



BIOLOGIE CELLULAIRE

PASS – LAS



MILAN LEBRE

Fiches

Pr. Gilson
Archéus
Karis'tone





Structure & organisation fonctionnelle du noyau



A) Généralités sur l'expression génique

Rappels de Biologie Moléculaire

Le dogme de la biologie moléculaire, qui a évolué au fil du temps, mais qui reste basique, décrit les principales étapes de l'expression. L'information héréditaire qu'on reçoit de ses parents est contenue essentiellement dans les molécules d'ADN du génome, mais cet ADN seul ne sert à rien, il faut qu'il puisse être exprimé pour faire des molécules qui vont être utiles à la cellule et à l'organisme.

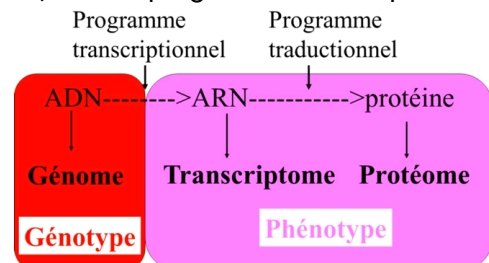
Ces molécules peuvent être des molécules d'ARN seules, en tant qu'ARN, c'est ce que l'on appelle les ARN non codants, mais certaines séquences d'ADN vont déterminer la synthèse d'autres types d'ARN, qui eux, ne servent que d'intermédiaires : ce sont des ARN messagers (ARNm), pour former des protéines qui seront utiles pour la cellule. Le passage de l'ADN vers l'ARN, non codant ou messenger, se fait grâce à la transcription. Le passage des ARN en protéines se fait via la traduction.

Tous les gènes contenus dans l'ADN ne sont pas exprimés au même moment dans la cellule, ou au même moment du développement. Les gènes exprimés, transcrits ou pas, vont déterminer le programme transcriptionnel. Ces notions de programme sont très importantes car elles déterminent le phénotype de la cellule.

Quelques définitions

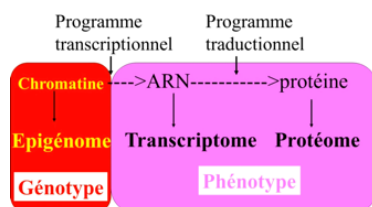
Actuellement, on est en capacité de déterminer la séquence de tout le génome, grâce à des techniques extrêmement sophistiquées, on peut déterminer tous les ARN d'un type cellulaire, on peut déterminer, non pas le contenu possible de tous les ARN, mais le programme transcriptionnel d'un type cellulaire : le **transcriptome**.

Il y a exactement le même raisonnement pour les protéines, les protéines réellement exprimées dans un type cellulaire ou dans tel organe malade : c'est le programme traductionnel : le **protéome**. Habituellement, on appelle cet ensemble (ADN + ARN + Protéines) d'une cellule donnée : le **génom**, le **transcriptome** et le **protéome**.



Ce sont les sciences -omiques et qui caractérisent la biologie moderne et les applications dans le domaine médical, car l'ensemble de ces connaissances permettent d'étudier les patients et les maladies d'une manière beaucoup plus fine et d'avoir des réponses thérapeutiques beaucoup plus appropriées, c'est à la fois le présent et l'avenir de la médecine.

L'ADN n'existe pas « tout nu » dans la cellule, il est habillé de protéines et d'ARN, et cet ensemble d'ADN, de protéines et d'ARN est ce qui va faire que certains gènes vont être exprimés ou non dans un certain type cellulaire. C'est pour cela que l'on préfère substituer la notion d'ADN à la notion de chromatine.



La chromatine est la manière dont l'ADN est organisé dans le noyau, et donc qui dit chromatine, dit ensemble chromatidien, variable d'une cellule à l'autre même si le contenu en ADN est identique, et on a maintenant les outils pour déterminer l'ensemble de ces informations contenues dans la chromatine. Donc, à la notion de **génom** se substitue la notion d'**épigénom**.

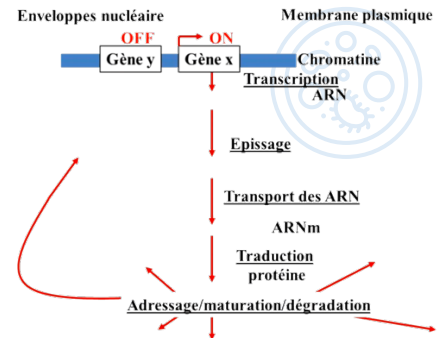
Sur les programmes transcriptionnels et traductionnels, il y a quelques étapes clefs de l'expression de gènes. Si l'on imagine un gène x et un gène y, tous les gènes ne s'expriment pas toujours, par convention on signale un gène qui s'exprime avec une flèche et on dit qu'il est « **on** » et le gène qui ne s'exprime pas est « **off** ».



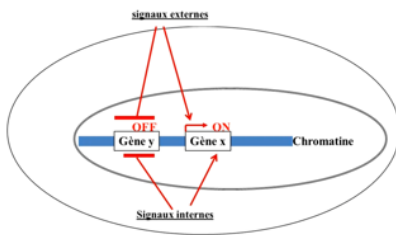
Biologie cellulaire

Rappels de Biologie Moléculaire

La première étape est de le transcrire en ARN. Ces ARN dans les cellules eucaryotes peuvent être épissés, c'est-à-dire qu'ils sont modifiés, certaines portions sont retirées dans le noyau : on enlève les introns afin de garder les exons. Cet ARN épissé va être exporté vers le cytosol, il s'agit d'un ARNm. Certains ARN non codants restent dans le noyau ou sont exportés. Pour les ARNm, ils seront traduits en protéines puis la protéine doit être adressée, maturée, dégradée en fonction des signaux intrinsèques des protéines[†]. Certaines vont revenir dans le noyau, les ADN ou les ARN polymérases, des ligases, etc. Ils forment toute une famille de protéines qui sert à l'expression des gènes et à l'organisation du noyau.



1) Comment s'établit le programme transcriptionnel ?

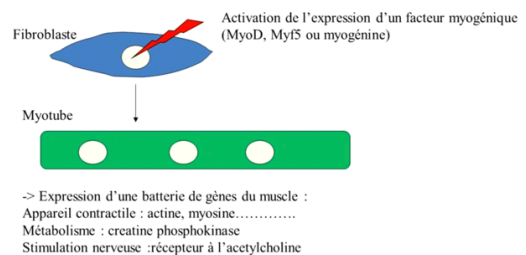


De manière générale, on a, au sein du programme transcriptionnel « ce qui va faire qu'un gène x va être exprimé et qu'un gène y va être réprimé » dans un type cellulaire, alors que dans un autre ce sera l'inverse. La décision d'exprimer ou non ces gènes se fait sous 2 influences, qui sont des signaux **externes (exogènes)** ou **internes (endogènes)**.

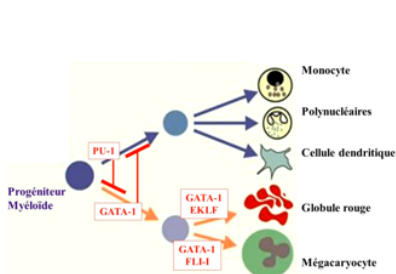
Activation d'un seul gène : l'exemple du fibroblaste

Un cas simple, l'activation d'un seul gène engage la cellule dans un programme particulier. Si l'on prend un type cellulaire qu'on trouve dans le derme, dans de nombreux organes et notamment dans le tissu conjonctif : le fibroblaste. On imagine une situation expérimentale dans laquelle on va exprimer de manière exogène (externe on rappelle) un gène appartenant à la famille des facteurs myogéniques (MyoD, Myf5 ou myogénine).

La conséquence de l'expression d'un seul gène dans cette cellule différenciée va être de la transformer en cellule musculaire squelettique multinucléée obtenue in vitro qui s'appelle myotube. Ce myotube fabriqué in vitro à partir de l'activation d'un seul gène va avoir toutes les caractéristiques des muscles squelettiques avec l'appareil contractile actine-myosine[‡], le métabolisme spécifique et la capacité d'être stimulé par des nerfs, etc.



Le cas le plus souvent rencontré est une combinatoire de différents gènes, notamment des facteurs de transcription qui vont générer la diversité des programmes.



Activation de plusieurs gènes : l'exemple de l'hématopoïèse

On a l'exemple classique d'une partie de l'hématopoïèse qui concerne la formation des cellules myéloïdes. Il s'agit de cellules progénitrices myéloïdes qui ont la capacité d'aller soit vers la lignée monocyttaire, soit d'aller vers la lignée des GR. Cette décision se fait par l'activation alternative de 2 facteurs de transcription. Pour aller vers la lignée monocyttaire, il y a activation d'un facteur de transcription PU-1 qui va activer les gènes nécessaires. Mais, concomitamment, il inhibe les gènes qui vont vers la voie des GR, c'est une double sécurité.

[†] Cf. Les compartiments membranaires des cellules eucaryotes ; B) Le transport vésiculaire : le flux vectoriel permanent.

[‡] Cf. Cytosquelette ; A) Le cytosquelette : généralités & filaments d'actine ; 2) Les microfilaments ; d) Fonctions des microfilaments ; α) Rôle dans la contraction musculaire.

Biologie cellulaire

À l'inverse, la voie des GR ne peut se faire que par l'expression de GATA-1 qui va réprimer des gènes de la voie monocyttaire. Ce qui est important, l'étape d'après dans la lignée des GR, on a un autre progéniteur qui va, avant de décider de former soit des GR, soit des mégacaryocytes, on va avoir la mémoire de l'expression de GATA-1 et on va ajouter un deuxième facteur de transmission EKLf pour les GR et FLI-1 pour les mégacaryocytes. Cela signifie que la cellule progénitrice a accumulé à chaque étape une mémoire qu'elle garde vers une différenciation terminale. **Cette mémoire est inscrite dans la chromatine.**

Ce qui détermine cette mémoire, ce sont initialement des signaux qui viennent de l'extérieur de la cellule ou de l'intérieur, qui vont déterminer l'expression des gènes, mais en plus, ils vont imprimer une certaine marque au niveau de ces gènes, notamment en modifiant leur chromatine. Le gène qui va être **off** va avoir une chromatine **fermée**, et un gène qui va être exprimé (**on**) va avoir une chromatine **ouverte**, permissive. La formation de l'ADN est importante mais pas suffisante pour expliquer l'expression des gènes, car l'état **on** ou **off** du gène correspond au même segment d'ADN mais ne correspond pas à la même chromatine.

Cela a une implication très forte qui explique cette mémoire. Si maintenant on enlève les signaux extérieurs ou internes, on a la mémoire de cette modification de la chromatine **on** ou **off** et les gènes, dans cette lignée de cellules (à l'image de la lignée hématopoïétique), vont garder la mémoire de l'expression ou pas de certains gènes : c'est la maintenance du programme transcriptionnel, contrairement à l'établissement qui se fait par ces modifications de la chromatine et donc de l'épigénome.

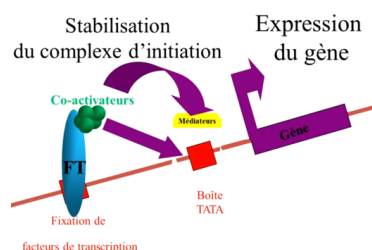
2) Qu'est-ce qui fait qu'un gène est « on » ou « off » ?

Dans les cellules eucaryotes, il y a plusieurs niveaux d'expression, un gène (séquence ADN) va s'exprimer que ce soit via un ARN non codant ou messager. Il va décider de s'exprimer en fonction d'éléments de régulation qui sont des séquences et qui vont déterminer un certain état de la chromatine en fonction des facteurs exogènes (de l'extérieur), endogènes (de l'intérieur), et éventuellement d'une mémoire chromatidienne.

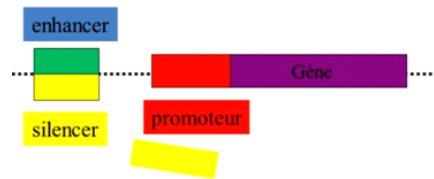
Le promoteur

L'élément de régulation le plus proche du gène est le **promoteur**. Il détermine l'origine et le début de la transcription et c'est le lieu de nombreuses régulations qu'on peut résumer très schématiquement. Pour que le gène soit transcrit, il y a nécessité à ce que l'ARN polymérase se positionne en amont du gène et reçoive l'ordre de transcrire ce gène. La polymérase se fixe autour d'une séquence particulière : la **boîte TATA**. Toutes les intentions des éléments de régulation vont se focaliser sur cet ARN polymérase qui se met sur la **boîte TATA**, donc les facteurs de régulation vont stabiliser cet ARN polymérase de différentes façons :

- Soit directement à partir de facteurs de transcription, qui vont se fixer sur des séquences d'ADN spécifiques, chaque gène sera sous contrôle d'une famille de facteurs de transcription car le **promoteur** de ce gène contient des séquences d'ADN reconnues par ces protéines qui ont une double fonction : **reconnaître ces éléments de fixation** (domaine de fixation à l'ADN) ; et **stabiliser cet ARN polymérase** (fonction de transactivation) ;
- Soit par l'intermédiaire d'autres protéines, qui s'appellent des **coactivateurs**, qui vont se fixer sur le facteur de transcription et vont stabiliser l'ARN polymérase directement en interagissant avec elle, ou indirectement à travers un complexe de protéines qui sert d'intermédiaire entre les facteurs de transcription et l'ARN polymérase. Du fait de leur fonction d'intermédiaires, ils s'appellent les médiateurs. Si tout se passe bien, l'ARN polymérase est stabilisée, le gène va pouvoir s'exprimer, il est **on**.



Biologie cellulaire



Les enhancers & silencers

Le contrôle proximal est nécessaire mais pas suffisant. On distingue 2 types de contrôle distal. D'une part les **enhancers** et les **silencers**, qui peuvent être localisés très loin du gène, contrairement au **promoteur**. Et d'autre part les insulateurs. Les caractéristiques des **enhancers** vont être de suractiver le gène.

A contrario, même si le **promoteur** est actif, si un élément **silencer** décide que ce gène doit être réprimer, il va modifier la chromatine pour faire en sorte que ce gène ne puisse pas s'exprimer, même si les facteurs de transcription sont fixés sur le **promoteur**.

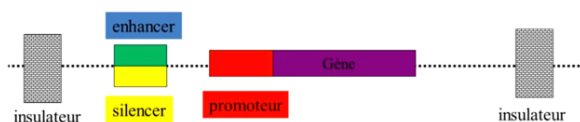
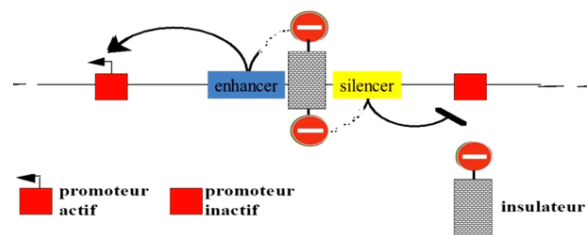
Les éléments de cette super régulation peuvent être en position variable par rapport au **promoteur**. Ils peuvent être en amont du gène (en 5') ou en aval (3'). Ils peuvent être localisés en cis, c'est-à-dire portés par la même molécule d'ADN (même K), c'est le cas de la majorité des éléments **enhancers** ou **silencers**. Dans certains cas particuliers de régulation, ils peuvent être présents sur un autre K, ils agissent alors en trans.

C'est un phénomène génétique qu'on appelle la transvection. Leur orientation vis-à-vis de la polarité de la molécule d'ADN (5'-3') est indifférente, ce qui n'est pas le cas du **promoteur** qui est directionnel par rapport au gène. Ces éléments **enhancers** et **silencers** n'agissent pas seulement via leur séquence d'ADN spécifique, mais aussi grâce à des protéines qui vont les fixer de manière spécifique dans ces autres protéines, dont certaines sont des facteurs de transcription.

Ce qui est important pour le fonctionnement des **enhancers** et des **silencers** c'est la combinatoire des facteurs de transcription qui vont s'associer et leur permettre d'agir à distance sur l'élément **promoteur** et contribuer à la bonne régulation du gène. Mais il y a un problème, comme ces éléments agissent à distance, ils peuvent agir sur plusieurs gènes simultanément, ce qui risque de créer une « cacophonie génétique », donc il y a des éléments qui permettent de limiter leur action à l'échelle du K : ce sont les **insulateurs**, 2^e type de contrôle distal.

Les insulateurs

Ils font partie des éléments de régulation essentiels à l'expression des gènes, ils vont insuler, donc empêcher l'action à distance de ces éléments **enhancers** et **silencers**. L'**insulateur**, aussi appelé « élément frontière », est une séquence d'ADN qui empêche l'activation ou la répression sans affecter la fonctionnalité de l'**enhancer** ou du **silencer** simplement en affectant sa directionnalité.



Récapitulatif

Pour qu'un gène eucaryote puisse fonctionner, il a besoin d'un contrôle proximal avec des éléments spécifiques et des éléments distaux, dont l'action à l'échelle du K est limitée par la présence ou non d'insulateurs.

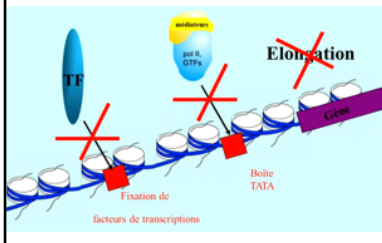
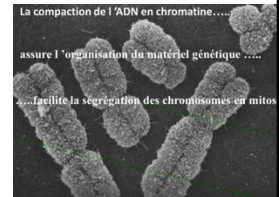
Biologie cellulaire

B) Structure de la chromatine



On va étudier la structure de la chromatine. Pour se faire, on va réaliser un véritable « voyage au cœur du noyau » en partant de la molécule d'ADN. On va voir tous les différents niveaux d'organisation de cette chromatine, qui va de niveaux d'organisation simples (comme le nucléosome) vers des niveaux d'organisation plus complexes (boucles, domaines, territoires). Cette structure, complexe, est dynamique. En effet, elle peut changer en fonction de son environnement ou de son état cellulaire[†].

Par exemple, le niveau maximum de compaction de cette chromatine se fait au moment de la division cellulaire. Mais on va voir que ces niveaux de compaction de la chromatine vont, en général, défavoriser la transcription.



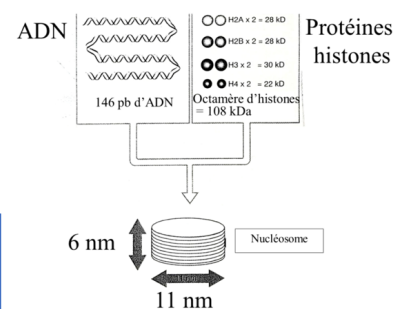
Donc, d'un côté, cette condensation de la chromatine est bonne pour permettre la ségrégation des gènes, mais, d'un autre côté, cela occasionne une difficulté pour la transcription. En effet, tous les éléments de régulation de l'expression des gènes (ARN polymérases, médiateurs, facteurs de transcriptions etc) ne pourront pas accéder à leur site d'action car l'ADN va être masqué par une structure condensée de chromatine.

1) Le nucléosome

a) Structure d'un nucléosome

Le premier niveau d'organisation de la chromatine est le nucléosome et son organisation spécifique le long de la molécule d'ADN : la fibre nucléosomale. On peut assimiler le nucléosome à un petit cylindre de 6 nm de hauteur pour 11 nm de diamètre.

Un nucléosome est constitué de 4 paires de protéines appelées histones (donc d'un octamère[‡] d'histones : 8 protéines d'histones). Les histones sont des petites protéines basiques (riches en acides aminés chargés positivement) qui vont s'assembler les unes avec les autres et qui vont avoir pour propriété d'enrouler l'ADN (car l'ADN est chargé négativement).



Petit point maths

Ces 8 protéines sont regroupées en 4 dimères d'histones :

$$2 \times H_{2A} + 2 \times H_{2B} + 2 \times H_3 + 2 \times H_4$$

Au final, un octamère d'histones fait une masse moléculaire de 108 kDa et permet d'enrouler 146/147 paires de base d'ADN.

La structure des protéines histones est très conservée au cours de l'évolution : on ne les retrouve pas dans les eubactéries mais on retrouve des ancêtres de ces protéines chez les archaées. Même si la structure est très conservée, il existe quelques différences qui sont très importantes dans l'expression des gènes. On a ≈ 60 millions d'histones dans un noyau.

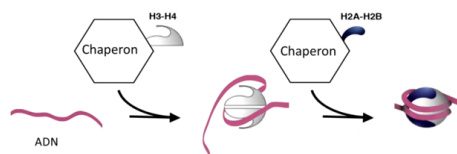
[†] Cf. Le cytosquelette ; B) Les microtubules ; 3) Rôle des microtubules dans la mitose ; c) Étapes de la mitose.

[‡] Étymologie : octamère, du grec « οκτώ », qui signifie « huit » et « μέρος », qui signifie « partie ».

Biologie cellulaire

b) L'assemblage des histones

L'association de l'octamère d'histones avec l'ADN se fait spontanément. Mais il existe quand même des protéines qui vont faciliter cet appariement. **Attention, ce ne sont pas des enzymes**, elles vont juste faciliter la réaction. Ces protéines sont appelées des protéines chaperons. Les chaperons guident les histones pour permettre leur assemblage mutuel.



Ordre d'assemblage des histones

Il existe un ordre d'assemblage des histones :

1. Un premier chaperon est associé à un hétérodimère H_3/H_4 qu'il associe ;
2. Ensuite, toujours à l'aide d'une protéine chaperon, on aura l'assemblage de H_{2A} et H_{2B} . Une fois que les histones sont assemblées, les protéines chaperons s'en vont.

L'assemblage des nucléosomes est donc stimulé par des protéines chaperons qui interagissent avec des dimères d'histones dans un ordre bien précis (H_3/H_4 puis H_{2A}/H_{2B}).

c) Diversité des nucléosomes

Les nucléosomes ne sont pas tous identiques. On a une structure nucléosomale commune mais qui va présenter plusieurs différences. En effet, la cellule doit pouvoir modifier/moduler ces nucléosomes en fonction de ses besoins (expression ou répression des gènes).

a) 3 façons de modifier les nucléosomes

X) Le complexe de remodelage

On peut d'abord modifier un nucléosome en changeant sa position. Il existe donc des complexes protéiques (complexes de remodelage) qui consomment de l'ATP, et qui vont, en fonction de la localisation dans le génome, choisir de déplacer tel ou tel nucléosome.

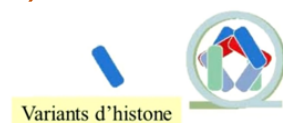
La position des nucléosomes peut être modifiée de différentes façons :

- Déplacement en cis (en haut) : le long du brin d'ADN ;
- Déplacement en trans (en bas) : le nucléosome quitte le brin d'ADN pour aller sur une autre molécule d'ADN/apport d'un nucléosome depuis l'extérieur.



Cela permet une diversité de position des nucléosomes. Par exemple, à certains endroits, il n'y aura pas de nucléosomes.

Ψ) Les variants d'histones†



Variants de H_{2A} : H_{2AX} , H_{2A-Z} , $macroH_{2A}$...
Variants de H_3 : $H_{3.1}$, $H_{3.3}$, $CenpA$

Il existe plein de gènes codant pour H_{2A} , pour H_{2B} et pour H_3 . Ces différents gènes vont donc coder pour différentes histones : ce sont des variants d'histones H_{2A} , H_{2B} et H_3 qui vont leur conférer une propriété particulière.

Chaque variant a une fonction particulière par rapport à certains domaines de chromatine. Ces variants ont toujours la possibilité de se modifier post-traductionnellement. Exemple :

Variante de H_{2A}	Variante de H_3
<ul style="list-style-type: none"> - H_{2AX} ; - H_{2A-Z} ; - $MacroH_{2A}$ - ... 	<ul style="list-style-type: none"> - $H_{3.1}$; - $H_{3.3}$; - $CenpA$: variant de H_3 spécialisé dans les centromères. Rôle dans le kinétochore‡ lors de la mitose. Donc les nucléosomes des centromères ont l'histone $CenpA$ à la place de l'histone H_3.

† H_4 est codée par un seul gène : elle ne possède pas de variant.

‡ Cf. V – Le cytosquelette ; B) Les microtubules ; 3) Le rôle des microtubules dans la mitose ; b) Passage de la phase G2 à la phase M ; § « D'un point de vue moléculaire »

Biologie cellulaire

Ω) Les modifications post-traductionnelles des histones

Chaque nucléosome est unique car il possède des modifications post-traductionnelles différentes d'un nucléosome à l'autre. Une protéine, après avoir été synthétisée par le ribosome peut subir des modifications. C'est le cas pour les histones où des modifications spécifiques peuvent avoir lieu après la traduction dans le cytosol (avant d'être réimplanté dans le noyau) grâce à des enzymes spécialisées. Elles peuvent également être modifiées directement dans le noyau si les enzymes sont présentes.

Il existe plein de types, parmi les plus important il existe :

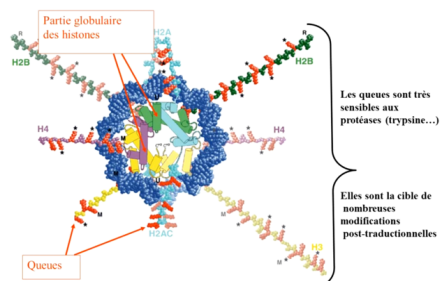
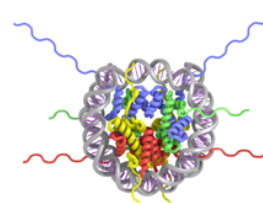
- L'acétylation ;
- La phosphorylation ;
- L'ADP-ribosylation ;
- La méthylation ;
- L'ubiquitinylation.



Ces modifications ont un sens fonctionnel particulier pour la cellule.

β) Comment sont disposées les histones dans le nucléosome

Les histones sont constituées d'une partie globulaire (qui est au centre) et d'une queue N-ter (projetée vers la périphérie). L'octamère d'histone va se disposer de façon à permettre sa modification post-traductionnelle (les queues sont facilement accessibles) :



Sur le schéma, on peut voir les 4 paires d'histones formant le nucléosome ci-contre. Les queues sont représentées sous forme de longues extrémités toute droite car elles ne sont pas assez structurées. On distingue l'ADN (la boucle au centre). En réalité, l'ADN fait 2 tours autour du nucléosome.

Partie globulaire du centre

Les parties globulaire des histones (cylindres sur le schéma) vont se regrouper au centre. Elles possèdent de nombreux acides aminés basiques qui sont chargés positivement (surtout lysine et arginine). L'ADN étant chargé négativement, il va y avoir une forte interaction entre la partie globulaire et l'ADN. L'ADN va donc s'y entourer.

Queues N-ter périphériques

Les queues ne sont pas structurées. Elles passent entre les 2 tours d'ADN pour être à l'extérieur. C'est la partie exposée du nucléosome. Elles sont chargées positivement (riches en acides aminés basiques). Elles sont la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles. Elles sont sensibles aux *protéases* (car elles sont exposées à l'extérieur du nucléosome et sont moins structurées). En laboratoire, on peut enlever ces extrémités grâce à l'action de *protéases*.

γ) Modifications post-traductionnelles des histones

Les modifications des histones sont contrôlées par des enzymes spécialisées.

Exemple de l'acétylation sur les lysines

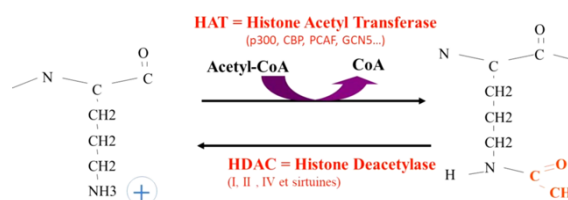
Acétylation

Les enzymes qui catalysent cette réaction s'appellent les HAT. Le cofacteur qui lui est associé est l'acétyl-CoA. Le groupement acétyl est transféré sur le groupement NH_3 des acides aminés basiques (comme la lysine).

Déacétylation

La réaction inverse est possible : on parle de déacétylation catalysée par les HDAC.

On voit sur le schéma ci-contre la chaîne latérale de la lysine à gauche (avec le NH_3^+). L'acétyl-CoA va être donneur de son groupement acétyl qui va être transféré sur la lysine. À l'inverse, les HDAC vont enlever ce groupement acétyl.



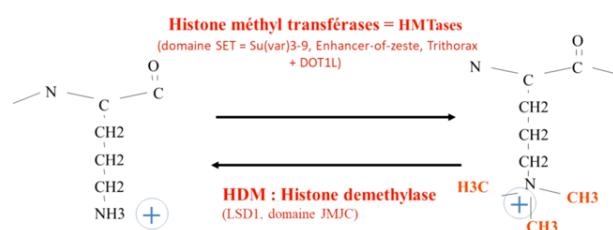
Biologie cellulaire

Il existe plusieurs types de HDAC, en fonction de la localisation, de la fonction, du type cellulaire. Par exemple, les sirtuines sont une catégorie un peu à part qui joue un rôle dans le phénomène de vieillissement. Les sirtuines utilisent le NAD comme coenzyme. Elles relient l'état métabolique/énergétique avec la structure de la chromatine (expression des gènes) de la cellule. On s'aperçoit bien qu'il existe un lien entre la structure de la chromatine et le métabolisme énergétique car l'acétyl-CoA et le NAD sont des produits du métabolisme. Donc, quand on modifie le métabolisme, on modifie la chromatine.

Exemple de la méthylation sur les lysines ou les arginines

Méthylation

Catalysée par les enzymes HMT. On peut passer d'aucune modification à 3 méthylations. Donc, une lysine peut être mono, di ou triméthylée, ce qui lui confère des propriétés différentes à chaque fois. Les HMTases sont de plusieurs types et ont chacune des domaines (position des lysines sur les histones) et des actions spécifiques (mono/di/ triméthylation).



Donc, selon le nombre de méthylations, et selon la position de la lysine méthylée, l'enzyme utilisée sera différente et la fonction de l'histone sera différente également. La méthylation des lysines des histones et la méthylation de l'ADN sont 2 choses bien distinctes.

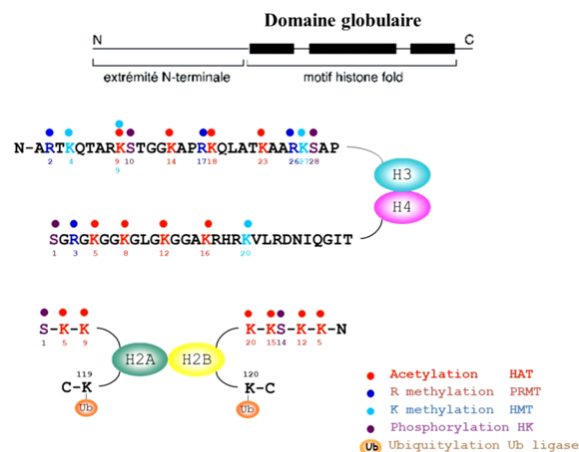
Déméthylation

Catalysée par les enzymes HDM.

δ) Le code histone

La diversité des modifications post-traductionnelles des histones constituent un code : le code histone. Celui-ci se rajoute au code génétique (ADN : ATCG). Il est facilement modifiable.

Sur ce schéma, on peut voir des queues N-ter. Ces queues sont composées de différents acides aminés. À côté de chacun des acides aminés, les petits points représentent toutes les modifications qu'il est possible de faire. Toutes les histones ne sont pas forcément modifiées, et certaines modifications ne sont pas alternatives.



Par exemple, sur la lysine en position 9 de l'histone 3 (H3K9), on voit qu'il y a 2 petits points qui correspondent soit à une acétylation, soit à une méthylation (on ne peut pas avoir les 2 à la fois).

Les modifications post-traductionnelles confèrent un extraordinaire combinatoire. Les modifications post-traductionnelles + l'utilisation de différents variants d'histones constituent un code qui se superpose au code génétique : le code épigénétique.

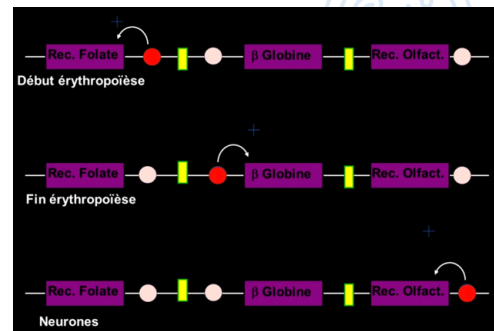
Tous ces codes donnent des informations supplémentaires à la cellule sur son programme d'expression et de transcription de gènes. Le code génétique est le même pour toutes les cellules mais le code histone est variable en fonction du type cellulaire.

Exemple de l'importance fonctionnelle du code histone

Sur ce schéma, on voit des éléments de régulation à distance pour réguler de manière tissulaire spécifique l'expression des gènes. Les rectangles sont des insulateurs et les ronds sont des enhancers.

On va prendre une région d'un K composé de 3 gènes :

- Le gène du récepteur folate ;
- Le gène codant pour la β -globine ;
- Le gène codant pour un récepteur olfactif.



Il est important de noter que ces 3 gènes ne s'expriment pas dans les mêmes cellules.

Au début de l'érythropoïèse

On a besoin du récepteur folate, donc il est exprimé par l'**enhancer**. Mais, on n'a pas besoin du gène β -globine, et encore moins du récepteur olfactif. Ces 2 gènes sont donc réprimés grâce à la présence de l'insulateur qui empêche l'action de l'enhancer.

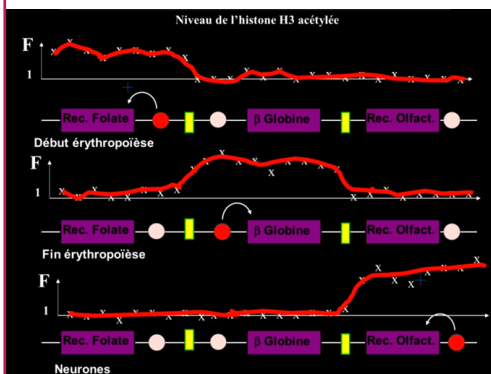
À la fin de l'érythropoïèse

On n'a plus besoin du récepteur folate, qui est réprimé, mais on a besoin du gène β -globine, qui est alors exprimé par l'**enhancer**. Le récepteur olfactif n'a rien à voir avec l'érythropoïèse, donc il est réprimé dans ce type tissulaire.

Dans un neurone

L'érythropoïèse ne sert absolument à rien. Les gènes de l'érythropoïèse sont donc réprimés contrairement au gène du récepteur olfactif qui est utile pour le neurone.

Il existe des techniques expérimentales pour déterminer le niveau d'acétylation des histones. On voit ici que la quantité d'histones H_3 acétylées est représentée par le trait rouge (plus le trait monte en ordonnées, plus on a d'enrichissement en acétylation).



Au début de l'érythropoïèse

On trouve qu'il y a beaucoup plus d'enrichissement au niveau du gène qui est exprimé (récepteur folate) qu'au niveau des 2 autres gènes. Il y a beaucoup d'histones H_3 acétylées au début de l'érythropoïèse au récepteur folate.

À la fin de l'érythropoïèse

On découvre alors qu'il y a beaucoup d'enrichissement au niveau du gène β -globine. Par contre, il n'y a plus d'enrichissement au niveau du récepteur folate. Au niveau du gène β -globine, il y a beaucoup d'histones H_3 acétylées en fin d'érythropoïèse.

Dans un neurone

Pour les neurones c'est le même principe : au niveau du récepteur olfactif, il y a un enrichissement d'histones acétylées, contre les 2 autres qui ne sont pas exprimées, il n'y a pas d'enrichissement.

Déduction

L'acétylation de H_3 est en général associée à une transcription active du gène. Il y a donc une relation entre les modifications post-traductionnelles et le niveau de transcription des gènes.

Biologie cellulaire

ε) Traduction fonctionnelle du code des histones

Il y a des règles qui vont permettre d'appréhender l'activation ou l'inactivation du gène en fonction de sa modification post-traductionnelle.

Chromatine hyperacétylée

Chromatine hypoacétylée

Chromatine méthylée

Transcription active
Transcription inactive
- En K4 (lysine 4/histone H ₃) : transcription active ;
- En K9 (lysine 9/histone H ₃) : transcription inactive.

Attention : il faut bien faire attention :

- Au type de modifications ;
- À sa localisation.

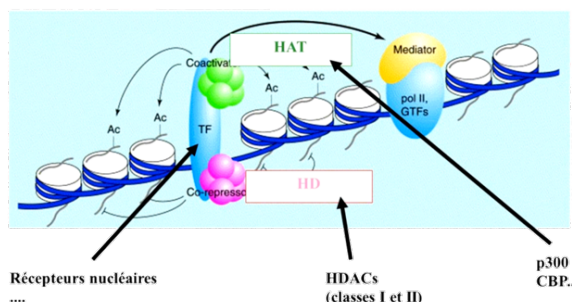
En effet, une méthylation en H3K4 n'aura pas le même effet qu'une méthylation en H3K9.

Ψ) Co-activateurs & co-répresseurs

On retrouve au niveau des facteurs de transcription des protéines qui sont capables de modifier post-traductionnellement les histones. Les protéines HAT ou HD sont souvent des co-activateurs ou des co-répresseurs en interagissant avec des facteurs de transcription.

Les HAT et les HDAC sont en interaction avec les facteurs de transcription :

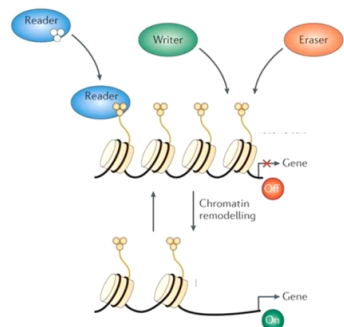
- Les **co-activateurs** présentent une activité **HAT** : favorise la transcription en modifiant la structure locale de la chromatine, permettant son accessibilité aux éléments de transcription ;
- Les **co-répresseurs** présentent une activité **HDAC** : défavorise la transcription en modifiant localement la structure de la chromatine qui devient moins accessible aux éléments de transcription.



Ω) Comment le code des histones est-il traduit ?

En régulant les interactions entre les queues des histones et des protéines non-histones (répresseurs ou activateurs). Les modifications des histones vont donc être lues par des protéines particulières : des protéines non histones, activateurs ou répresseurs de la transcription, qui reconnaissent spécifiquement les modifications post-traductionnelles des histones et vont permettre différentes actions.

Modification post-traductionnelle	Reconnue par :	Actions
Lysine acétylées	Des protéines à bromodomaines	Recrutement de facteurs de transcription pour les zones hyperacétylées
H3K9 et H3K27 méthylées	Des protéines à chromodomaines : - HP1 pour K9 ; - Polycomb pour K27.	HP1 (qui reconnaît les histones méthylées en K9) forme l'hétérochromatine. - Lorsqu'on méthyle en K9 ou K27, on forme de l'hétérochromatine.



Il y a donc une importante relation entre structure de la chromatine et expression des gènes.

On a 3 catégories de protéines qui permettent l'organisation de l'expression des gènes :

- Les « writer », celles qui écrivent le code, responsables des modifications (ex : enzymes de type HAT, HDM...) ;
- Les « reader », celles qui lisent le code (ex : protéines tudor, chromodomaine) ;
- Les « eraser » qui effacent le code (ex : déméthylases...).

Biologie cellulaire

2) La fibre nucléosomale

On va voir un nouveau niveau d'organisation supérieur de l'ADN : la fibre nucléosomale correspond à un assemblage de nucléosomes les uns à côté des autres. Il existe 2 niveaux d'organisation de la fibre nucléosomale :

Premier niveau : la fibre de 11 nm



Deuxième niveau : la fibre de 30 nm



Ce premier niveau correspond au nucléosome. Rappel :

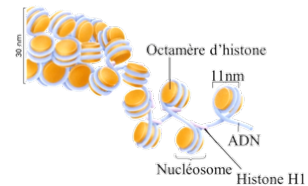
- Formé par un enroulement de l'ADN autour des octamères d'histones ;
- Ressemble à un collier de perles ;
- Cylindre de 11 nm de diamètre (diamètre du nucléosome).

L'ADN qui relie 2 nucléosomes voisins est appelé ADN de liaison/linker. Cet ensemble forme une fibre de 11 nm de diamètre. Correspond à une conformation ouverte de l'ADN.

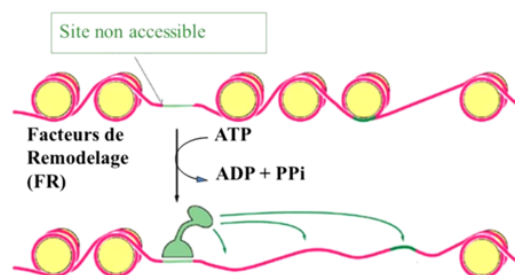
- Structure encore plus condensée ;
- Fibre de 30 nm de diamètre qui correspond à un peu moins de 3 nucléosomes : le solénoïde ;
- La protéine H1 permet une transition conformationnelle vers une structure de 30 nm.

- ⇒ H1 ne fait pas partie de l'octamère d'histones du nucléosome ;
- ⇒ Correspond à une conformation fermée de l'ADN.

L'histone H1 se met au croisement des molécules d'ADN à l'entrée et à la sortie du nucléosome. Cette fixation va entraîner une compaction de la fibre nucléosomale en fibre de 30 nm. On retrouve sur ce schéma un cylindre d'histones qui est entouré par 2 tours d'ADN. Ces différents niveaux d'organisation correspondent à différents niveaux d'accessibilité des éléments de régulation de l'expression des gènes.



Remodelage de la fibre nucléosomale



Au niveau des promoteurs, il faut souvent remodeler la fibre des nucléosomes pour permettre la fixation de protéines régulatrices. Par exemple les facteurs de transcription qui ont besoin d'avoir de la place pour se fixer.

Ce sont les facteurs de remodelage, des grosses machines très consommatrices d'énergie, qui rendent l'ADN accessible aux facteurs de transcription.

Ils vont être capables de créer localement des zones sans nucléosome (en les déplaçant grâce à leur domaine ATPase qui va hydrolyser l'ATP) pour permettre aux facteurs de transcription de se placer.

Au niveau des régions promotrices, on a très souvent un ADN dépourvu de nucléosome.

Récapitulatif

Il existe des facteurs de remodelage qui sont de très grosses machines permettant de rendre l'ADN accessible pour la transcription. Ils agissent sur la structure & la mobilité des nucléosomes en utilisant de l'ATP.

Biologie cellulaire

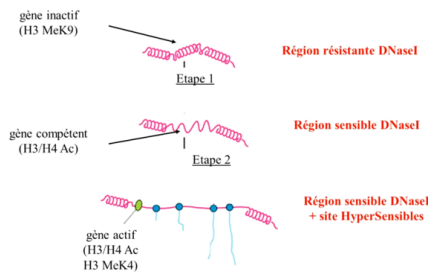
3) Boucles & domaines



On passe encore à un autre niveau : la fibre chromatinienne va s'organiser en boucles et domaines. On voit sur le schéma que c'est un niveau moins bien défini (contrairement à la grande précision du nucléosome) car c'est une structure plus complexe à étudier expérimentalement.

a) Les niveaux d'activité des gènes

Pour comprendre ces niveaux d'activité, on va simplifier en disant qu'un gène est soit **off** soit **on**. En fonction de l'état d'ouverture de la chromatine, on va définir des régions sensibles ou non à la DNase1.



Au niveau d'un gène **off** (transcription inactive), on va retrouver surtout une méthylation H3K9 (le gène est très condensé). Cette région sera résistante à la DNase1 car trop condensée. Au niveau d'un gène compétent (c'est-à-dire entre l'activation et l'inactivation, la chromatine est ouverte mais il n'est pas transcrit), on va retrouver plutôt des acétylations. Cette région est sensible à la DNase1.

Au niveau d'un gène **on** (transcriptionnellement actif), on va retrouver une acétylation en H₃ ou H₄ + une méthylation H3K4. Cette région est sensible à la DNase1 et comporte des sites **hypersensibles**.

Les sites hypersensibles à la DNase1

On a trouvé dans des domaines sensibles à la DNase1, des zones encore plus sensibles à la DNase1 : ce sont les zones hypersensibles. On s'aperçoit que ces domaines hypersensibles correspondent à des régions de régulation. Ils sont la traduction expérimentale de l'action des facteurs de remodelage.

Ces zones hypersensibles correspondent alors à des éléments promoteurs, ce sont des zones dépourvues de nucléosome. Au sein de ces sites, certaines zones sont protégées contre la DNase1 par la fixation d'un facteur de transcription.

Récapitulatif

Il existe des zones sensibles à l'enzyme DNase1 au niveau des gènes transcrits car l'ADN est plus accessible. Au niveau de ces zones sensibles, il existe des zones hypersensibles car il n'y a pas de nucléosome. Au sein de cette zone hypersensible, il existe une région qui est non dégradée par la DNase1 car elle est protégée par le facteur de transcription.

b) Les domaines co-régulés

Dans un même domaine, les gènes peuvent être co-régulés : c'est ce qu'on appelle les domaines de co-régulation. En effet, les gènes ne sont pas régulés de manière indépendante. Par exemple, les insulateurs protègent un certain nombre de gènes de l'action des enhancers/silencers. Donc, même si les gènes sont transcrits de manière indépendante, ils peuvent être co-régulés. Cette co-régulation varie en fonction des signaux exogènes et endogènes.



Dans le génome humain, la taille moyenne des domaines co-régulés est de 350 000 pb.

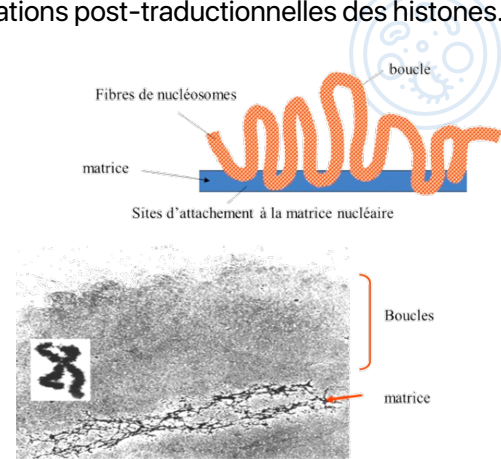
Biologie cellulaire

Cela implique qu'il existe un niveau d'organisation de la chromatine qui permette d'expliquer cette co-régulation et qui n'est pas uniquement liée aux modifications post-traductionnelles des histones.

Sur le schéma, on voit la fibre nucléosomale en rouge et la matrice nucléaire en bleu. On voit très bien que la fibre nucléosomale forme des boucles en venant se rattacher à la matrice.

Le modèle en boucle est donc une matrice sur laquelle l'ADN va s'accrocher et former des boucles (une boucle : un domaine).

En ME, on observe un K métaphasique. On voit très bien cette partie fibreuse qui correspond à la matrice (au centre, foncé) et des boucles d'ADN (en gris, tout autour). Finalement, ces boucles d'ADN émanent de la matrice centrale.

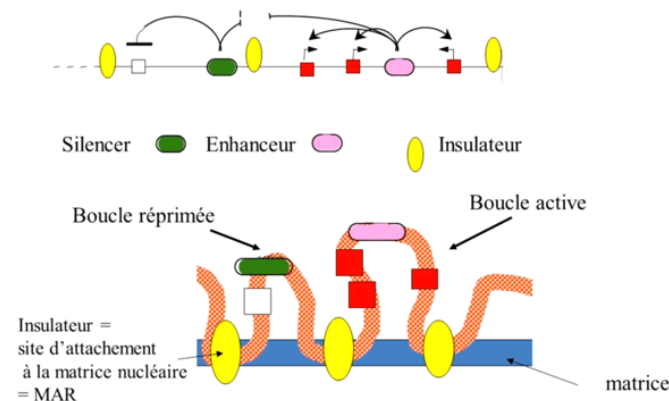


Ces domaines de co-régulation correspondent finalement à ces fameuses boucles : en termes de relation structure-fonction, les gènes co-régulés appartiennent à la même boucle.

La matrice nucléaire

Elle est formée de différentes protéines qui sont essentielles pour la régulation de l'expression des gènes. À titre d'exemple, on a :

- Lamina nucléaire (filament intermédiaire) ;
- Protéines du nucléosquelette : actine, lamine A/C, NuMa ;
- Complexes nucléo-protéiques.



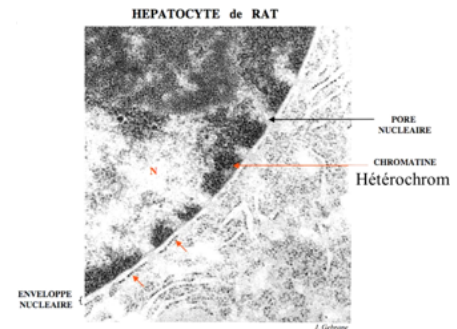
4) L'hétérochromatine

La chromatine correspond à différents niveaux de compaction de l'ADN dans le noyau. C'est lié à l'état de cycle cellulaire comme par exemple la mitose et aussi à l'expression des gènes. Certaines régions des K sont particulièrement plus condensées que d'autres régions de manière permanente. Ces régions particulières vue en DAPI très dense, forment l'hétérochromatine.

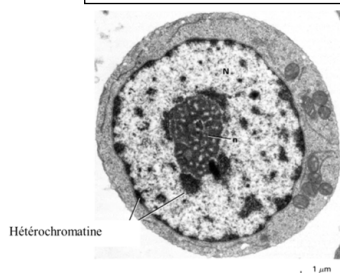
Biologie cellulaire

Voici une image en ME d'un noyau d'hépatocyte de rat, si on regarde la partie gauche un peu sombre avec des zones délimitées par une double membrane, c'est un cadran de noyau. La double membrane de l'enveloppe nucléaire.

À droite, on reconnaît le REG avec les ribosomes qui sont associés, et certaines ribosomes libres. On voit la continuité entre l'enveloppe nucléaire et le réticulum endoplasmique, et des petites flèches montrent certains ribosomes associés de la membrane externe et de l'enveloppe nucléaire.



À l'intérieur du noyau, par une condensation particulière, on voit des zones extrêmement denses aux électrons et plus c'est condensé, plus c'est sombre. Les zones noires correspondent à l'hétérochromatine. On voit très bien que cette hétérochromatine est essentiellement localisée sur l'enveloppe nucléaire, tapissant plus spécifiquement sa face, en contact direct avec la lamine des filaments intermédiaires. Si on est encore plus précis, on aperçoit qu'il y a des sortes de canaux entre ces domaines d'hétérochromatine, ils correspondent à une interruption de la double membrane qui correspond aux pores nucléaires. Ces zones permettent l'échange dans les 2 sens entre le noyau et le cytoplasme.



Sur cette image en ME où l'on voit les zones d'hétérochromatine sur l'ensemble du noyau, on voit le fait que l'hétérochromatine est essentiellement liée à la membrane et on voit au centre le nucléole qui est attaché à des zones d'hétérochromatine.

Par définition, l'hétérochromatine correspond à une forme extrême de chromatine hyper-condensée, facilement visible en ME dans les noyaux interphasiques. Ce sont des zones de la cellule qui sont condensées tout au long du cycle cellulaire, on insiste sur le fait que la chromatine se condensait de manière extrêmement importante en début de mitose, pour permettre de ségréguer le matériel génétique, mais il y a certaines portions du K qui sont déjà hypercondensées, et qui ne se condensent pas beaucoup plus durant la mitose.

Ce sont les niveaux d'organisation de l'hétérochromatine qui sont vraiment importants, les gènes localisés dans cette hétérochromatine sont très peu ou pas actifs, et ces zones sont importantes pour l'organisation globale du noyau.

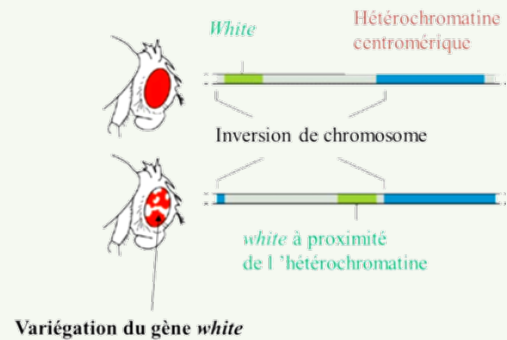
Cela a été longtemps un sujet difficile à aborder car ce n'est pas facile d'organiser ces niveaux supérieurs de condensation et un processus génétique a beaucoup aidé les chercheurs à comprendre les facteurs qui interviennent dans cette hétérochromatine et sa fonction : c'est ce que l'on appelle l'effet de position[†].

[†] En génétique, l'effet de position se définit par la modification de l'activité d'un gène en fonction de son contexte chromosomique. Si l'on imagine un gène, il a un contrôle proximal et distal, on le met à un endroit du K, il va s'exprimer d'une certaine façon en fonction de ses éléments de régulation dans un type cellulaire particulier. On va prendre tous ces éléments de régulation dans un type cellulaire particulier. On va prendre tous ces éléments, cela peut être une très grande portion de K, et on va le mettre dans une autre portion de K, et il s'exprimera différemment, dans la grande majorité des cas. Il y a un autre niveau qui va déterminer l'expression des gènes : le contexte chromosomique qui définit l'effet de position.

Étude d'une expérience historique

On a beaucoup appris en étudiant ces effets de position pour le contexte chromosomique, ce sont des expériences qui datent de la 1^{ère} moitié du XX^e siècle. On n'avait pas une interprétation moléculaire des phénomènes génétiques, un outil de choix étaient les mouches, notamment la drosophile. On voit une tête avec un œil normal, c'est la drosophile sauvage qui a les yeux rouges.

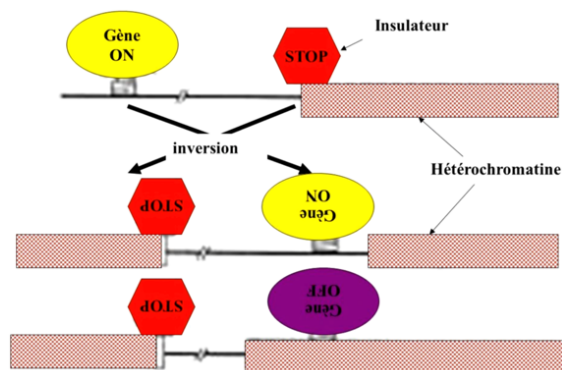
Les généticiens de la drosophile ont l'habitude d'appeler les gènes comme le phénotype muté. Quand on n'a pas le gène qui code pour la couleur rouge, on a des yeux blancs, et ce gène s'appelle donc White. Le gène White code pour une protéine qui va déterminer la couleur des yeux de la drosophile.



On est dans les années 1930, la radioactivité était connue comme une méthode de choix pour les généticiens pour obtenir des mutants grâce aux radiations. Les généticiens de la drosophile ont observé un phénotype particulier : certains mutants où les yeux n'étaient ni rouges ni blancs mais entre les 2 avec des zones blanches et rouges. Ils ont appelé cela une **variégation de l'expression du gène White**. Le gène White est localisé à l'extrémité du gène X de la drosophile, ils se sont aperçus par des techniques de cartographie génétique, dans ces mutants particuliers, que le gène White est toujours là, non muté mais il a changé de contexte chromosomique et par une inversion du K par radiation, il s'est retrouvé à proximité du centromère qui est une grande région d'hétérochromatine.

En conclusion, le gène White est réprimé bien qu'il ait tous ses éléments de régulation car il est à proximité d'une zone d'hétérochromatine. C'est une observation capitale, c'est cela l'effet de position, c'est ce qu'ils appellent le PEV[†].

Illustration génétique de cette expérience



En haut on a la situation normale, le gène White est **on**, et les yeux sont rouges. On a l'hétérochromatine, l'**insulateur** qui empêche cette hétérochromatine de se propager et donc de réprimer l'expression des gènes. Quand on inverse le K, on a le gène White qui va se retrouver à proximité d'hétérochromatine.

Dans certaines cellules le gène va toujours être **on**, bien qu'il soit à proximité d'hétérochromatine, c'est-à-dire que l'hétérochromatine ne s'est pas propagée sur le gène White, c'est une décision qui a été prise au cours du développement de certaines cellules des yeux et dans d'autres cellules.

Comme l'**insulateur** n'est pas là, l'hétérochromatine va se propager et réprimer l'expression du gène White. Les yeux vont être blancs et comme ce sont certaines cellules du même individu, ce qui explique l'effet « varié » de certaines cellules qui sont blanches ou rouges.

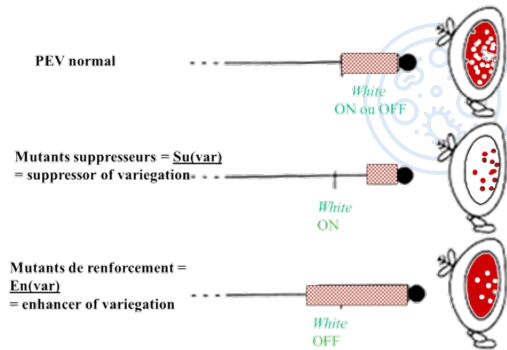
Cela a permis aux chercheurs de sélectionner des nouveaux mutants qui vont moduler cet effet de mutation. Ces mutants devraient donner des informations sur les gènes responsables de cette forme hypercondensée de la chromatine qu'est l'hétérochromatine.

[†] Position Effect Variegation.

Biologie cellulaire

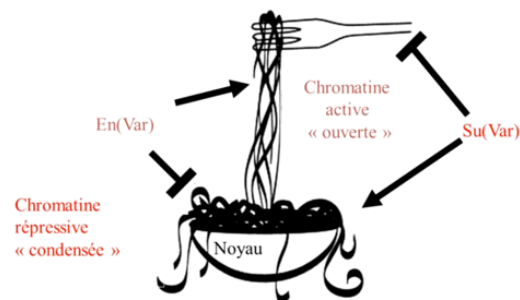
Sans entrer dans les détails, on peut faire des mutations secondaires. À droite, on a un œil de drosophile[†].

On part des yeux « variégés », si on va supprimer la variégation et revenir à un œil rouge, c'est un gène suppresseur de variégation : **Su(var)**, dans ce cas, ce sont des mutations perte de fonction qui vont affecter des éléments de l'**hétérochromatine** et on va identifier les nouveaux gènes et chercher des drosophiles encore plus « variégées », encore plus blanches.



Ce sont les mutations **En(var)** qui vont définir des gènes qui vont contrecarrer l'effet de l'**hétérochromatine**. Dans les mutations **Su(var)**, qui sont des gènes de l'**hétérochromatine**, on va retrouver des enzymes qui vont triméthyliser la lysine 9 comme **Su(var) 3-9**, des histones déacétylées, des protéines de lecture de K9 triméthyls avec les chromodomaines comme la protéine HP1.

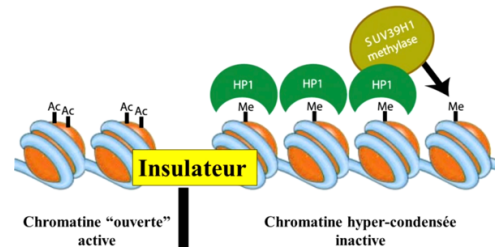
À l'inverse, les protéines **En(var)**, qui **augmentent** la variégation **lorsqu'ils sont mutés**, sont des protéines qui **contribuent à l'expression des gènes** comme de facteurs de transcription, des histones, acétyltransférases, etc.



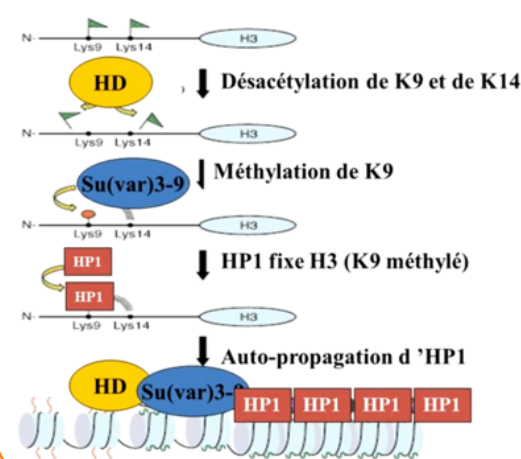
Instant métaphore de Gigi

Si l'on imagine que le noyau soit un plat de spaghettis, c'est un peu compliqué à manger comme ça, il faut une fourchette pour démêler ce plat, c'est ce que font les gènes **En(var)**, tandis que les gènes **Su(var)** vont contribuer à rendre les spaghettis plus compacts et indigestes.

D'un point de vue plus moléculaire, ces expériences ont mis en évidence ce type de réactions, donc on va partir de l'histone H3. En bas, on a des nucléosomes et on a sur la portion de chromatine des fibres nucléosomales. On a la partie droite hypercondensée associée à HP1 et la partie gauche plus ouverte donc susceptible d'avoir des gènes transcrits.



Comment cette répartition entre les 2 domaines se fait-elle ?



Au niveau de l'histone H3 il y a une série de réactions. D'abord on a des **désacétylations** de K9 et K14 qui permettent la méthylation de K9 de l'histone H3 par une protéine **Su(var)3-9**.

Une fois que cette lysine H3 est méthylée, elle va servir de site de fixation pour les protéines à chromodomaine dont la protéine **HP1**, et qui va donc se propager.

En effet, **HP1** en elle-même va attirer d'autres protéines **Su(var)3-9** qui vont se propager en bas de droite à gauche par l'action combinée de l'**histone désacétylase** et de **Su(var)3-9**.

[†] J'ai mis les vraies couleurs, parce que le coup de « Le BAnC c'EsT Le RoUgE » on comprend rien.

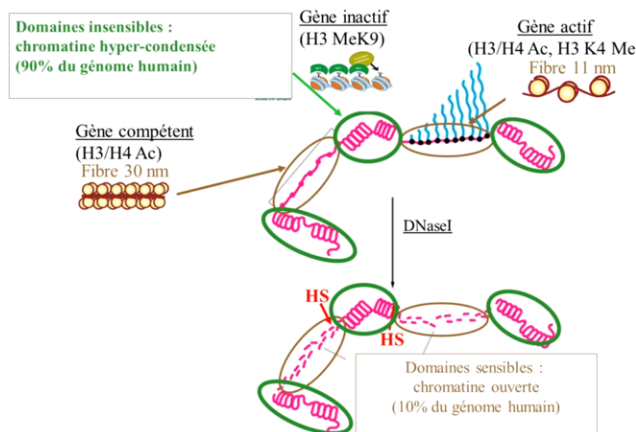
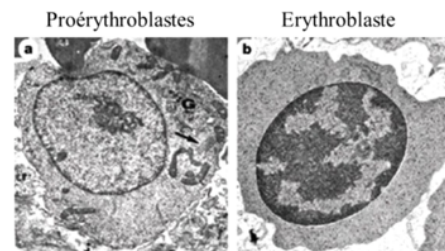
Biologie cellulaire

On a vu que cela inactivait le gène White localisé à proximité d'hétérochromatine sans **insulateur**, et justement, les **insulateurs** à la base des boucles vont empêcher cette propagation de cette action combinée d'**HD-Su(var)3-9** et d'**HP1**, et donc permettre d'avoir des domaines de chromatine ouverte quand tout se passe bien.

On a une vision globale de ces domaines, on reprend un peu la même problématique que précédemment avec les 3 niveaux d'expression des gènes **on**, **off** et **compétent**. Donc on peut maintenant plaquer à ces 3 niveaux, l'organisation à la fois en termes de code génétique et tridimensionnel de ces régions, mais également de sensibilité à la nucléase.

Si l'on prend un **gène transcrit** caractérisé par H3 acétylé, la fibre de 11 nm correspond à K4 méthylé. On a un **gène inactif** caractérisé par K9 triméthylé qui va donc être **hypercondensé** et on a des gènes **compétents** qui sont **ouverts mais non transcrits** qui correspondent à la fibre de 30 nm et qui sont caractérisés par un haut niveau d'acétylation avec des sensibilités différentielles à la DNase1.

Au cours de la différenciation, ces profils chromatiniens de condensation vont se modifier. On voit un stade précoce de différenciation d'érythroblaste. Sur le proérythroblaste, à gauche on voit que le noyau en ME et essentiellement ouvert alors que dans l'érythroblaste il s'est largement condensé.



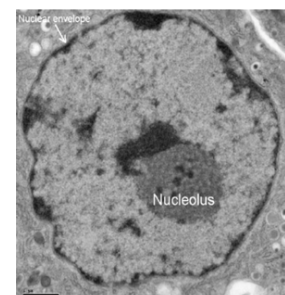
C'est une règle générale, pour reprendre les notions de cellules souches, dans les cellules multipotentes on a donc un état permissif qui va permettre l'expression de beaucoup de gènes **compétents** pour éventuellement les activer en cas de demande de différenciation, c'est le propre des cellules souches et progénitrices. Tandis qu'au fur et à mesure de la condensation, la cellule va restreindre ses possibilités de différenciation et être de plus en plus dans un état non permissif sauf pour les gènes importants dans la fonction cellulaire donnée. Il va y avoir une condensation progressive de la chromatine et une ouverture sélective lors de l'engagement et de la différenciation

On considère qu'une cellule différenciée dans le corps humain a $\approx 90\%$ de sa chromatine qui est hypercondensée laissant libre de s'exprimer les bons gènes sur 10% dans une cellule qui est différenciée de manière terminale.

5) Corps nucléaires & territoires chromosomiques

a) Les corps nucléaires

Un autre niveau d'organisation sont les corps nucléaires et territoires chromosomiques. Le noyau est donc composé d'**hétérochromatine**, d'**euchromatine**, mais il y a aussi d'autres éléments mais qui ne sont pas délimités par une membrane, et notamment le **nucléole**. On connaît maintenant cette organisation globale du noyau, l'ensemble des corps nucléaires est représenté de manière schématique.



Le nucléole

C'est une structure nucléaire proéminente qu'on voit facilement en microscopie conventionnelle ou à contraste de phase, ce qui lui a valu son nom d'organite bien qu'il ne soit entouré d'aucune membrane.

Le **nucléole** est le centre de la synthèse des ribosomes, c'est un domaine nucléaire dynamique, son activité reflète un **équilibre** entre le niveau de **synthèse des ARN ribosomiques** (directement lié à la croissance) et à la **prolifération de la cellule**. Cela veut dire que des cellules qui se divisent activement, ont un gros **nucléole**. D'ailleurs, il disparaît avant la division cellulaire et réapparaît juste après parce qu'il n'y a pas de traduction pendant la mitose. L'assemblage du **nucléole** est un événement très rapide, très précoce quand les cellules rentrent en phase G1 après la phase M.

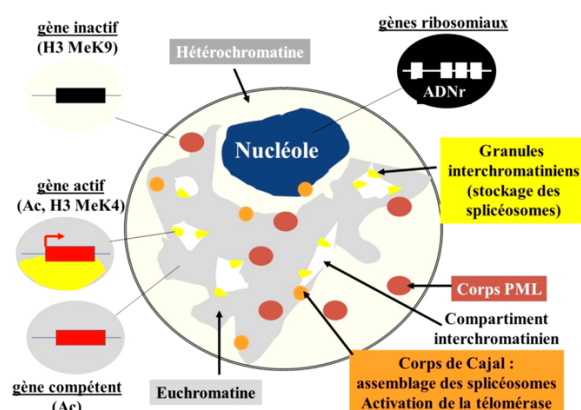
La fabrication des ribosomes est interrompue pendant la mitose mais il y a transmission, il y a une mémoire de la transmission des architectures de la machinerie nucléolaire aux cellules filles. Il y a une très forte concentration d'**ARN ribosomiques** dans le **nucléole** qui correspond à des machineries sophistiquées impliquant un grand nombre d'**ARN** qui vont servir de guide pour la maturation complète des **ARN ribosomiques**.

En dehors du **nucléole**, l'espace à l'intérieur du noyau, le **nucléoplasme**, est différencié en différents domaines. On appelle l'espace inter-chromatidien les domaines où l'on trouve des amas de **granules inter-chromatidiennes** qui sont de 20 à 25 nm de diamètre, rond ou ovoïde, et qui sont relativement résistants aux traitements par des ribonucléases. Ils peuvent être retrouvés dans des préparations de domaine de matrice nucléaire et de **corps pelotonnés**.

Les **corps pelotonnés**, aussi appelés **corps de Cajal**, sont des structures sphériques de 0,3 à 0,5 µm. Ces corps sous nucléaires, **granules inter-chromatidiennes**, et les **corps de Cajal** sont riches en ribonucléoprotéines et sont observés le plus souvent libres dans le nucléoplasme. Le **corps de Cajal** peut être localisé grâce à leurs protéines spécifiques comme les protéines Coiline ou P80, ils peuvent être également associés au nucléole et sont abondants dans les tissus d'animaux en hibernation.

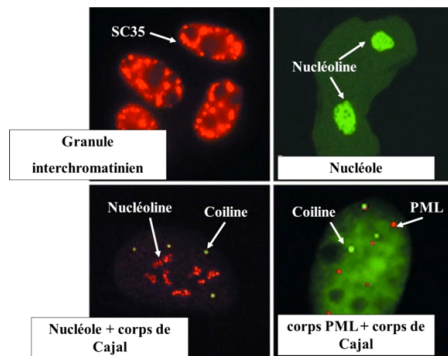
Les amas de **granules inter-chromatidiennes** et les **corps de Cajal ne sont pas des lieux de transcription bien qu'ils contiennent de l'ARN**. Cependant, ils représentent les sites d'accumulation de facteurs d'épissage tels que les snRNA, ce sont des ARN qui interviennent dans l'épissage.

D'ailleurs, les **granules inter-chromatidiennes** contiennent également d'autres facteurs de d'épissage comme les protéines riches en sérine et en arginine tels que la protéine C35, qui sont utilisées comme marqueur de ces **granules**. Donc, on pense que ces 2 corps nucléaires, les **granules inter-chromatidiennes** et les **corps de Cajal jouent un rôle essentiel dans l'épissage des gènes**, dans le stockage des facteurs d'épissage et dans l'assemblage des machineries d'épissage que sont les splicéosomes.



Les corps **PML** sont donc des corps dans la structure est désorganisée dans certaines leucémies promyélocytiques. Ces corps dont la fonction est restée longtemps mystérieuse sont multifonctionnels et sont des corps qui interviennent dans la sumoylation d'un certain nombre de protéines. C'est une modification post-traductionnelle. Ils ont également un rôle régulateur dans les cellules dans la réponse au stress.

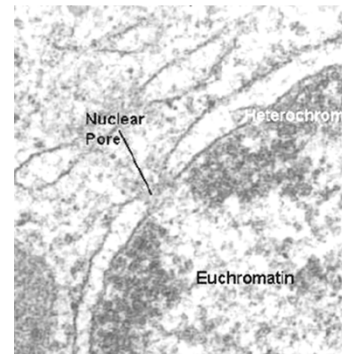
Biologie cellulaire



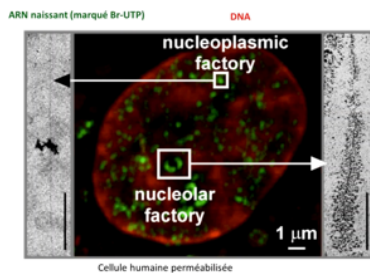
Voici quelques exemples en microscopie, on voit des **granules inter-chromatidiennes** marquées par la protéine riche en sérine et en arginine : SC35. Le **nucléole** qu'on peut caractériser en immunofluorescence grâce à la nucléoline, les **corps de Cajal** et les **nucléoles**, covisualisés en fonction des anticorps que l'on utilise, la Coilin pour les **corps de Cajal** et la protéine PML pour les **corps PML** et voir vraiment qu'ils ne se chevauchent pas et font partie de l'organisation fonctionnelle du noyau.

a) Où sont les gènes inactifs ?

On a ci-contre un agrandissement en ME avec la double enveloppe nucléaire, le pore nucléaire, l'euchromatine et l'hétérochromatine. Celle-ci s'interrompt au niveau du pore nucléaire et la plupart des gènes inactifs sont localisés dans l'hétérochromatine et plutôt en périphérie du noyau.



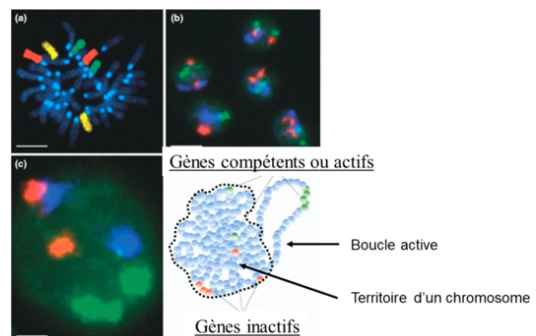
β) Où sont les gènes actifs ?



À l'inverse, les gènes actifs qu'on peut visualiser en microscopie en faisant des marquages très localisés dans le temps avec des précurseurs de la transcription comme le ribonucléotide UTP marqué : Br-UTP. On les visualise en vert, on voit les zones de transcription actives du génome, ils sont plutôt localisés à l'intérieur du noyau.

b) Les territoires chromosomiques

On a encore un niveau supérieur d'organisation des K que sont les territoires chromosomiques et qui fait écho à la technique du FISH[†]. En effet, c'est ainsi qu'on peut les repérer avec des sondes spécifiques et des colorations à chaque K. On peut les visualiser en métaphase, mais en interphase les K ne se mélangent pas beaucoup, et définissant autant de territoires chromosomiques, on est dans une cellule diploïde et donc on a les taches en double (une tache par K).



Si on regarde en termes d'organisation fonctionnelle, on s'aperçoit que les **gènes inactifs sont plutôt localisés à l'intérieur de ces territoires**. Le **gène actif** de ce territoire chromosomique **va sortir et se retrouver à l'extérieur du territoire pour pouvoir être transcrit activement**, c'est un **processus dynamique**. Le gène va revenir à l'intérieur quand le gène sera réprimé.

[†] Cf. Biologie Cellulaire ; Ronéo n°2 ; A) La microscopie optique ; 7) Le FISH - « fluorescent in situ hybridization » ; p.7

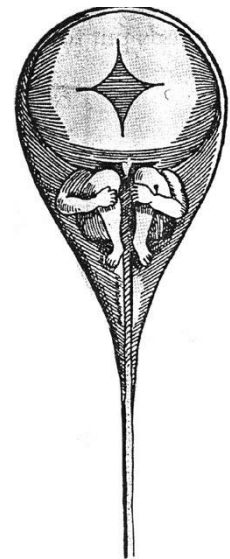
Épigénétique

A) Origine & histoire

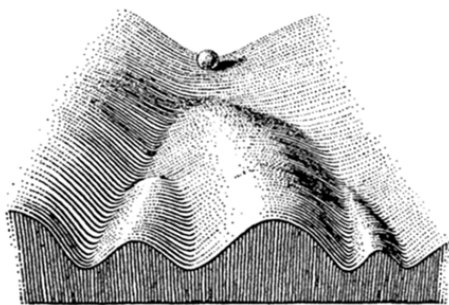
Une autre façon de voir la génétique : l'épigénétique. Il y a plusieurs siècles, une des questions centrales que se posaient les ϕ et les scientifiques pour comprendre comment l'embryogénèse fonctionnait, comment on pouvait faire un homme à partir de très peu de choses. Il y avait plusieurs théories qui s'affrontaient :

- La **théorie de la préformation** : elle a été formulée pour expliquer le développement embryonnaire par le déploiement de structures pré-existantes ;
- La **théorie de l'épigenèse** : elle stipule que les organes se forment progressivement au cours de la croissance embryonnaire sous une influence extérieure.

C'est le ϕ grec Aristote[†] qui a opposé la notion d'épigenèse à la notion de préformation. Une vision de la préformation, telle qu'on pouvait l'imaginer au XVII^e siècle avec la découverte du spermatozoïde, a été popularisée dans l'idée que la tête du spermatozoïde contenait tout le futur bébé, c'est l'homonculus. Le γ féminin servant juste à le nourrir. Il a fallu attendre la fin du XVII^e – XVIII^e siècle avec ce qu'on appelle les embryologistes expérimentaux, dont Harvey, qui a voulu mettre plus en avant les idées d'Aristote et de l'épigenèse. C'est pour cela qu'on appelait cela l'embryologie expérimentale. Il disséquait un certain nombre d'animaux afin de comprendre la forme de l'embryon. Il a acquis la conviction que les embryons se développent peu à peu à partir d'un œuf plutôt qu'à partir d'un corps préformé comme l'homonculus. C'est la grande révolution d'Harvey et on considère que la théorie de l'épigenèse a été emportée à la fin du XIX^e siècle avec le développement de l'embryologie initié par Harvey un siècle avant.



Enfin, on arrive au XX^e siècle, avec un grand personnage qui est le père de l'épigénétique, Conrad Waddington qui est le premier à introduire le terme d'**épigénétique** qui est la contraction de génétique et d'épigenèse. Cela signifie qu'il existe quelque part une interaction entre les gènes et l'environnement qui va déterminer le phénotype de l'embryon et du développement de l'individu correspondant.



Le paysage épigénétique de Waddington

Pour illustrer cette idée d'interaction entre gènes et environnement, on a conçu le **paysage épigénétique de Waddington**. Soit la boule en amont de ce plan incliné la cellule œuf. La cellule œuf va se diviser et former différents organes et à certains moments, elle peut prendre certaines directions qui vont être **irréversibles** en termes énergétiques, si elle s'engage, elle ne pourra pas changer de direction. c'est cette notion de mémoire épigénétique, de **relation entre gène et environnement**.

Une illustration de ce phénomène ce sont les yeux variés de la drosophile[‡] avec des zones blanches et rouges, si l'on applique à l'image du paysage épigénétique, on dit que la cellule blanche a pris la vallée de droite et la cellule rouge a pris la vallée de gauche avec la même séquence d'ADN. Ce qui a été modifié ce sont les **mécanismes épigénétiques**.

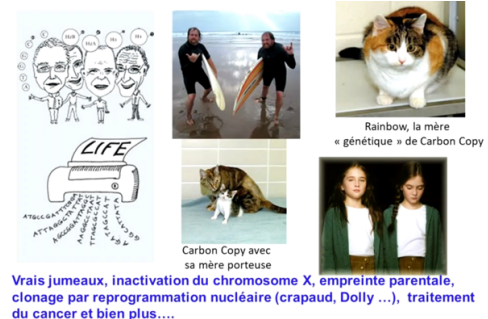
[†] *Ἀριστοτέλης* en VO (oui j'aime le grec si vous n'aviez pas remarqué).

[‡] Cf. Structure & organisation fonctionnelle du noyau ; B) Structure de la chromatine ; 4) L'hétérochromatine ; § « Étude d'une expérience historique » ; §§4 ; p.16

Biologie cellulaire

L'épigénétique regorge d'exemples. Le taux de naissance de jumeaux homozygotes au niveau mondial est de 1/250, ce qui n'est pas rien. On sait maintenant que même si des jumeaux homozygotes sont très proches l'un de l'autre, ils ont des différences épigénétiques qui se produisent au cours de leur histoire de vie et qui vont donc déterminer des petites différences phénotypiques et au niveau de leur comportement.

Un autre exemple classique, le chat calico Rainbow. Les calico sont toujours des femelles à 3 couleurs. Leur coloration s'explique par un phénomène épigénétique qui s'appelle « l'inactivation de X ». L'allèle du gène orange du pelage est situé sur le K X mais il existe un autre allèle de ce gène qui donne une couleur noire. Chez les chattes qui sont XX, dans certaines cellules, un des 2 allèles est inactivé comme dans les yeux de drosophiles, c'est exactement le même phénomène.



Enfin, Carbon Copy a été généré par clonage à partir d'un ovule dont le noyau a été remplacé par le noyau de Rainbow. Bien que la cellule à partir de laquelle Carbon Copy a été clonée avait un X inactif, le programme de développement réactive les 2 K X et le processus d'inactivation se réengage de manière aléatoire, ce qui donne une robe totalement différente même si les 2 individus sont génétiquement identiques, ce qui est une parfaite illustration d'un phénomène épigénétique.

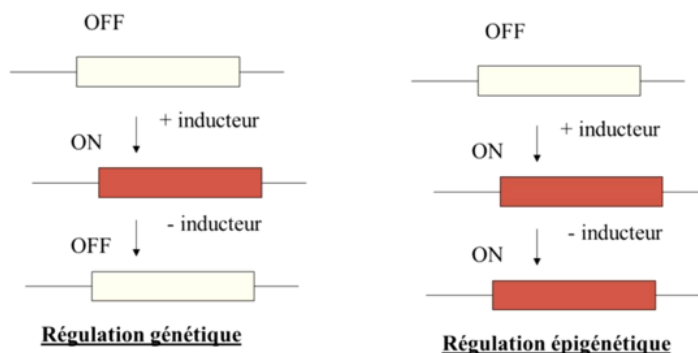
B) Mémoire épigénétique : la méthylation

L'épigénétique est un phénomène héritable, c'est-à-dire qui se transmet d'une cellule à une autre au cours de la division cellulaire, mais qui ne peut pas s'expliquer uniquement par la séquence d'ADN transmise, c'est-à-dire ce qui est transmis au cours de la division cellulaire est donc quelque chose qui n'est pas codé par l'ADN. En fait, c'est codé par la chromatine, c'est pour cela qu'on a donné comme terme aux modifications post-traductionnelles des histones le nom de code histone, qui est maintenant appelé « code épigénétique ».

Une erreur à ne pas commettre est de penser que tout ce qui est modification de chromatine est un phénomène épigénétique car c'est un abus de langage. Pour qu'un phénomène soit épigénétique, même s'il s'explique par la chromatine, il faut qu'il puisse être transmis au cours de la division cellulaire, ce qui n'est pas le cas de tous les phénomènes chromatinien. Un de ces mécanismes parmi tant d'autres est la **méthylation**.

Non pas la méthylation des protéines histones, mais la **méthylation de l'ADN**. C'est ce qui va déterminer en partie ce qu'on appelle la **mémoire épigénétique**, cette transmission d'informations d'une cellule à l'autre sans être codé par la cellule.

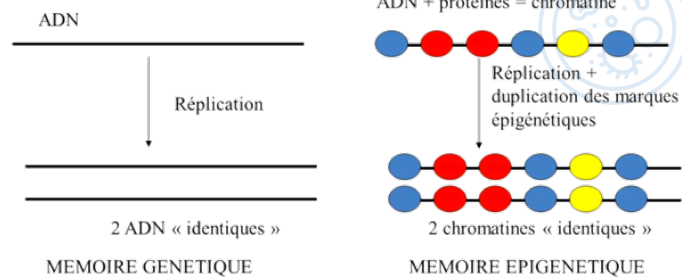
Qu'est-ce qu'une régulation génétique ?



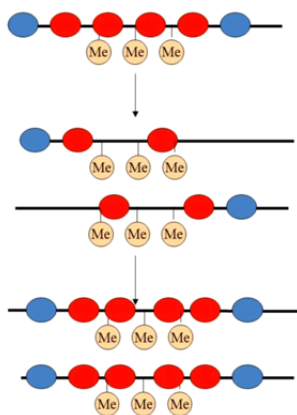
On a un gène **off** en présence d'un facteur exogène (ex : facteur de croissance, sucre etc). Le gène devient **on** car on en a besoin pour la cellule, on enlève le facteur exogène, le gène devient **off**, il n'y a pas de mémoire. Pour que ce type de régulation soit épigénétique, il faut que lorsqu'on enlève l'inducteur, la cellule **garde la mémoire de l'état on du gène**.

Biologie cellulaire

Qui dit division des cellules dit réplication. On a à gauche la réplication à l'identique de l'ADN, c'est donc la **mémoire génétique**, mais ce n'est pas comme cela que ça se passe dans la cellule. On n'a pas l'ADN nu mais de la chromatine, cela signifie que le rôle de la réplication ne va pas être uniquement de répliquer l'ADN (ce qui est central), mais aussi de répliquer à l'identique, si possible, toute l'architecture chromatidienne associée à cet ADN, c'est la **mémoire épigénétique**.



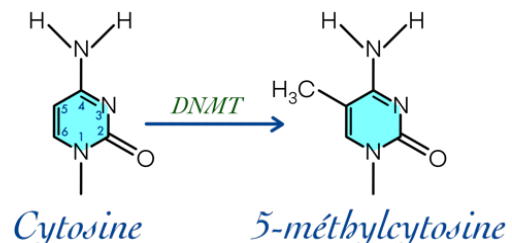
Quand cela ne se fait pas, on a répliqué l'ADN mais on a perdu la mémoire de cet état chromatidien et dans ce cas-là, cet **état chromatidien n'est pas épigénétique**.



Cette mémoire est transmise par différents mécanismes au cours de la réplication, mais, un des mécanismes bien connus est la **méthylation de l'ADN**.

On imagine qu'en haut on a un état épigénétique caractérisé par un certain état des nucléosomes, avec un certain niveau de méthylation de l'ADN. Quand on va répliquer l'ADN, on va répartir les nucléosomes ainsi que la méthylation, mais la **méthylation va être maintenue**, et c'est cette méthylation qui va permettre de repositionner les nucléosomes au bon endroit sur le K.

Chez les mammifères, c'est essentiellement la **méthylation de la cytosine en position 5** pour donner la 5-méthylcytosine, catalysée par les DNMT (ADN méthyltransférases).



Généralités de la méthylation de l'ADN chez les vertébrés

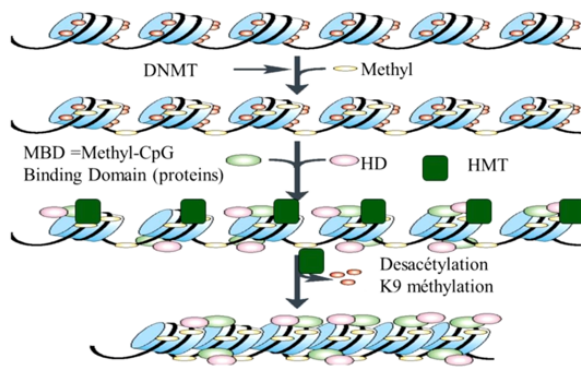


Pas toutes les cytosines peuvent être méthylées, seul le dinucléotide CpG est méthylé. Dans 98% du génome humain, CpG est sous-représenté et méthylé. Dans les 2% restants, CpG est représenté normalement et sous-méthylé : ce sont les îlots CpG qui sont souvent associés à des gènes.

Les îlots CpG (≈ 1 kb) sont généralement localisés en amont de gènes actifs : ils sont importants pour leur activation.

On a un peu les mêmes règles qu'on avait au niveau du code histone, les régions méthylées de l'ADN sont des régions inactives généralement. Donc, on retrouve la méthylation de l'ADN au niveau de l'hétérochromatine, au niveau du K X inactif chez les femmes et des régions soumises à l'empreinte.

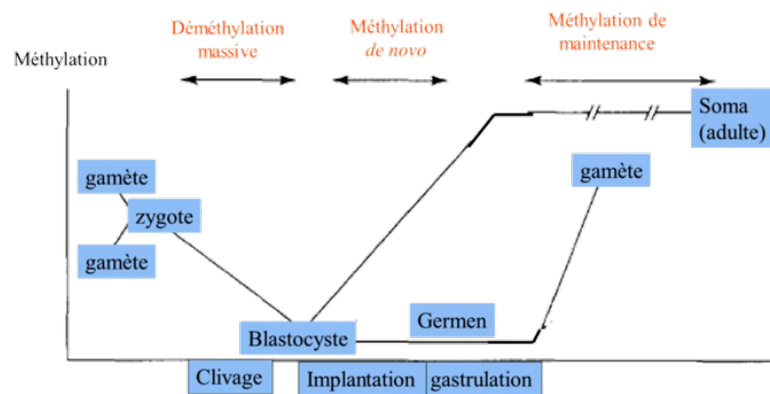
Biologie cellulaire



Les gènes sous-méthylés sont généralement des régions actives. Il existe un lien entre la méthylation de l'ADN et la méthylation des histones. On a les DNMT qui vont méthyler l'ADN sur cette fibre nucléosomale. L'ADN méthylé va servir de site de fixation de protéines qui vont reconnaître l'ADN méthylé (MBD) qui vont s'associer à des histones méthyltransférases et vont méthyler la lysine 9 et former de l'hétérochromatine et donc une chromatine condensée.

Cet état de méthylation varie au cours du temps, on a des niveaux de méthylation différents entre le γ mâle et femelle qui vont former le zygote. Ce qui se passe au niveau des premières divisions jusqu'au stade blastocyte, ce sont des **déméthylations massives mais pas complètes**. On va donc perdre en grande partie de la mémoire héritée des parents à travers les γ . Pendant le reste de l'embryogenèse, c'est-à-dire pendant la formation des organes (implantation, gastrulation, etc), on va reméthyler comme il faut : la méthylation de novo dans les tissus somatiques. La lignée germinale sera reméthylée au moment de la γ -ogénèse chez l'adulte.

Cela signifie que tout se passe bien durant l'embryogenèse, relation gènes-environnement et une fois que cette méthylation au cours de l'embryogenèse est terminée, chez l'adulte il faut la maintenir, c'est ce que l'on appelle la **méthylation de maintenance**, à chaque division cellulaire qui perpétue la mémoire épigénétique.





Index

ADN : acide désoxyribonucléique	H _{2B} : histone 2 _B
ARN : acide ribonucléique	H ₃ : histone 3
ARNm : acide ribonucléique messenger	H ₄ : histone 4
ATP : adénosine triphosphate	K : chromosome
Br-UTP : 5-Bromo-uridine-5'-triphosphate	kDa : kilo Dalton
DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole	M : mitose
DNAse1 : deoxyribonuclease 1	MBD : Methyl-CpG-binding domain
DNMT : DNA methyltransferase	ME : microscopie électronique
EKLF : krueppel-like factor 1	Myf5 : myogenic factor 5
En(var) : enhancer of variegation	MyoD : myoblast determination protein 1
FISH : fluorescence in situ hybridization	NAD : nicotinamide adénine dinucléotide
FLI-1 : friend leukemia integration 1 trans- cription factor	N-ter : azote terminal
FR : facteur de remodelage	NuMa : nuclear mitotic apparatus protein
GR : globule rouge	Pdb : paire de bases
G1 : gap1	PEV : position effect variegation
HAT : histone acétyl transférase	PML : promyelocytic leukemia protein
HDAC : histone déacétylase	REG : réticulum endoplasmique granuleux
HD : histone désacétylase	snRNA : small nuclear RNA
HDM : histone déméthylase	Su(var) : suppressor of variegation
HMT : histone méthyl transférase	TATA box :
HP1 : heterochromatin protein 1	UTP : uridine triphosphate
H ₁ : histone 1	γ : gamète
H _{2A} : histone 2 _A	φ : philosophe

Dédi

C'en est enfin fini de cette fiche extrêmement longue, mais si elle vous a aidé à mieux comprendre ce cours alors ça vaut la peine. L'avantage des fiches c'est que je peux mettre des couleurs, alors je n'ai pas lésiné dessus vous l'aurez remarqué.

Je fais une petite dédi aujourd'hui, mais évidemment, dédi au meilleur co-tut, dédi aux fillots, les miens comme celles de SJA qui se reconnaîtront, explosez-moi cet exam par pitié.

Vous avez sans doute remarqué qu'on arrive au mois de novembre, c'est le mois le plus dur de l'année en général, parce que c'est le début de la fin, le début des jours tristes et sombres ou le soleil devient juste un souvenir, mais faut vraiment tenir, c'est là où vous tirerez réellement votre épingle du jeu, du moment que vous êtes combattifs ! On vous l'a déjà dit, mais le S1 c'est vraiment une course contre la montre vu le nombre colossal de cours que vous avez pour le peu de temps pour les assimiler, alors l'important c'est surtout de ne pas s'égarer, ne perdez pas votre temps avec des choses inutiles, faites des QCM, beaucoup de QCM, et votre travail paiera !

Soyez courageux, parce que c'est vraiment maintenant que vous rentrez dans l'arène !

Force à vous, c'est clairement pas tout le monde qui peut faire ce que vous faites !



UNIVERSITÉ
CÔTE D'AZUR | FACULTÉ
DE MÉDECINE



iPad

