorps spécifiques et des techniques **d'immuno-histologie** de **distinguer certaines origines tissulaires de cancer notamment**. Par exemple, l'utilisation d'anti-kératine en diagnostic différentiel permet de différencier carcinome, sarcome ou lymphome (*Carcinome = cancer d'origine épithéliale, Sarcome = cancer d'origine conjonctive*). De même avec les anticorps anti-vimentine qui sont utilisés pour prouver qu'une tumeur est d'origine conjonctive comme les sarcomes. *Ne retenez pas ces exemples le prof dit ça pour que vous compreniez.*

## C. Les Kératines

Les cytokératines sont importantes pour donner sa forme au tissu épithélial. Elles forment un réseau de filaments, se lie aux desmosomes et **contribue à l'architecture tissulaire**. Les desmosomes assurent la jonction entre les cellules épithéliales. Un dysfonctionnement de ces filaments intermédiaires, entraîne des **maladies** dites **bulleuses**. Ce sont des maladies génétiques rares, concernées par une mutation dans ces gènes de kératine. On observe la peau d'un patient atteint d'épidermolyse bulleuse : des bulles se forment sous la peau, du fait des mutations dans les cytokératines. Il y a une destruction de l'intégrité tissulaire au sein du tissu épithélial : cela montre **l'importance de ces protéines**.



## D. Les Lamines

Il existe deux grands types de lames : **A et B** (il y en a d'autres aussi on en parle tout de suite).

- La **Lamine A** est codée par le gène **LMNA**. Ce gène subit un **épissage alternatif** (capacité d'utiliser des exons différents) qui génère la **Lamine C** : on a deux transcrits et donc deux **protéines distinctes**. Donc la **Lamine C est codée par le gène LMNA**. Plus la cellule est différenciée, plus elle exprime la Lamine A.
- Il existe plusieurs formes de **Lamine B** : **B1 et B2**, codées par deux gènes différents, **LMNB1 et LMNB2**. La lamine **B3** est codée par un épissage alternatif de **LMNB2**.

Ici le prof fait un petit aparté sur l'expérience de **Western Blot = Immunoblot**. On révèle les protéines nucléaires par **électrophorèse**. On fait un **Immunoblot** pour reconnaître les lames et on hybride les protéines avec des anticorps spécifiques anti-lamine A, B et C. Toutes les protéines de notre extrait nucléaire sont visibles : on a une détection spécifique des lames.

L'enveloppe nucléaire est une **double membrane**, en continuité avec le réticulum endoplasmique (RE) et donc le **système endomembranaire**. A tel point que certains polyribosomes qui tapissent la face cytosolique du Réticulum Endoplasmique (RE), tapissent aussi la face cytosolique de la membrane nucléaire. Les membranes internes et externes sont en continuité via les **pores nucléaires**.

Les lames font parties des **protéines majoritaires** de l'ensemble des **noyaux**. Les lames forment une **structure filamenteuse**, qui s'autoorganise en partie : c'est la **lamina**. Celle-ci est accrochée à la **surface interne** de la **membrane nucléaire** par des **protéines** associées cette membrane : ce sont des **récepteurs à la lamine** (LAP2b, LAP2a... pas à connaître). Il y a une première interphase d'interaction avec **l'enveloppe nucléaire et les lames** puis une deuxième avec la **chromatine nucléaire**.

Toute la chromatine n'est **pas associée partout à la lamina**, seules certaines portions le sont dont **l'hétérochromatine** (*condensé ++*). La protéine HP1, associée aux lames, est l'un des déterminants principaux de l'interaction : **HP1 est une protéine majeure de l'hétérochromatine** (Hétérochromatine Protéine 1).

Les lames ont un **mode d'ancrage** à la membrane nucléaire caractéristique :

- Via des récepteurs protéiques.
- Via la **farnésylation** : attachement à un **lipide (farnésylation)** au niveau de l'extrémité **C-terminal** (lames B1 et B2) : Après le clivage des trois derniers acides aminés (AA), une séquence spécifique est reconnue par une enzyme, la **farnésyltransférase**, qui va farnésyler la cystéine et donc l'accrocher à la membrane.

Les lames **B1 et B2** sont trouvées dans les cellules embryonnaires et chez les cellules souches de l'adulte. La lamine **B3** est une lamine très tissu-spécifique : on la retrouve dans les spermatocytes.

### Fonctions de la lamine :

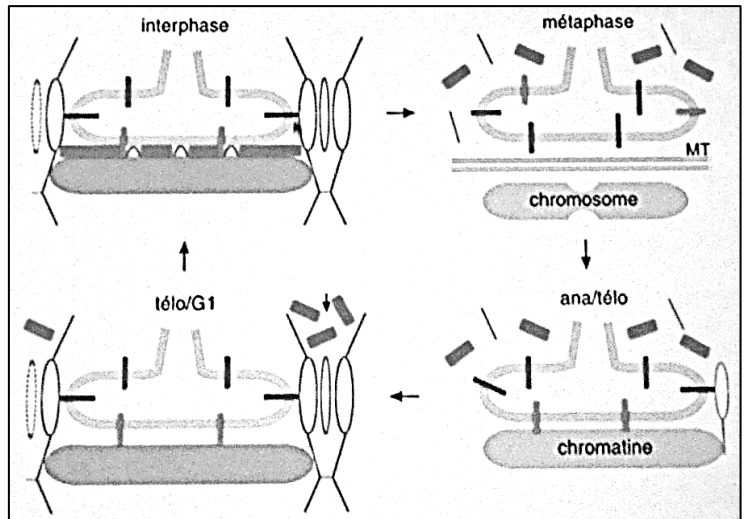
- **Résistance** de l'enveloppe nucléaire au stress (mécanique, thermique...).
- Ancrage sur les **pores nucléaires** responsables du trafic de molécules entre cytoplasme et noyau.
- Association avec la chromatine → rôle dans la **régulation de l'expression des gènes**.
- En continuité avec le cytosquelette cytoplasmique (microfilaments + microtubules).
- Rôle dans la dynamique (destruction et reformation) de la membrane nucléaire pendant le cycle cellulaire (mitose *vu en dessous*).
- Interaction avec des protéines régulatrices de **l'expression des gènes, du cycle cellulaire et de la différenciation**.

Contrairement à une notion ancienne, le noyau ne flotte pas dans le cytoplasme, il est ancré dans la cellule. De plus, un certain nombre de ses mouvements sont dictés par le cytosquelette dans le cytoplasme.

## D. Mitose

On a les membranes interne et externe, les pores nucléaires, les lamines.

On a vu dans les cours précédents qu'au cours de la mitose, les lamines étaient **phosphorylées par MPF** (qui correspond en fait au complexe **Cycline B - CDK1**) ce qui entraîne leur **dépolymérisation** et donc la **destruction de la membrane nucléaire**. Cela contribue de manière majeure à la dynamique des membranes nucléaires pendant le cycle. Du fait de leur **interaction avec la chromatine** et de leur interaction avec certaines **protéines régulatrices des gènes**, les lamines contribuent à toutes les **fonctions cellulaires**.



*Piti recap* : Pendant la **mitose** on a une **phosphorylation sur sérine et thréonine** des lamines par MPF, **destruction** puis **reconstruction** de la **membrane nucléaire**, et enfin **destruction** de MPF en fin de **mitose**.

## E. Les Laminopathies

Quand les lamines A sont **malades**, les noyaux sont plus sensibles au **stress**. Ils ne sont pas complètement désorganisés mais plus fragiles. On a des noyaux où la lamine A est mutée. On observe des trous, des petites hernies, des zones de fracture, toute une série de petits pores qui se forment et **affectent grandement la fonction nucléaire**.

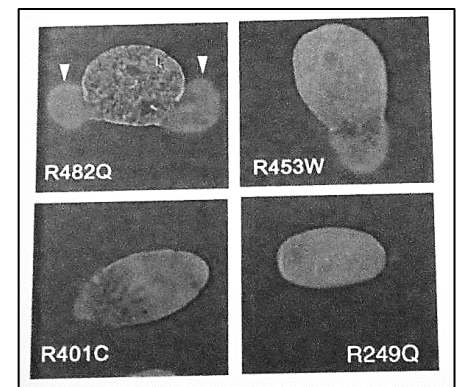
Exemple de mutations de lamine A = R482Q = l'arginine en position 482 est remplacée par la glutamine.

On fait un **double immunomarquage** avec des **lamines B en vert** et des **lamines A/C en rouge**. (Je ne sais pas si vous allez voir grand-chose normalement le plus clair c'est du vert, et le plus foncé c'est du rouge donc sur la première image ça donne verte au centre et deux boules rouges sur les côtés...)

Les **défauts de membrane** dus à des **mutations de la lamine A**, entraînent aussi une **répartition différentielle** entre la **lamine A** et la **lamine B**. Dans les trous ou les défauts on retrouve de la lamine A, et la lamine B est normalement placée.

Les pathologies liées à un dysfonctionnement des lamines sont appelées les **laminopathies**.

Ce sont pour la plupart des **maladies génétiques rares**. On commence néanmoins à penser que dans la population générale, certaines pathologies peuvent être liées de manière non génétique à des dysfonctionnements de la lamine voire à l'utilisation de certains médicaments (situations extrêmes).



Les laminopathies touchent essentiellement les gènes qui donnent les **Lamines A et C** mais aussi des protéines associées de la membrane nucléaire comme l'**Emérine**. Ces pathologies, fonction des mutations, ont des spécificités tissulaires et expressions assez variées : ça **illustre la multifonctionnalité de ces protéines et le caractère complexe de ces maladies**.

Les laminopathies regroupent des dystrophies (musculaires entre autres...), des neuropathies, des désordres métaboliques (lipodystrophie, certaines formes de diabète blablabla ...) et aussi et surtout des **pathologies progéroïdes de vieillissement prématuré**, avec le cas extrême et très rare de la **Progéria d'Hutchinson Gilford**.

(Il ne demande pas de savoir toutes les laminopathies juste la Progéria qu'il va détailler en long, en large et en travers juste en dessous).

## F. Syndrome de Hutchinson Gilford-Progéria = Progéria

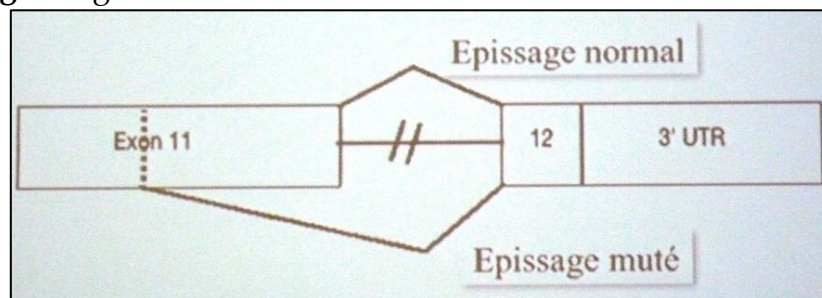
C'est un exemple classique du phénomène de vieillissement accéléré. Cette maladie ne se déclenche pas immédiatement (à la naissance l'enfant est parfaitement normal) mais uniquement au bout de 1 ou 2 ans selon les formes (plus ou moins rapide). Les personnes atteintes ont une mort très prématurée. C'est un syndrome progéroïde **segmentaire** : il ne touche pas tous les tissus ; certains sont tout à fait normaux, notamment le **système nerveux**.

La maladie de Hutchinson-Gilford présente plusieurs **symptômes** :

- **Pas de retard mental.**
- Retard du développement physique, **retard staturo-pondéral +++**
- Retard dentaire, **perte des cheveux**.
- **Perte de tissu adipeux**, atrophie musculaire, ostéoporose.
- Pas de puberté, athérosclérose coronarienne.
- La mort survient souvent avant 20 ans généralement à cause de **problèmes artériels** type infarctus du myocarde.

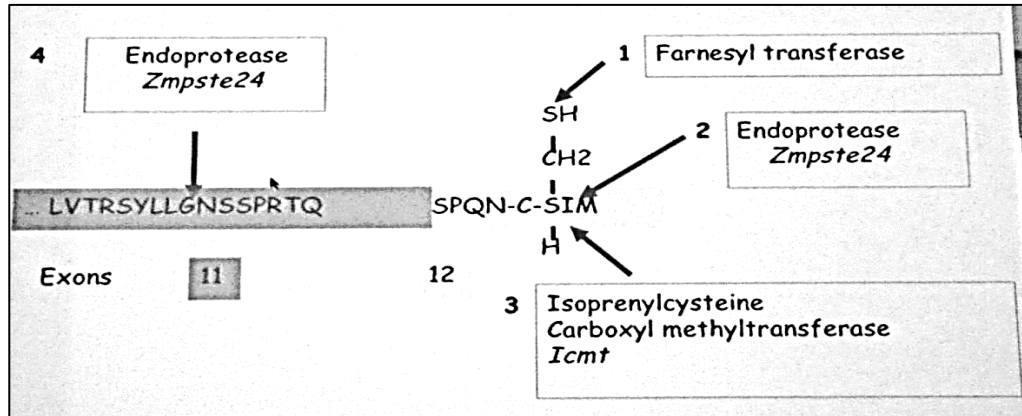
*On a tendance à confondre la Progéria et la maladie de Hutchinson-Gilford, mais en fait la Progéria désigne l'ensemble des maladies à vieillissement prématuré, dont Hutchinson-Gilford fait partie.*

Il s'agit d'une **mutation du gène LMNA de novo** (non prévisible : les parents sont normaux), **dominante** de l'acide aminé (AA), et **silencieuse** (les deux codons donnent une glycine). Mais le fait de remplacer C par T va changer les sites accepteurs et donneurs de l'épissage c'est donc **une mutation d'épissage**. Le gène LMNA est constitué de 12 exons.

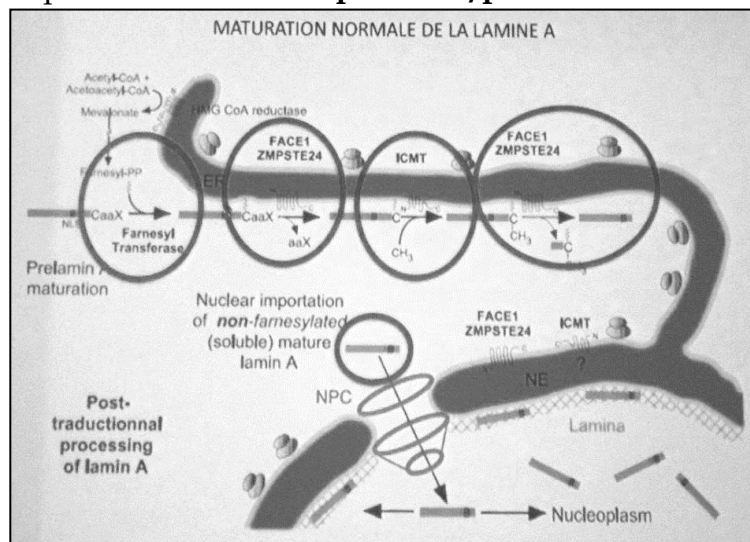


- Physiologiquement : la **fin de l'exon 11** est épissé avec le début de l'exon 12.
- Progéria : la mutation au **codon 608** entraîne la création d'un **nouveau site d'épissage** reconnu par la machinerie cellulaire, et on va avoir une **délétion des 50 derniers AA de l'exon 11**. Il y a donc production d'une **lamine A** avec une **délétion interne de 50 acides aminés**.

## 1) Maturation normale de la lamine A :



1. Une farnésyltransférase agit sur la cystéine en C-term : la protéine est accrochée sur la face interne de la membrane du RE.
  2. L'endoprotéase Zmpste 24 clive les 3 derniers AA de la partie C-term.
  3. Une Carboxyle méthyltransférase méthyle le résidu terminal.
  4. Zmpste24 revient de manière interne pour aller cliver la partie C-term, elle libère la protéine (la lamine A mature n'est donc pas farnésylée contrairement à la pré-lamine A).
- La lamine A est libérée, elle va dans le noyau grâce aux pores nucléaires et va s'attacher à la membrane interne par des interactions protéines/protéines.



## 2) Maturation anormale de la lamine A :

1. Farnésylation.
  2. Clivage par Zmpste 24.
  3. Méthylation par la carboxyle-méthyltransférase.
  4. Le deuxième clivage n'a pas lieu car la délétion enlève la zone reconnue par Zmpste24.
- La protéine va rester bloquée dans la membrane : la délétion empêche la maturation normale de la lamine A.

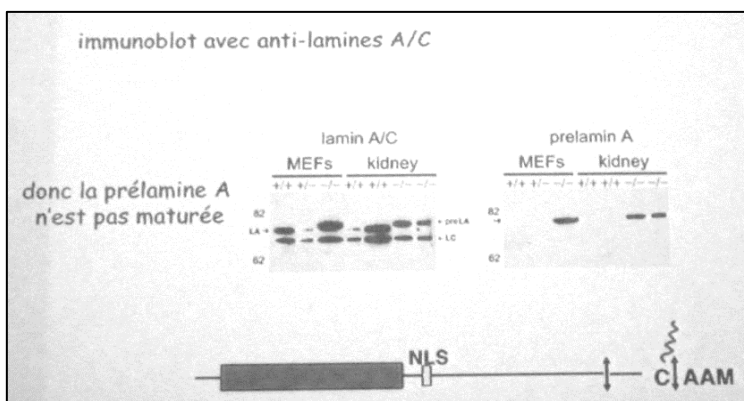
Ce gène est **dominant**, il suffit que quelques exemplaires soient mutés pour que le patient soit malade. Il y a un effet toxique dit **gain de fonction**. La lamine A non maturée ou **pré-lamine A (qui est donc farnésylée)** ou **progérine (on a appelé la pré-lamine A farnésylée progérine)** va **s'accumuler et être responsable de la maladie**. Cette progérine est aussi présente dans des cellules saines, en quantité très limitée, mais cette **quantité augmente avec l'âge** (car sans mutation les systèmes d'épissage se trompent et créent de la progérine → la progérine contribue aussi sûrement au vieillissement normal).

On a étudié cette maladie, à partir de modèles cellulaires, mais aussi des modèles animaux pour être au plus près de la réalité tissulaire.

➤ Expérience avec des souris KO

**KO** = on a invalidé un gène par modifications génétiques.

On prend une souris KO pour le gène **Zmpste24**. → Elle meurt très rapidement (en 4 semaines) en mimant les symptômes de la pathologie humaine (sénescence précoce). Sur un **immunoblot** avec **anti lamine A/C**, on retrouve une **accumulation** des formes non maturée de lamine A : la **prélamine A/progérine**.



On observe une **dégénérescence** et une **fibrose**

du **tissu cardiaque**, souvent observé chez des patients qui meurent de **maladies cardio-vasculaires**.

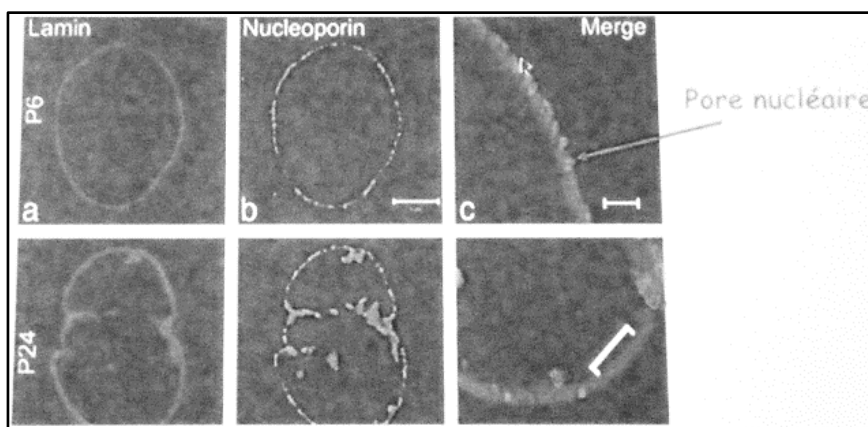
Quand on a une mutation aussi forte, on essaye de voir si on ne trouve pas une situation où les souris ne meurent pas tout de suite. On essaye en regardant la **même mutation** à l'état **hétérozygote** : on cherche à savoir si cette **délétion de Zmpste24** est toujours aussi néfaste si on a une **perte quantitative de la lamine**.

On prend des souris doubles transgéniques :

- Souris **KO pour Zmpste24** avec une **lamine A normale** → meurt très rapidement
- Souris **KO pour Zmpste24** avec **moins de lamine A** (hétérozygote pour la lamine A, donc synthétise moins de lamine A) → on restaure partiellement le phénotype normal/sauvage : les cellules ne sont pas normales mais **moins anormales** (on a une diminution des anomalies nucléaires).

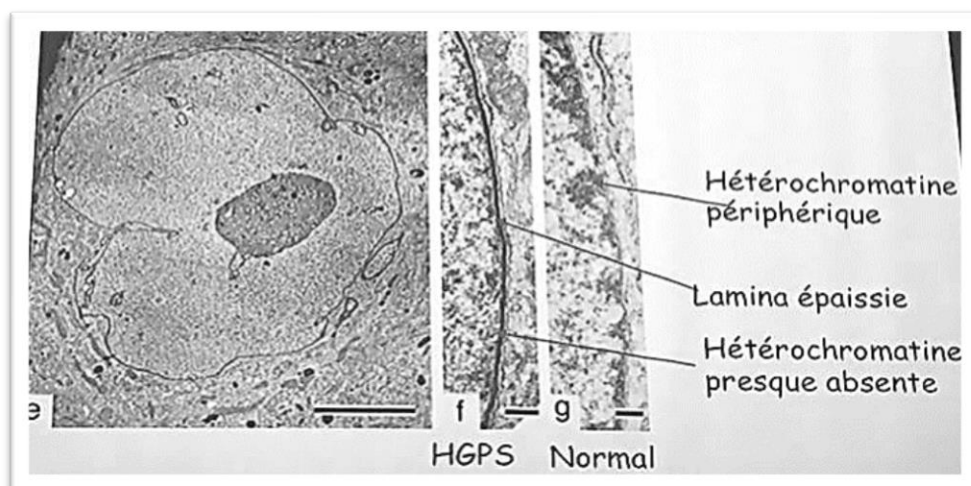
**L'expérience montre que l'accumulation de la lamine farnésylée est toxique pour nos cellules.**

On a fait des expériences pour étudier plus précisément l'effet de la délétion des 50 acides aminés sur les noyaux des cellules. Pour cela on a mimé chez des cellules saines une accumulation de prélamine A, afin d'étudier ces cellules modifiées.



On remarque alors que dans un noyau normal, les pores nucléaires sont répartis sur toute la surface de la paroi nucléaire, alors que dans les **cellules qui sur-expriment la prélamine A**, il y a une **désorganisation dramatique de la membrane**, on a des **zones de la membrane dépourvues** de pores nucléaires, et **d'autres avec une grosse accumulation de pores nucléaires**. (je me doute qu'en noir et blanc ça doit pas rendre ouf, mais en gros on voit juste des pores nucléaires qui s'accumulent dans une zone de la membrane nucléaire.)

Si on regarde en ME les **zones d'hétérochromatine** (c'est une des fonctions de la lamina d'accrocher l'hétérochromatine) :



On remarque que l'on a une **hétérochromatine périphérique quasi inexistante** dans le cas des cellules HGPS (Hutchinson-Gilson). L'hétérochromatine intervient dans l'**expression de certains gènes**, et permet une **expression coordonnée de ces gènes**. Ici les gènes s'expriment un peu n'importe comment entraînant des très situations délétères.

La **délétion des 50 acides aminés (del50)** entraîne donc :

- **Anomalie de l'enveloppe nucléaire** (mauvaise répartition des pores...)
- **Désorganisation de l'hétérochromatine périphérique.**
- **Apparition d'agrégats de prélamine = toxicité.**

Ce n'est pas uniquement pour améliorer la vie de ces enfants que l'on étudie cette maladie. En effet, cette accumulation de prélamine A se produit, comme dit plus haut, à l'état normal dans la personne vieillissante. **Ce phénomène génétique extrême reflète un phénomène qui se produit, très faiblement, au cours du vieillissement normal.** On commence tous à accumuler de la prélamine A dans nos cellules en vieillissant et peut être une partie des mécanismes de la progéria correspondent à des mécanismes physio.

La médecine actuelle est souvent tournée vers des études sur des pathologies qui sont très rares, importantes pour les patients malades, et en plus ces maladies permettent souvent d'étudier au passage des mécanismes cellulaires de la population générale.

Par exemple, certaines mutations germinales prédisposent au cancer du sein (situation extrême). On retrouve des mutations somatiques du même gène dans les tumeurs de sein de la population générale. Il est important d'étudier les maladies rares pour soigner les patients concernés et pour comprendre des pathologies plus générales.

On a cherché un traitement pour limiter les dégâts provoqués par la maladie de Hutchinson.

On a d'abord pensé à **inhiber la farnésylation**. :

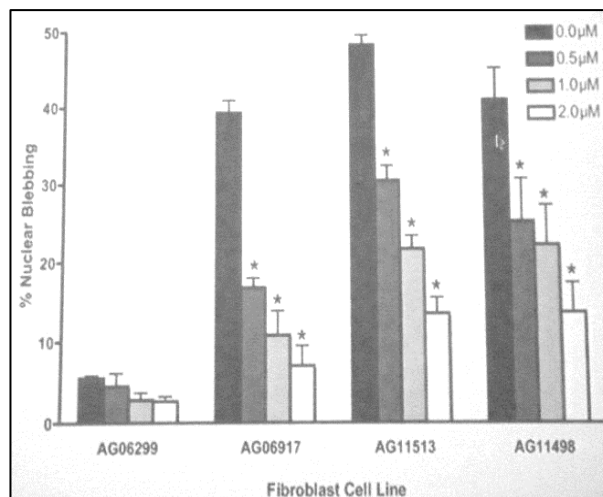
La farnésylation est aussi utilisée par d'autres protéines dans nos cellules dont la protéine RAS (que vous reverrez plus tard dans la signalisation cellulaire) qui est située sur la face cytosolique de la membrane plasmique. La protéine RAS est farnésylée et impliquée par une mutation somatique dans de nombreux de **cancer**. Ainsi les chercheurs ont déjà pensé depuis longtemps à **inhiber la farnésylation de RAS pour soigner ces cancers** causés par une hyperactivation de RAS (totalement indépendamment de la progéria). Des études en phase III de traitement de ces cancers sont en cours.

Les molécules existant déjà, on peut les utiliser et les appliquer à la progéria !

On a ainsi fait des expériences sur des cellules avec Progéria en utilisant ces inhibiteurs de la farnésylation. En ordonnée on a le nombre de défauts nucléaires observés, et en abscisse différentes lignées de fibroblastes.

On les traite avec des **concentrations croissantes d'inhibiteur de la farnésylation** → **on diminue les défauts nucléaires en traitant avec des inhibiteurs de la farnésylation.**

MAIS comment souvent avec les thérapies ciblées, **la maladie reprend le dessus** avec des voies alternatives pour contrecarrer cette inhibition spécifique ciblée.



En inhibant la farnésylation, les lamines A ont trouvé une **voie alternative = la géranylgeranylation** qui est une autre façon d'accrocher la lamine à la membrane.

Les chercheurs cherchent à faire une **double inhibition de la farnésylation** (avec des statines) et de la **géranylgeranylation** (avec des aminobiphosphonate), des essais cliniques sont en cours.

Un autre problème se pose : quand doit-on traiter les gens atteints de la Maladie de Hutchinson-Gilford ? Car généralement, si les symptômes sont apparus c'est qu'il est déjà trop tard... On cherche donc aussi à améliorer les conditions de vie, même s'il est trop tard pour la sauver.

Le prof a fini le cours sur le cytosquelette. On passe au noyau.

## STRUCTURE ET ORGANISATION FONCTIONNELLE DU NOYAU

On passe à un cours méga important sur le noyau. Aujourd'hui, on ne va aborder que les généralités donc rassurez-vous, la suite du cours n'est pas compliquée. Cette partie va être en écho avec les enseignements de biologie moléculaire au niveau des mécanismes de transcription et de réplication.

### I. LE DOGME DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE

Le dogme de la biologie moléculaire se définit comme :

**ADN → Transcription → ARN → Traduction → Protéines**

L'ADN (**génome**) concerne le **génotype** alors que l'ARN (**transcriptome**) et les protéines (**protéome**) concernent le **phénotype** (=ce que l'on peut observer d'un organisme, dépend du **génotype** et de l'**environnement**)

Il faut savoir qu'il y a une **amplification du signal** (un ADN sera transcrit en beaucoup d'ARN, et chacun de ces ARN sera traduit en beaucoup de protéines).

Grâce à des techniques d'analyses à haut débit et de nanotechnologie, on est aujourd'hui capables d'identifier et d'analyser entièrement le génome, le transcriptome et la protéome (science des omiques).

En vérité, pour vraiment comprendre tout cela, il faudrait parler non pas d'**ADN**, mais y ajouter les **protéines qui interagissent avec celui-ci**, on parlera donc plus de **chromatine** dans ce cours (*la chromatine correspond à l'ADN + les protéines qui interagissent avec*). C'est cette même chromatine qui est **transcrite** et qui est **répliquée** (lors de la mitose, l'organisation de la chromatine est conservée). L'information véritable du génotype présent dans nos cellules n'est pas entièrement déterminée par la **séquence d'ADN**, et donc le **génotype**, mais également par **la structure et l'organisation de l'ADN dans le noyau**. A la notion de **génome** se superpose une notion plus exacte **d'épigénome**.

**Epigénome** = ce que l'on transmet à nos cellules fille, à nos enfants, ce n'est pas uniquement la séquence de nos gènes mais aussi la séquence de nos gènes dans un certain **environnement** qui correspond à la **structure de la chromatine** pris au sens large.

On a environ **20 000 gènes** dans nos cellules, mais ils ne sont pas tous exprimés en même temps (*on dit qu'un gène s'exprime quand il est transcrit en ARN*) : on exprime **uniquement les gènes dont on a besoin**. Certains gènes s'expriment, ils sont transcrits : ce sont des gènes dits **ON**. Les autres qui ne s'expriment pas sont dits **OFF**.

Si on prend nos cellules, tous les gènes sont à peu près les mêmes, mais il existe une très grande différence sur lesquels sont ON et lesquels sont OFF. Dans nos cellules adultes, **la plupart des gènes sont OFF : 10% seulement des gènes s'expriment** dans les différents types cellules (les gènes qui s'expriment sont différents en fonction de l'organe considéré). La notion de gènes **ON/OFF** est centrale pour la vie de la cellule.

Un gène ON est **transcrit**, éventuellement **épissé**, transporté dans le cytoplasme sous forme d'ARNm, traduit en protéines, puis la protéine en question va aller là où elle doit agir (noyau...).

## II. NOTION DE PROGRAMME TRANSCRIPTIONNEL

Le **programme transcriptionnel** c'est ce qui **détermine** que certains **gènes soient ON/OFF**, et tout cela est déterminé par la **cellule** en fonction de **signaux externes** (hormones, molécules de signalisation, facteurs de croissance...) ou encore des **signaux physiques** (lumière, chaleur, signaux mécaniques...) et aussi des **signaux internes** (nombre de divisions qu'a fait la cellule, rythmes biologiques...) qu'elle **reconnaît** et **interprète** (elle les intègre et décide en fonction de l'intégration de l'ensemble de ces signaux).

➤ *Exemple d'expérience : expression d'un facteur de transcription myogénique chez un fibroblaste*

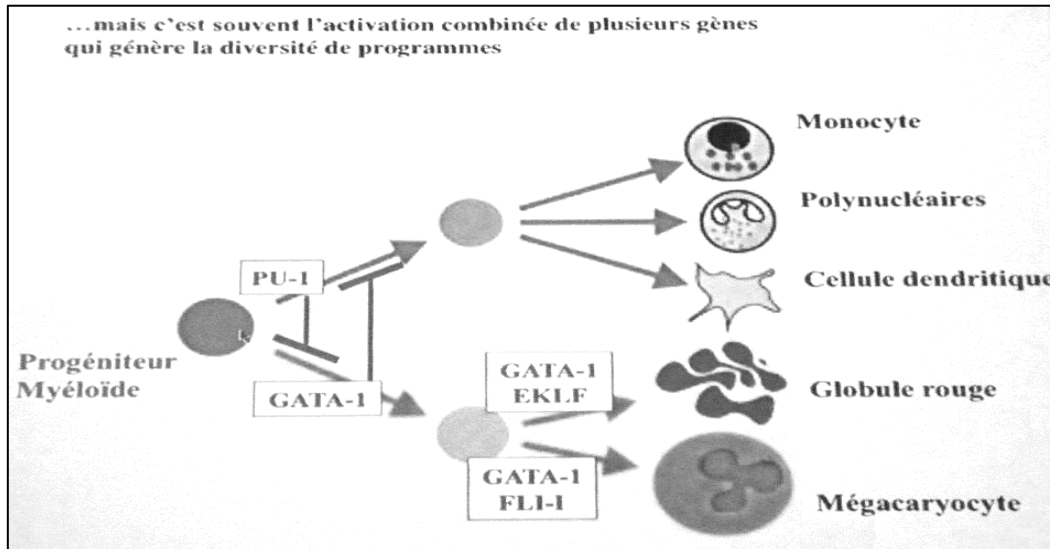
On prend un fibroblaste sur lequel on active un gène qui est normalement OFF (comme un gène caractéristique des cellules musculaires), on peut transformer ce fibroblaste en cellule musculaire (c'est ce qu'on appelle une **transdifférenciation** et cela peut arriver rarement de manière physiologique aussi). Ces programmes transcriptionnels sont essentiels dans les **phénomènes de différenciation**.

➤ *Exemple d'expérience : les progéniteurs Myéloïde (revu en histologie et plus tard hématologie)*

C'est ce qu'il se passe dans la moelle osseuse tous les jours quand on veut générer nos lignées de cellules sanguines. A partir d'un progéniteur myéloïde, on a deux grands types de différenciation possibles : la voie **monocytaire** et celle qui aboutit au **globule rouge**.

La cellule progénitrice peut aller dans les deux directions : elle décide selon les facteurs de transcription spécifique qu'elle reçoit.

- ➔ **PU1** entraîne la lignée **vers la voie monocytaire** et en même temps **inhibe** les gènes de la **voie de différenciation des globules rouges**.
- ➔ **GATA-1** entraîne la lignée **vers la différenciation en globule rouge** et en même temps **inhibe** les gènes de différenciation de la **lignée monocytaire**.



Les cellules ayant exprimé **GATA-1** doivent alors exprimer ensuite **EKLf** pour devenir des **Globules Rouges**. Donc pour devenir des **Globules Rouge**, le précurseur doit tout d'abord avoir dans sa **mémoire** l'expression de **GATA-1**, et doit aussi exprimer en plus **EKLf**.

Donc pour obtenir un globule rouge, il faut que chacune des cellules intermédiaires aient eu une certaine histoire qui la conduise vers la différenciation en globule rouge.

## A. Mécanismes de régulation de l'expression des gènes

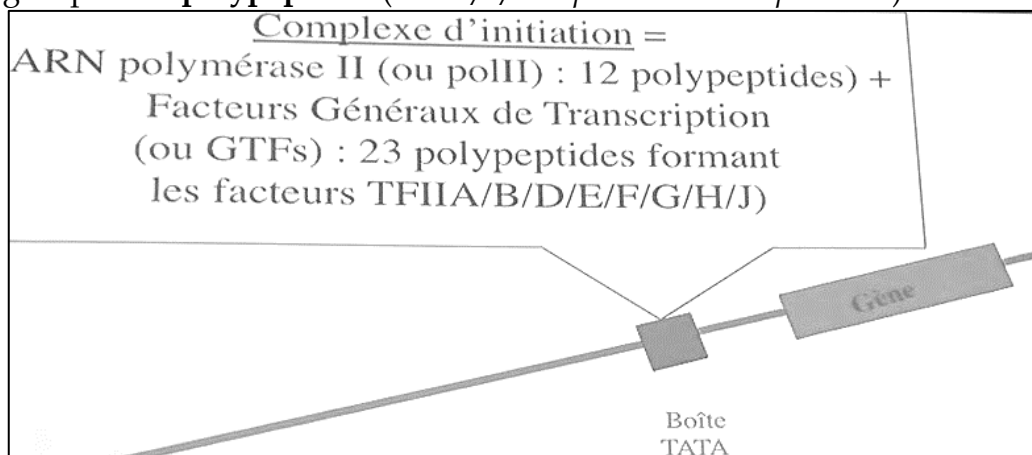
### 1) Compaction de la chromatine

En fait, il faut déjà savoir que pour réguler les gènes, le mécanisme principal va être de réguler la **conformation** et l'**organisation structurale** de ces **gènes** : un gène **OFF** va posséder une chromatine **compactée/fermée** tandis qu'un gène **ON** aura une chromatine **ouverte** et donc **accessible à l'ARN polymérase et à la machinerie de transcription**. De ce fait, même si les signaux régulant l'expression des gènes disparaissent, la **conformation de la chromatine reste** et ainsi la **cellule garde en mémoire l'expression ou non des gènes**.

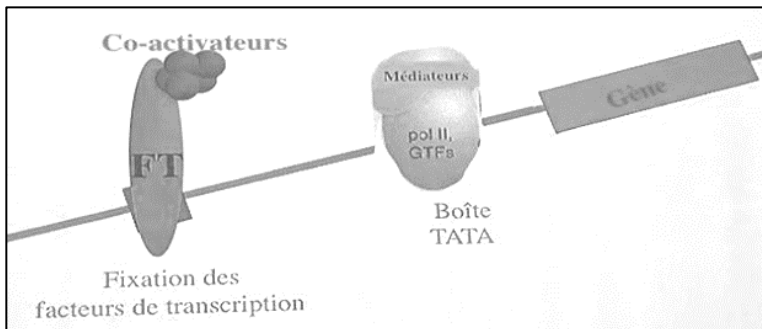
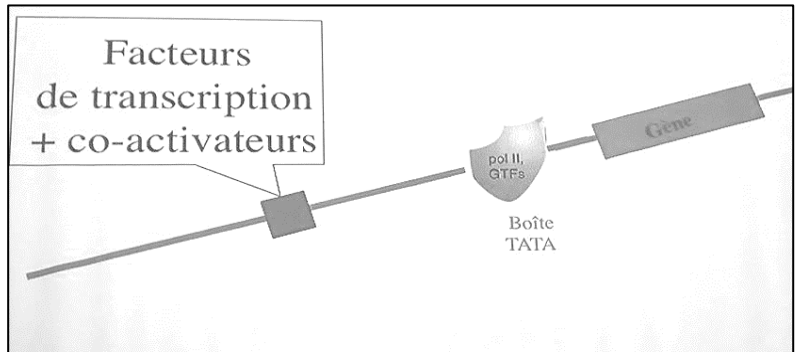
- Gène ON → chromatine ouverte
- Gène OFF → chromatine fermée

### 2) Contrôle proximal de la transcription

La transcription prend naissance au niveau du **promoteur** (=séquence d'ADN en amont du gène et qui détermine l'arrivée de l'ARN polymérase au niveau du gène). Ce **promoteur** est formé de la **boîte TATA** qui reconnaît le **complexe d'initiation**. Ce **complexe d'initiation** est composé l'ARN polymérase II, elle-même composée de **12 polypeptides**, et des **facteurs généraux de transcription (GTFs)** qui regroupent **23 polypeptides** (*TFIIA/B/C... pas à connaître par cœur*).



En mettant ce **complexe d'initiation** dans un tube à essai avec un gène, des chercheurs ont remarqué que la polymérase et les facteurs se fixaient mais qu'il n'y avait pas de transcription. En fait cette fixation n'est **pas stable**. Ils ont alors trouvé qu'il existait d'autres protéines = **facteurs de transcription** qui se **fixent** à d'autres endroits du promoteur, et recrutent encore d'autres protéines = les **coactivateurs**.



En remettant tout ça dans un tube à essai, ils n'ont toujours pas eu de transcription (ou du moins très peu), donc il manque encore quelque-chose. Ils ont donc découvert un autre complexe = le **complexe médiateur**. Le **complexe médiateur** s'associe au **complexe d'initiation** (ARN polymérase + GTFs) et qui sert d'**intermédiaire** entre le **facteur de transcription** et l'**ARN polymérase**.

**Du coup c'est en fait le facteur de transcription qui stabilise l'ARN polymérase sur la boîte TATA par l'intermédiaire des médiateurs.**

Les facteurs de transcription ont **deux grands domaines** :

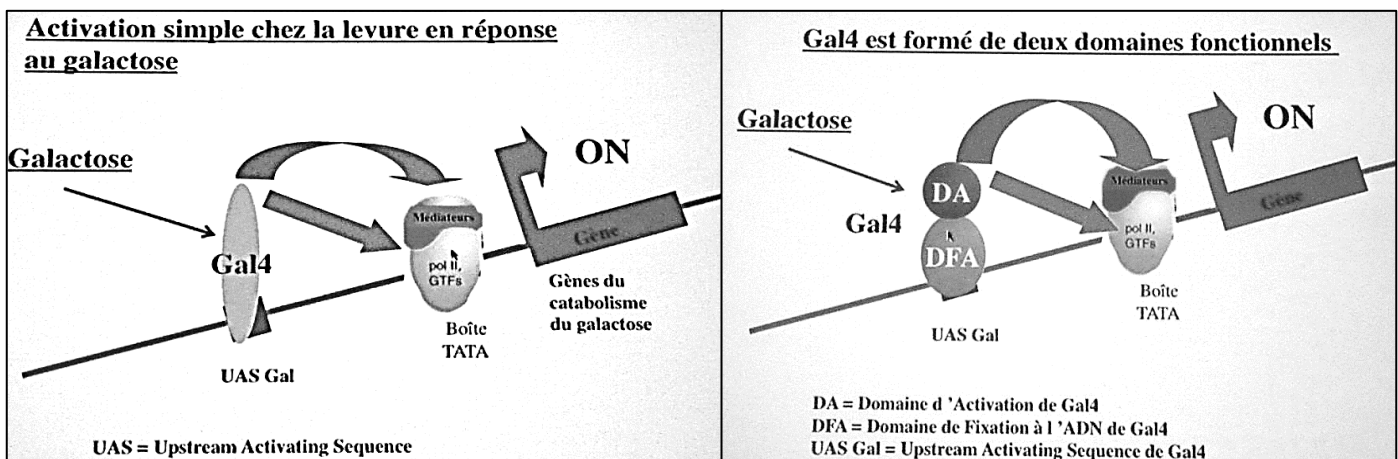
- Le **domaine de fixation** qui se fixe au promoteur et qui donne sa **spécificité** au facteur de transcription.
- Le **domaine d'activation** qui interagit avec les **médiateurs** pour **stabiliser l'ARN polymérase**.

Ces deux domaines **appartiennent à la même protéine** mais ils **peuvent être séparés et intervertis artificiellement**.

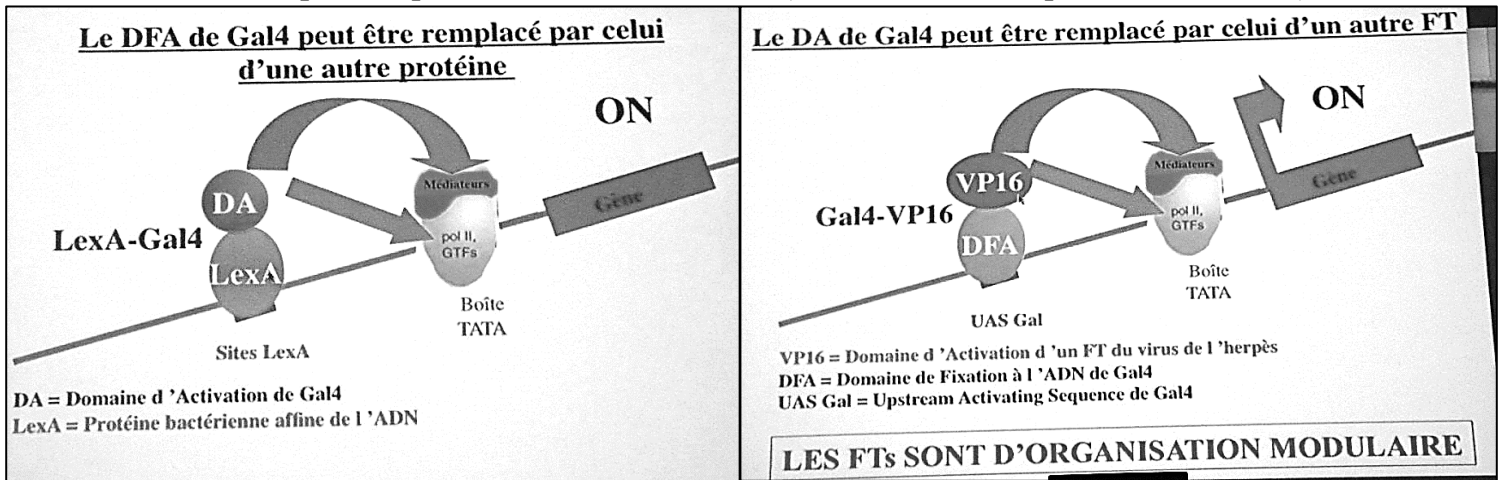
- *Exemple d'expérience : réaction de la levure en présence de galactose*

Si l'on met du **galactose** dans le milieu de culture d'une **levure**, alors elle va exprimer les **gènes** correspondant au **catabolisme du galactose**. En fait le facteur de transcription **Gal4** va se fixer sur le site de fixation (**UAS** chez la levure/**Eléments de réponse (ER)** chez nous) et va ainsi fabriquer des médiateurs...

Dans le cas de **Gal4**, le **domaine de fixation** est appelé **DFA** et le **domaine d'activation** est appelé **DA**.



Si l'on remplace **DFA** par un autre **domaine de fixation** (LexA = domaine de fixation d'origine bactérienne), on a quand même transcription. De même, si l'on remplace **DA** par un autre **domaine d'activation** (VP16 = domaine d'activation d'origine virale) on a quand même transcription. Donc cette expérience montre que les **domaines d'activation et de reconnaissance d'un facteur de transcription** sont **séparables** et qu'il est possible de les **intervertir** (même avec des espèces différentes !).



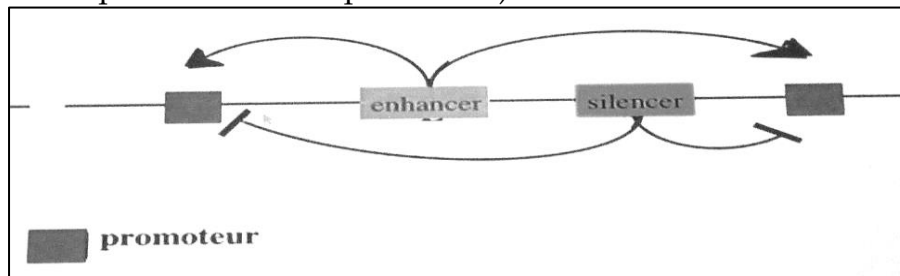
→ Les facteurs de transcription sont **d'organisation modulaire** (ce qui veut dire que les facteurs de transcription sont composés de plus petits modules interchangeables).

Les contrôles proximaux sont des **mécanismes très conservés** avec des **phénomènes universels** (un virus de l'herpès fonctionne chez la levure).

### 3) Contrôle distal de la transcription : les enhancers et les silencers

On a compris ce qu'il se passait au niveau des promoteurs, mais ce n'est qu'un niveau de régulation. Ce qui se passe au niveau des promoteurs ne constitue pas l'ensemble des éléments qui se déroulent : il existe aussi des **contrôles distaux**.

Chez les mammifères (et les métazoaires en général), on a des contrôles distaux (les bactéries ne comportent quant à elle que des contrôles proximaux).



Il y a d'autres séquences qui vont être importantes pour déterminer si le gène est ON ou OFF. Le contrôle distal (jusqu'à plusieurs kilobases) de la transcription se fait par deux catégories de séquence : les **enhancers** et les **silencers**.

Ils sont très différents des promoteurs, en effet :

- Ils ont une **position variable** par rapport au promoteur (en 5' ou 3').
- Ils peuvent être **très éloignés** (à des milliers voire des millions de paires de base).
- Ils agissent **indifféremment de l'orientation**.
- La plupart agissent de manière éloignée mais en **cis** (appartiennent au même chromosome) ; il y a des exceptions : certains enhancers peuvent agir en trans (c'est-à-dire sur un autre chromosome) mais c'est très peu fréquent.

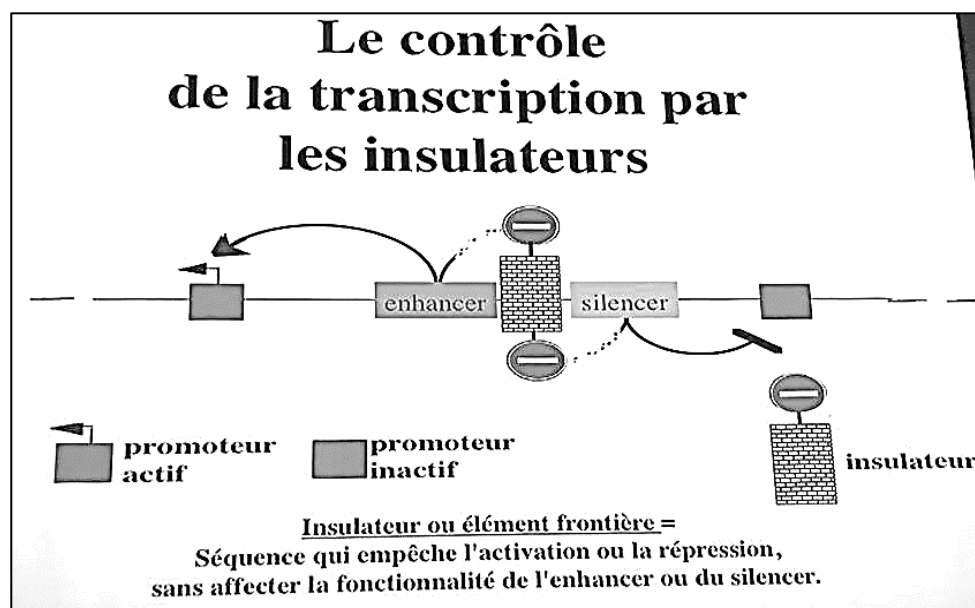
Les **enhancers** sont **activateurs**, les **silencers** sont **inhibiteurs** de la transcription.

C'est des phénomènes de régulation qui **agissent à distance** et sont essentiels pour l'expression tissu/spécifique des gènes.

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.

L'action à **distance** de ces éléments induit une possible action sur le même gène en même temps des enhancers et des silencers, ce qui créerait une cacophonie dans la régulation. Ainsi, les chercheurs se sont demandé s'il n'y avait pas un autre élément qui intervenait pour **segmenter** cette **régulation distale**.

#### 4) Contrôle distal de la transcription : les insulateurs

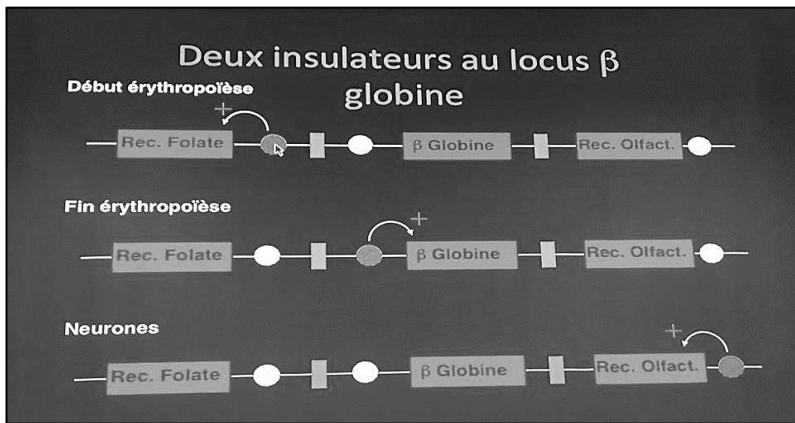


Les **insulateurs** permettent de mettre un peu d'ordre dans tout ça. Ils permettent de **donner un sens à l'action des silencers et des enhancers**. Ces éléments **frontières** n'empêchent pas l'action des enhancers et des silencers dans notre génome, mais vont les empêcher d'agir dans **une direction**. *En fait ce sont comme des espèces de « mûrs » qui bloquent l'action des silencers et des enhancers plus loin, le schéma aide vachement à comprendre. Sur ce schéma l'insulateur du milieu empêche l'enhancer de gauche de favoriser la transcription plus à droite, et empêche le silencer de droite d'aller inhiber la transcription plus à gauche.*

**Ces insulateurs définissent des domaines de régulation spécifique dans notre génome**

#### ➤ Exemple : l'érythropoïèse

On a trois gènes, et on va voir ce qu'il se passe dans différentes cellules. On a à côté dans notre génome, le gène du récepteur folate, le gène  $\beta$ -globine (les deux impliqués dans l'érythropoïèse) et juste à côté, qui n'a rien à avoir, un gène de la grande famille des récepteurs olfactifs (exprimé dans certaines cellules nerveuses). On a des **enhancers tissu-spécifiques** qui déterminent l'expression de ces gènes.



En début d'érythropoïèse :

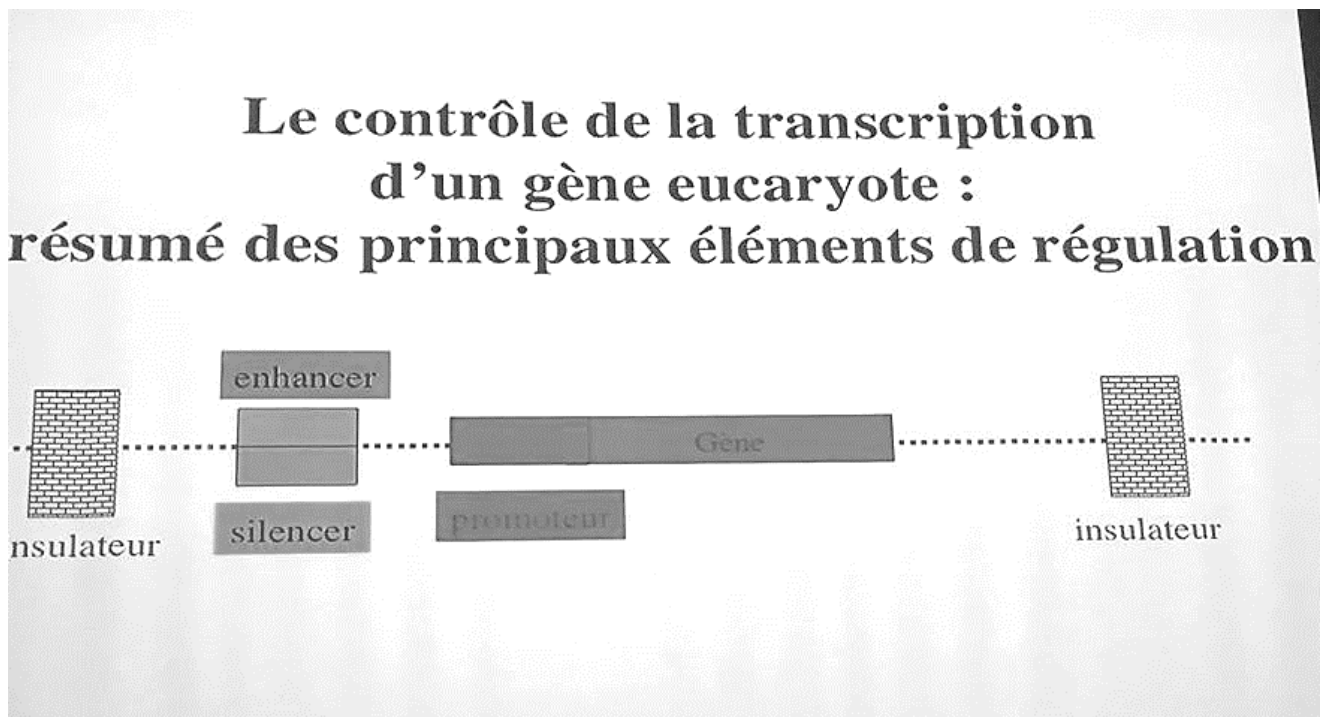
Le gène des récepteurs folate est ON, le gène de la β-globine n'est pas encore utile, et celui des récepteurs olfactifs est totalement inutile : ils sont OFF.

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 mais pas nécessairement : on peut avoir des domaines encadrés par des insulateurs composés de plusieurs gènes.



Je vous remets le tableau récap de l'année dernière 😊

Contrôle Proximal	Contrôle distaux	Régulation différentielle/ distal
<b>Promoteur</b>	<b>Enhancers &amp; Silencers</b>	<b>Insulateurs</b>
En amont du gène	Position variable ++ à <b>distance</b>	<b>A distance</b>
Agit de manière <b>unidirectionnelle</b>	Agissent dans les <b>deux directions</b>	Réduisent les <b>enhancers</b> et les <b>silencers</b> à <b>une seule direction</b>

### III. STRUCTURE DE LA CHROMATINE

#### A. Compaction de l'ADN nucléaire

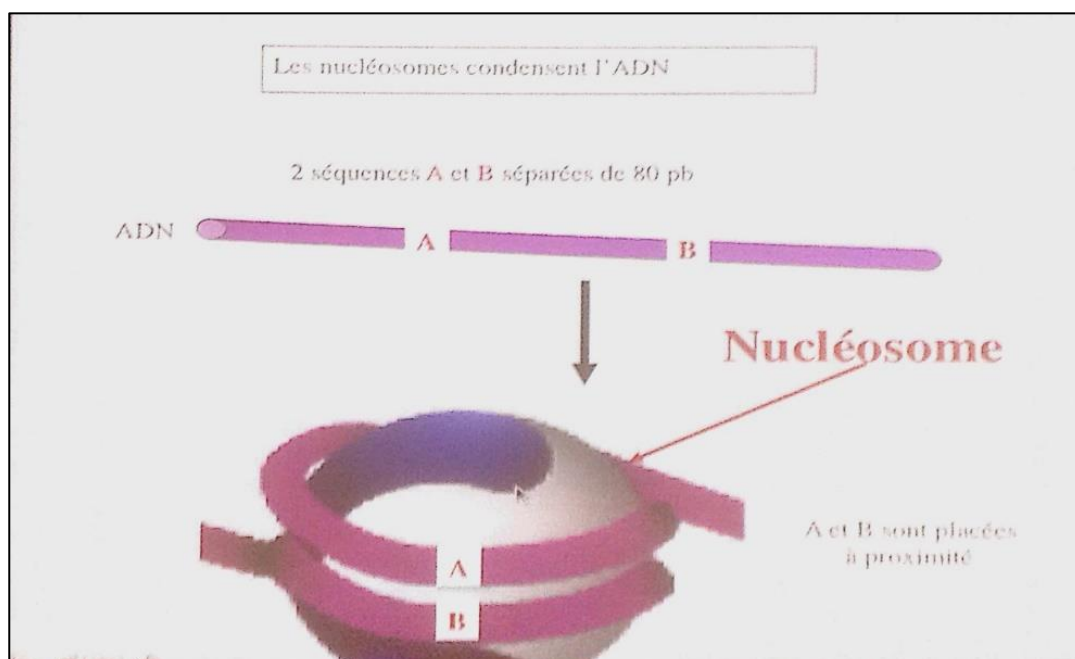
La chromatine est le support des modifications liées aux facteurs de transcription et à l'expression des gènes. En effet, elle constitue la façon dont l'ADN est organisé dans nos cellules : l'ADN n'est pas "nu", comme on va le voir.

Chez l'Homme, le génome diploïde est composé de 6 milliards de pb (2 copies de 3 milliards) alors que chez la levure, il y en a 200 fois moins. **La taille totale de tout l'ADN dans chaque cellule fait 2 m qu'il faut faire rentrer dans un noyau inférieur à 10 microns (avec un volume de noyau de 400 à 1000 $\mu^3$ ).**

Comme on peut le constater, il faut que l'ADN se **compacte** plusieurs milliers de fois pour entrer dans un noyau eucaryote. **Ce phénomène de compaction est indispensable pour pouvoir contenir l'ensemble du génome dans le noyau.** Pour donner une équivalence, c'est comme si on voulait faire rentrer un fil fin de 40 km dans une balle de tennis.

	Génome diploïde	Taille totale	Diamètre du noyau	Volume du noyau
Homme	$5,8 \times 10^9$ pb	2m	10 $\mu$	400-1000 $\mu^3$
Levure	$2,7 \times 10^7$ pb	$9 \times 10^{-2}$ m	2 $\mu$	4,2 $\mu^3$

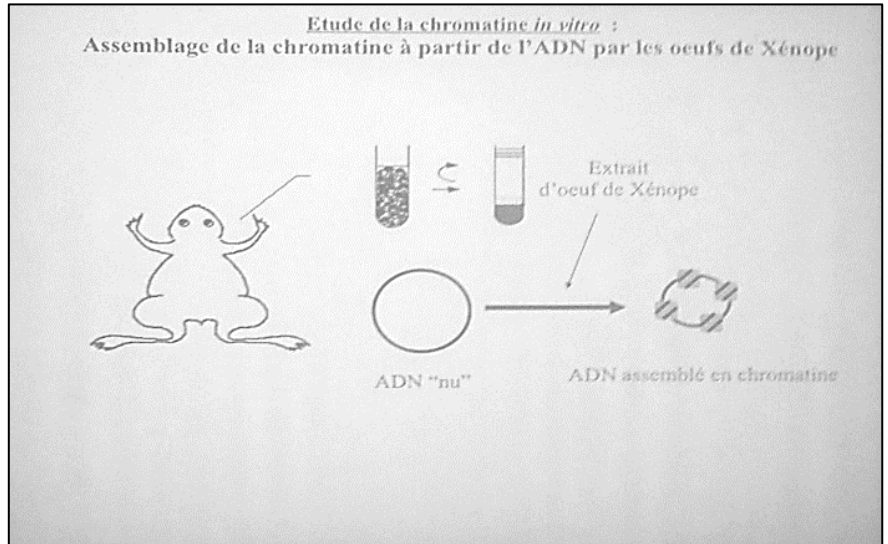
Par exemple, si on prend une molécule d'ADN avec deux nucléotides A et B séparés de 80 pb dans une **structure linéaire, une fois dans le noyau, ils vont être placés à proximité** : cela est dû au **premier niveau de compaction de l'ADN : le nucléosome**. Un nucléosome va être entouré d'environ 150 pb, et grâce à ça nos séquences A et B peuvent se retrouver très proches.



- ⇒ L'ADN va s'entourer autour de protéines histones pour former la structure de nucléosome.
- ⇒ Le **nucléosome** est le premier niveau de compaction de l'ADN.
- ⇒ Il est **formé** de la **molécule d'ADN** et de **8 molécules d'histones**.
- ⇒ Le nucléosome est un **octamère** correspondant à l'élément de base de la chromatine.

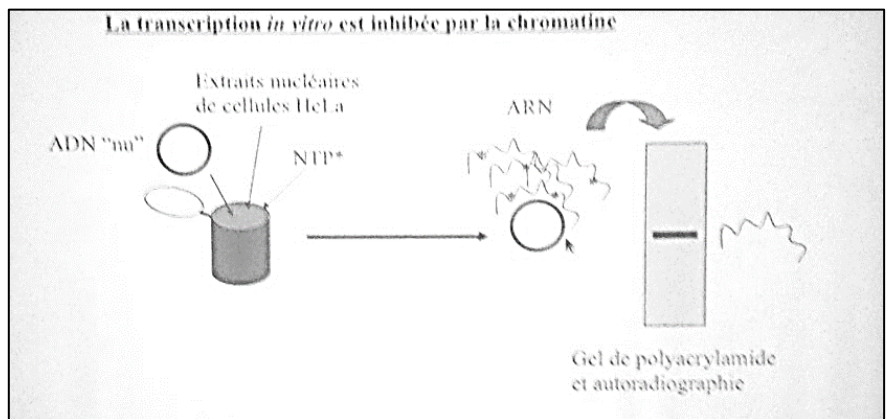
### Exemple d'expérience : Etude de la chromatine in-vitro

On prend un **ADN circulaire "nu"** (*ça n'existe pas en vrai*) que l'on met dans un tube à essai. On met cet ADN nu en présence **d'extraits d'œufs de Xénope** (les œufs de Xénope contiennent tout ce qu'il faut pour faire de la chromatine et de manière concentrée). On obtient alors **un ADN très compacté**, sous forme de **chromatine s'opposant à l'expression des gènes**.



On fait une **transcription in-vitro** en présence d'ADN nu, de **NTP radioactifs** et d'**extraits nucléaires de cellules** là où il y a **transcription**. Lorsqu'on fait une autoradiographie, on voit que **l'ARN est visible** sur le gel de polyacrylamide, il y a donc **transcription**.

En revanche, si l'on remplace l'ADN nu par de **l'ADN obtenu à partir des œufs de Xénope** (très compacté), il ne se passe rien il n'y a donc **pas transcription**, et donc la **structure de la chromatine est un inhibiteur de la transcription**.



*Le cours se finit ici, vous verrez dans le prochain comment on peut modifier la compaction de la chromatine pour réguler l'expression des gènes.*

*Dédicace à mes p'tits élèves, courage à vous !*