

ORGANISATION DU NOYAU

L'ADN fait à peu près 2m dans un noyau qui fait quelques microns, la condensation est indispensable pour le faire rentrer dans le noyau (plusieurs milliers de fois).

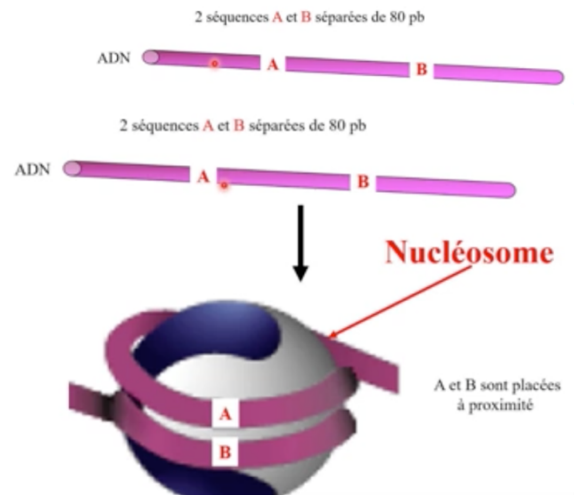
Exemple : Séquences A et B pour étudier les plusieurs niveaux de compaction

Si ces deux séquences (A et B) sont distantes de 80 pb, elles vont se retrouver proches dans le nucléosome, dans le génome.

On estime une condensation d'un facteur 7 sur l'ensemble du génome.

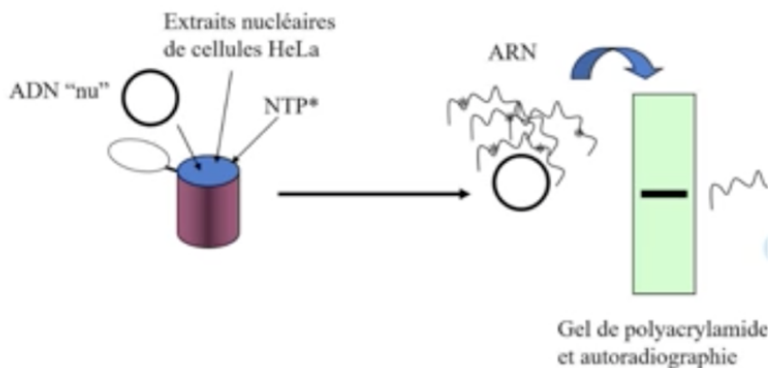
Début de la condensation = formation du nucléosome puis de la fibre nucléosomale

L'ADN doit être compacté plusieurs milliers de fois pour entrer dans un noyau



Deux études en laboratoire :

La transcription *in vitro* est inhibée par la chromatine



1.

Conditions initiales : On prend des extraits nucléaires de cellules HeLa humaines dérivant de cancers (très utilisées)

Marqués par : Nucléotides isotopes radioactifs pour les suivre facilement par autoradiographie + utilisation de gel polyacrylamide (pas dénaturant dans ce cas, donc sans SDS)

But : Savoir s'il peut être **transcrit**

Résultats : L'ARN migre en fonction de sa taille et par autoradiographie, on visualise le produit de transcription.

→ **ARN transcrit**

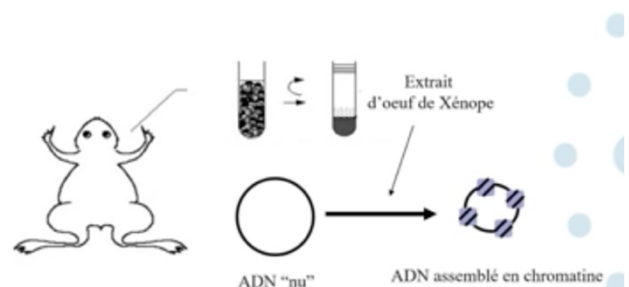
2.

On étudie le système expérimental suivant : œufs de Xénope. On les centrifuge pour obtenir un concentrat d'extraits d'œufs qui est une source d'activités biologiques nécessaire pour faire de la chromatine.

Cet extrait, mis en contact avec de l'ADN nu s'associe en chromatine (on peut l'étudier et on refait la même expérience que celle faite sur les cellules HeLa) :

Résultats : L'ADN est assemblé en **chromatine**

Etude de la chromatine *in vitro* : Assemblage de la chromatine à partir de l'ADN par les œufs de Xénope



→ Sur le gel, rien n'est visible car la transcription n'a pas eu lieu. Lorsque l'ADN s'assemble en chromatine, la transcription ne se fait pas.

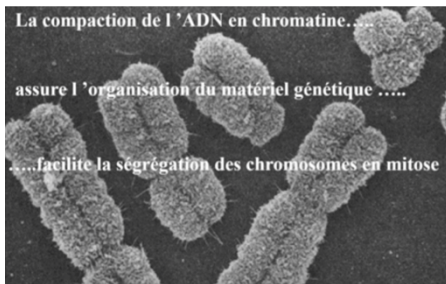
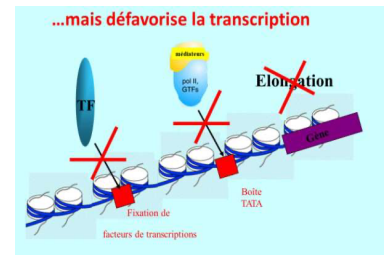


Photo des chromosomes métaphasiques

Cette **condensation** de la **chromatine** est bonne pour permettre la **ségrégation** des gènes en mitose, mais **défavorise** la **transcription**.



Tous les **éléments de régulation** de l'expression des gènes (ARN polymérases, médiateurs, facteurs de transcription...) ne pourront **pas accéder** à leur site d'action car l'ADN va être masqué par une structure **condensée** de chromatine. Pour faire cette transcription, ils doivent être débloqués.

I. LE NUCLÉOSOME

Premier niveau d'organisation de la chromatine : **Nucléosome**

Organisation spécifique le long de la molécule d'ADN : **Fibre nucléosomale** (voir plus bas)

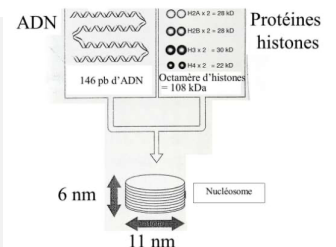
A. STRUCTURE DU NUCLÉOSOME

Fiche d'identité du nucléosome

Forme : Petit **cylindre** de 6 nm de hauteur pour 11 nm de diamètre

Composition : **4 paires** de protéines appelées histones

→ **Octamère** d'histones = **8** protéines d'histones qui sont regroupées en 4 dimères d'histones : **2*H2A + 2*H2B + 2*H3 + 2*H4** +++



GÉNÉRALITÉS DES HISTONES

Charge : Protéines **basiques**, riches en AA chargés **positivement**, qui vont s'assembler ensemble pour **enrouler** l'ADN, plus précisément, un octamère enroulé par **146/147 paires** de base d'ADN, soit **2 tours** d'ADN

NB : L'ADN est chargé **négativement**, il est donc fortement attiré vers l'histone (+), c'est pourquoi il s'enroule autour de lui

Poids moléculaire d'un octamère d'histones : 108 kDa

La cellule synthétise les constituants de base des nucléosomes : il existe des propriétés d'autoassemblage, mais on a besoin d'aide pour augmenter l'efficacité de la réaction : rôle des protéines chaperons.

DISPOSITION DES HISTONES DANS LE NUCLÉOSOME

☀ La disposition se fait en fonction des modifications post-traductionnelles (voir plus bas ^^).

Partie globulaire centrale	Queues N-terminales périphériques
1) Au centre 2) Composés d'AA basiques chargés positivement (principalement de l'histone ou de l'arginine)	1) En périphérie (non inclus dans le cœur du nucléosome), passage / sortie entre les 2 tours de l'ADN pour aller vers l'extérieur, donc en surface du nucléosome 2) Chargées positivement (riches en AA basiques) 3) Non structurées, partie exposée aux modifications (voir plus bas !!) 4) Portent une série d' informations qui vont être interprétées par la cellule à travers une série de modifications post-traductionnelles qui vont affecter ces queues d'histones, facilement dégradables par des trypsines

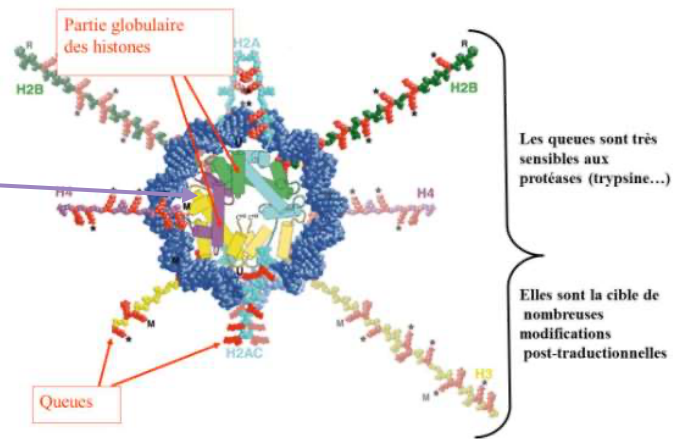
DESCRIPTION SCHÉMA

→ 4 paires d'histones

→ Partie **globulaire** : **cylindre** au centre

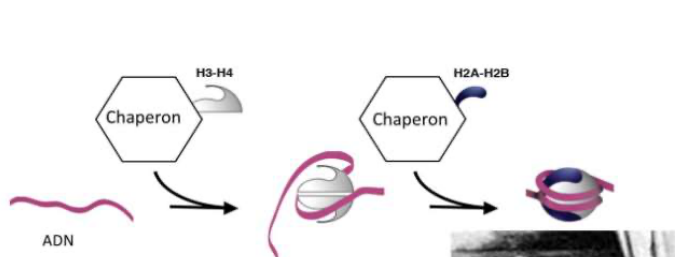
→ Queues des histones représentées par de longues **extrémités** toutes droites car elles ne sont pas structurées

→ **ADN** en bleu qui forme une boucle au centre



ASSEMBLAGE DES HISTONES

→ L'association de l'octamère d'histones avec l'ADN se fait spontanément.



PROTÉINES CHAPERONES

Définition : PAS des **enzymes** mais des protéines

Rôle : **Facilitent** et **guident** l'appariement entre l'octamère et l'ADN

Ordre d'assemblage des histones (PAS au hasard) :

- 1) Association d'une protéine **chaperon** à **H3 et H4**
- 2) Formation d'un **hétérodimère H3/H4** sous l'aide la protéine chaperon
- 3) Formation d'un **hétérodimère H2A/H2B** sous l'aide la protéine chaperon
- 4) **Départ** des protéines chaperones

B. DIVERSITÉ DU NUCLÉOSOME

Les nucléosomes ne sont PAS tous identiques, tous uniques !
On retrouve une structure nucléosomale commune qui présente des différences.

Les nucléosomes vont être modifier en fonction des **besoins** de la cellule (expression ou répression des gènes) de 3 façons différentes :

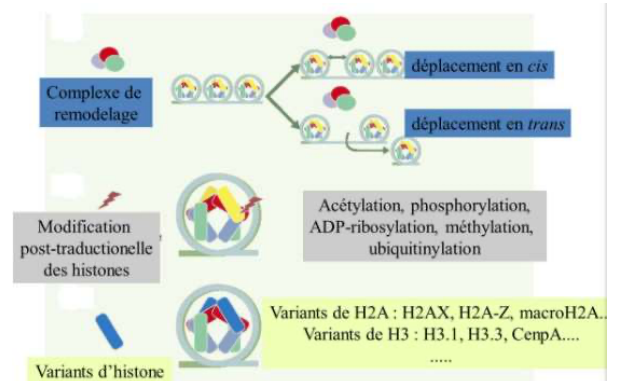
- Complexe de remodelage
- Variants d'histones
- Modifications post-traductionnelles des histones

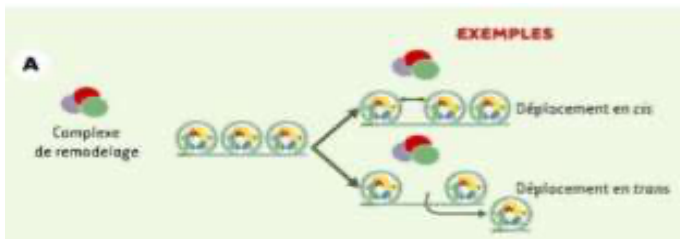
COMPLEXE DE REMODELAGE

Rôle : **Déplacer** un nucléosome en fonction de sa localisation (permet la diversité de position des nucléosomes)

Élément nécessaire : Consommation **d'ATP** (besoin d'énergie)

NE : On déplace les nucléosomes car on veut bloquer la transcription à un autre endroit et pas à l'endroit où le nucléosome est (il existe des endroits sans nucléosome).





VARIATION DES DÉPLACEMENTS

→ En **CIS** (haut sur le schéma) = le **long** du même brin de l'ADN
 → En **TRANS** (bas sur le schéma) = **départ** du nucléosome du brin d'ADN initial pour rejoindre une **autre** molécule d'ADN (apport d'un nucléosome depuis l'**extérieur**)

VARIANTS D'HISTONES

→ Il existe **pleins** de gènes codant pour **H2A, H2B et H3 ++**
 → Ces différents gènes vont donc coder pour différentes histones correspondant aux variants d'histones H2A, H2B et H3.
 → Chaque variant a une fonction / propriété **particulière** par rapport à certains domaines de chromatine. Ces variants ont toujours la possibilité de se modifier **post-traditionnellement**.

💡 RAPPEL :

Octamère classique :
 H2A + H2B + H3 + H4

⚠ H4 est codée par un **seul gène**, on ne retrouve **PAS** de variant +++

Variant de H2A	Variant de H3
H2AX	H3.1
H2A-Z	H3.3
MacroH2A	CenpA

C. CODE HISTONE

Le code **histone** est :

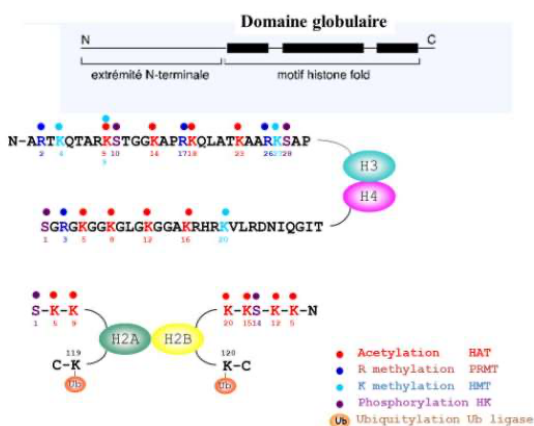
→ Lié à la diversité des **modifications** post-traductionnelles des histones
 → Facilement **modifiable**
 → Se rajoute au code **génétique** (ADN : ATCG)

Le code **génétique** (traduit par des ribosome) est le **même** pour toutes les cellules mais le code **histone** est **variable** en fonction du **type** cellulaire +++

Le code **épigénétique** :

→ Se superpose au code **génétique**
 → Correspond aux **modifications** post-traductionnelles + utilisation de différents **variants** d'histones

SCHEMA



On retrouve des queues N-terminales composées de différents AA. Les petits points à côté des AA correspondent aux modifications potentielles. Certains AA ne présentent pas de petits points car **toutes** les histones ne sont **pas modifiables**, et certaines modifications sont **alternatives**.

Exemple :

Lysine 9 de l'histone 3 (notation : H3K9) présente 2 petits points qui correspondent soit à une méthylation soit à une acétylation (PAS les 2 en même temps !)

En fonction du type de combinatoire de modifications exposées à la surface du nucléosome, on a une information que la cellule est capable de décoder, d'où le nom de code d'histone.

Le code histone est étudié aussi pour voir comment il peut servir pour développer de nouveaux agents thérapeutiques (osef)

Les modifications post-traductionnelles + l'utilisation des différents variants d'histones constituent un code qui se superpose au code génétique (séquence de nucléotides) = informations nécessaires à la cellule pour exprimer tel gène (ON) et réprimer tel gène (OFF).

Tous ces codes communiquent des informations supplémentaires à la cellule sur son programme d'expression et de transcription de gènes.

LECTURE DU CODE DES HISTONES

Les modifications post-traductionnelles qui se trouvent généralement sur les queues des histones vont être lues spécifiquement par des **protéines particulières** (dans le noyau) qui vont réguler l'expression des gènes :
→ Protéines **non-histones**, **activateurs** ou **répresseurs** de la transcription (permettent différentes actions)

Modifications post-traductionnelles	Reconnue par	Actions
Lysines acétylées	Protéines à bromodomaines	Recrutement de facteurs de transcription pour les zones hyperacétylées
H3K9 et H3K27 méthylées	Protéines à chromodomaines : → HP1 reconnaît les histones méthylées en K9 → Polycomb pour K27	Lorsqu'on méthyle K9 ou K27, on forme de l'hétérochromatine (rôle de HP1)
H3S10 (sérine 10) phosphorylées	Protéines à domaine « 14-3-3 »	Facilite l'acétylation et l'activation de l'expression des gènes en réponse au stress
<i>Non-dit</i> : H4K20 diméthylée (H4K20me2)	Protéines à domaine Tudor	Rôle dans la réparation de l'ADN

NB : C'est un tableau bien relou mais il ne faut pas retenir chaque détail, le prof dit qu'il faut retenir la phrase juste avant le tableau.

Il existe une importante **relation** entre la **structure** de la chromatine et l'**expression** des gènes ++

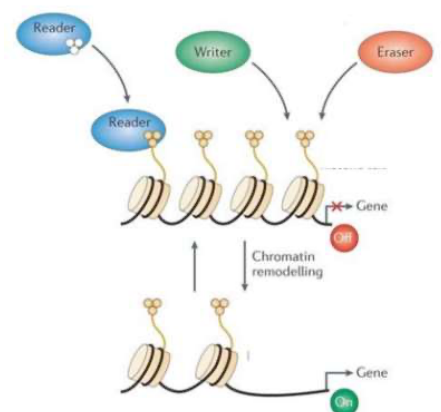
3 catégories de protéines permettent l'**organisation** de l'expression des gènes :

✎ « **Writer** » celles qui **écrivent** le code, responsable des **modifications** car parfois elles font des erreurs (ex : enzymes de type HAT, HDM...)

📖 « **Readers** » celles qui **lisent** le code (ex : protéines à domaine tudor, chromodomaine...)

🧰 « **Erasers** » celles qui **effacent** le code (ex : déméthylase)

Modèle général de la fonction du code histone



C'est l'ensemble de ces catégories de protéines de fonction qui fait que localement la séquence promotrice va être acétylée, éventuellement soumise au remodelage de la chromatine...

TRADUCTION FONCTIONNELLE DU CODE DES HISTONES ++

L'activation ou l'inactivation des gènes est liée aux modifications **post-traductionnelles**.

⚠ C'est lié au **type** de modifications et à sa **localisation** (On remarque qu'une méthylation en H3K4 n'a pas le même effet qu'une méthylation en H3K9) ++

Chromatine HYPERacétylée	→ Transcription active
Chromatine HYPOacétylée	→ Transcription inactive
Chromatine méthylée	En K4 (Lysine 4/ Histone H3) → Transcription active En K9 (Lysine 9/ Histone H3) → Transcription inactive

Il existe une relation entre les modifications post-traductionnelles et le niveau de transcription des gènes.

D. MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DES HISTONES

Après la synthèse par le ribosome, la protéine peut subir des modifications. Pour les histones, les modifications spécifiques peuvent se dérouler après la traduction dans le cytosol (avant de revenir dans le noyau) ou directement au niveau du noyau si les enzymes sont présentes. On retrouve comme modifications :

→ Acétylation ++ → Phosphorylation → Ubiquitinylation
→ Méthylation ++ → ADP-ribosylation

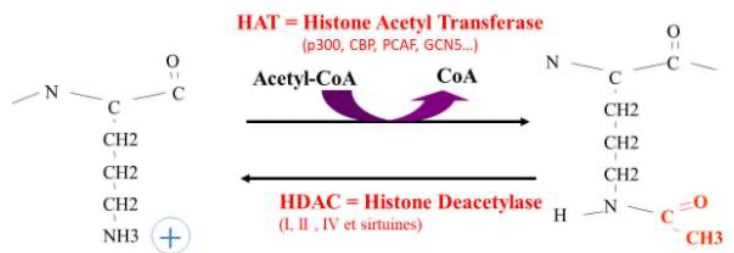
Les modifications des histones sont contrôlées par des **enzymes spécialisées** qui peuvent notamment être des **co-activateurs** ou des **co-represseurs** en interagissant avec les facteurs de transcriptions. Les **FT** sont donc capables de **s'associer** (rôle des FT) à des co-activateurs ou co-répresseurs (comme HAT ou HD) qui portent ces activités de modification des histones.

1. ACÉTYLATION (EN -OH) SUR LES LYSINES

Enzymes catalysant la réaction : **HAT** (Histone Acétyl Transférase)

Activité des HAT : **Co-activateurs** car ils **favorisent** la transcription en modifiant la structure locale de la chromatine, permettant son **accessibilité** aux éléments de transcription

Co-facteur / Co-enzyme : **Acétyl-coA**



Les exemples ne sont pas à retenir par cœur !

EXEMPLE : On voit sur l'image du-dessus que l'acétyl-CoA est donneur de son groupement acétyl qui va être transféré sur la lysine qui possède une chaîne latérale avec un NH_3^+ (à gauche). À l'inverse, HDAC enlève ce groupement acétyl.

2. DÉACÉTYLATION

Enzymes catalysant la réaction inverse : **HDAC** (Histone désacétylase), il existe plusieurs types de HDAC en fonction de la localisation, de la fonction, du type cellulaire

Activité des HDAC : **Co-répresseurs** car ils **défavorisent** la transcription en modifiant localement la structure de la chromatine qui devient **moins accessible** aux éléments de la transcription.

3. MÉTHYLATION SUR LES LYSINES ET ARGININES

Enzymes catalysant la réaction : **HMT = HMTases** (Histone Méthyl Transférase), il en existe **plusieurs** types qui ont chacune des **domaines** (positions des lysines sur les histones) et des **actions** spécifiques (mono, di, tri).

Il est possible de passer d'**aucune** modification à **3** méthylations. Une lysine peut donc être :

→ **Mono**-méthylée

→ **Di**-méthylée

→ **Tri**-méthylée

En fonction de son niveau de méthylation et la position de la lysine, on retrouve des **propriétés/fonctions différentes** de l'histone et l'enzyme utilisée sera différente.

4. **DÉMÉTHYLATION** : Catalysée par les enzymes **HDM** (Histone DéMéthylases)

La méthylation des lysines des histones et la méthylation de l'ADN sont 2 choses bien distinctes +++

☀ RAPPEL :

Acétylation et déacétylation : LYSINE ++

Méthylation et déméthylation : LYSINE + ARGININE ++

E. EXEMPLES

1. EXEMPLE DE L'IMMUNOPRÉCIPITATION DE CHROMATINE

Dans les années 80-90, c'est la technique de l'**immunoprécipitation de chromatine** qui fait l'objet d'étude.

But : Étudier le code de la chromatine

Éléments nécessaires : Agents spécifiques pour le lire

1. **Figer** la cellule dans un état : **pontage/crossing** avec le formaldéhyde (entre ADN et protéines et entre protéines)

2. Préparation des extraits par **fragmentation**, par ultrasons et **purification** de la chromatine

But : Savoir la couleur du nucléosome

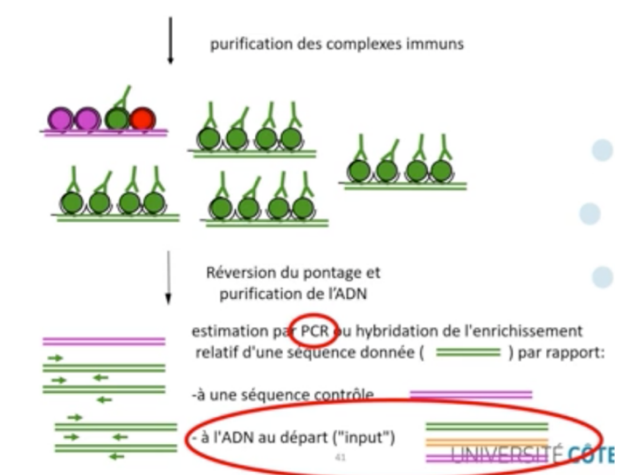
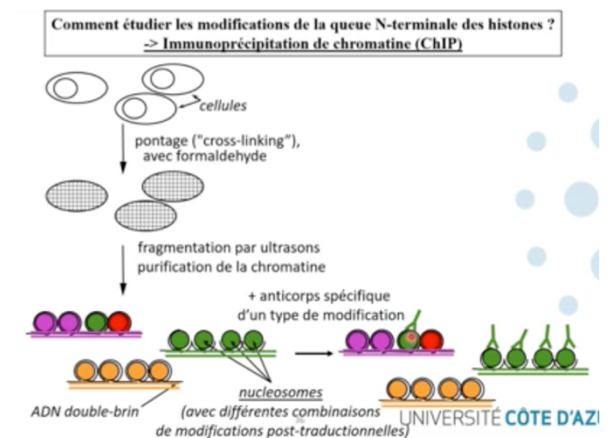
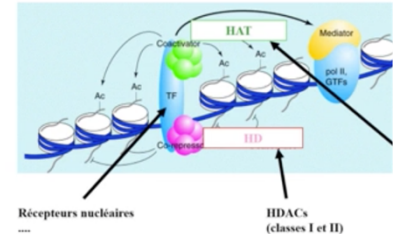
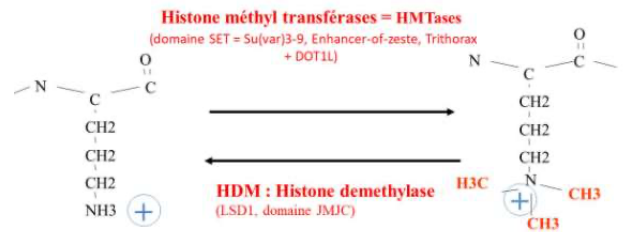
Comment ? : Production d'**Anticorps** (Ac) **spécifiques** d'un type de **modification** post-traductionnelle des histones +++

3. **Incuber** les fragments de chromatine avec ces **Ac** (ici ce sont des Ac qui **reconnaissent** les **modifications** des **nucléosomes** verts)

Il faut calculer le **degré d'enrichissement** dans ces fragments de chromatine verte par rapport aux autres, pour donner une réponse sur la présence de cette modification sur telle ou telle séquence d'ADN.

4. **Renverser** le pontage et **purifier** la partie ADN (surtout en vert) = l'ADN **associé** à la chromatine porte cette **modification**

Il faut compter le nombre de molécules d'ADN en vert, il existe plusieurs possibilités, on utilise : Technique par **PCR**



1. **Amplification** de la séquence d'ADN d'intérêt + amplification de la séquence de contrôle associée à l'ADN de départ (input)

2. **Précipitation**

→ Cette PCR peut être rendue **quantitative**.

2 Réactions à étudier :

→ L'**immunoprécipitat** (solution test)

→ L'**input** (situation de départ)

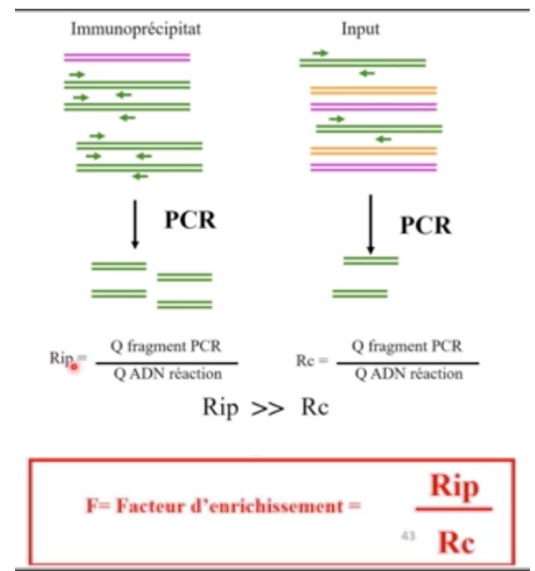
Premier facteur : estimation de la **quantité** des **fragments PCR**, de l'immunoprécipitat par rapport à l'input

Deuxième facteur : facteur **contrôle**

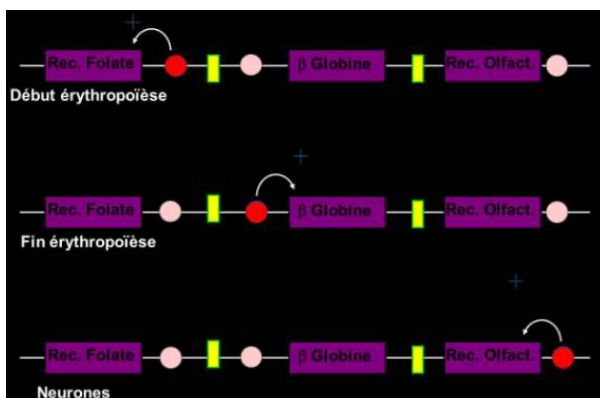
✍ Interprétation des résultats :

Si le facteur de l'**immunoprécipitat** est très largement **supérieur** au fragment **contrôle**, cela veut dire qu'on est en présence d'un **enrichissement** de ce fragment vert. L'Ac utilisé a reconnu une présence en grande quantité de la modification post-traductionnelle.

→ Donc dans les cellules de départ, on avait dans les séquences vertes du promoteur, le gène qui nous intéresse



2. EXEMPLE DES TROIS GÈNES



DESCRIPTION DU SCHÉMA

Des éléments de régulation à distance sont présents pour réguler l'expression des gènes en fonction de la spécificité des tissus :

→ Rectangle : **insulateurs**

→ Ronds : **enhancers**

On étudie une région d'un chromosome composé de **3 gènes** :

→ Gène du récepteur **folate**

→ Gène codant pour la **béta globine**

→ Gène codant pour un **récepteur olfactif**

N.B. : Ces 3 gènes ne s'expriment pas dans les mêmes cellules !!

On utilise toute une série d'amorces PCR pour naviguer dans ce génome

🔦 RAPPEL :

Acétylation : chromatine active

Méthylation : chromatine active pour K4 et

Il existe des techniques expérimentales pour déterminer le niveau d'acétylation des histones. Sur l'expérience, la **quantité** d'histones H3 acétylées est représentée par le trait rouge : + le trait monte en **ordonnée**, + on a un **enrichissement** en acétylation.

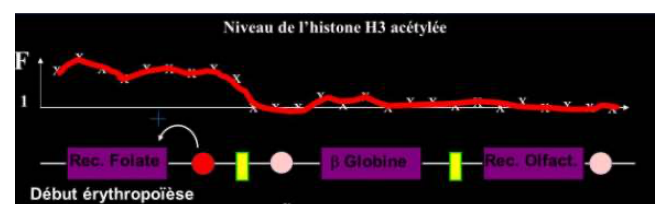
1. AU DÉBUT DE L'ÉRYTHROPOÏÈSE

Éléments nécessaires : Récepteur **folate** qui est exprimé par l'enhancer

→ Beaucoup **d'enrichissement** au niveau de récepteur folate avec beaucoup d'histones H3 **acétylées**

Éléments NON nécessaires : Gène **béta globine** et encore moins du récepteur **olfactif** qui sont tous les 2 **réprimés** grâce à la présence de l'insulateur qui empêche l'action de l'enhancer

→ **Pas** beaucoup d'enrichissement car non exprimés



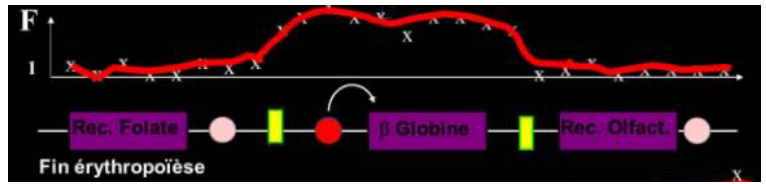
2. À LA FIN DE L'ÉRYTHROPOÏÈSE

Éléments nécessaires : Gène **béta globine**

→ Gène exprimé au niveau duquel on retrouve un **enrichissement** avec beaucoup d'histone H3 acétylées

Éléments NON nécessaires : Récepteur **folate** ni du récepteur **olfactif** (qui n'a rien à voir avec l'érythropoïèse, c'est pourquoi il est réprimé dans ce type de tissu)

→ Tous les 2 réprimés donc **sans** enrichissement (perte de l'enrichissement qu'on avait initialement au niveau du récepteur folate)



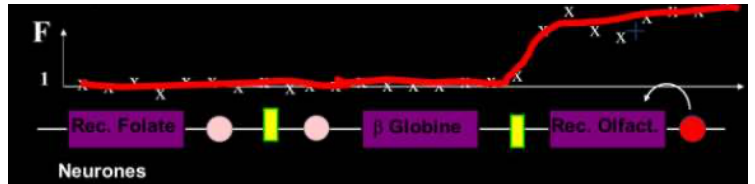
3. DANS UN NEURONE

Éléments nécessaires : Gène du récepteur **olfactif**, utile pour le **neurone**

→ **Enrichissement** au niveau de ce gène avec des histones acétylées

Éléments NON nécessaires : **L'érythropoïèse** ne sert strictement à **rien**, donc les gènes qui participent à ce phénomène (folate, béta globine) sont **réprimés**

→ Aucun enrichissement au niveau de ces 2 gènes



L'**acétylation en H3** est en général associée à une transcription **active** du gène +

Il existe une relation entre les modifications **post-traductionnelles** et le niveau de **transcription** des gènes +

II. LA FIBRE NUCLÉOSOMALE

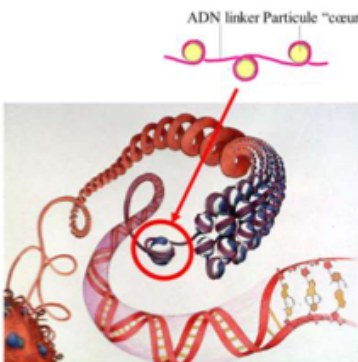
Niveau d'organisation supérieur de l'ADN : Fibre nucléosomale

→ C'est un **assemblage** de **nucléosomes** les uns à côté des autres.

→ Il existe 2 niveaux d'organisation de cette fibre.

A. PREMIER NIVEAU

FIBRE DE 11 NM



⊗ Association de nucléosomes (eux formés par un enroulement de l'ADN autour des octamères d'histones)

⌘ **ADN linker / de liaison** : ADN reliant 2 nucléosomes voisins

⌘ Fibre : cylindre de **11 nm** de diamètre (correspondant au diamètre du nucléosomes)

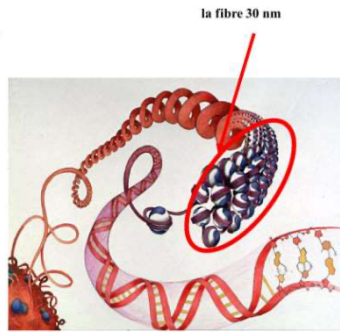
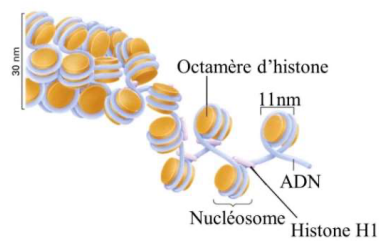
⌘ Ressemble à un collier de **perles**

⌘ Correspond à une conformation **ouverte** de l'ADN ++

B. DEUXIÈME NIVEAU

On passe du premier au deuxième niveau grâce à **H1** qui permet une transition conformationnelle vers une structure de 30 nm. L'histone 1 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**.

L'histone H1 condense la fibre 11nm en fibre 30 nm



FIBRE DE 30 NM

Å Fibre de 30 nm de diamètre qui correspond à un peu moins de 3 nucléosomes = **solénoïde**

Structure encore plus **condensée**

Correspond à une conformation **fermée** de l'ADN ++

H1 ne fait pas partie de l'octamère d'histones du nucléosome (H2A + H2B + H3 + H4) +++
La transition entre la fibre de 11nm et 30nm fait intervenir H1 +

Ces différents niveaux **d'organisation** correspondent à différents **niveaux d'accessibilité** des éléments de régulation de l'expression des gènes. Moins c'est condensé, plus c'est accessible ++

C. REMODELAGE DE LA FIBRE NUCLÉOSOMALE

Au niveau des promoteurs, il faut souvent remodeler la fibre des nucléosomes pour permettre la fixation de protéines régulatrices.

FACTEURS DE REMODELAGE (FR) (= COMPLEXE DE REMODELAGE)

→ Grosses **machines** très consommatrices d'**énergie**

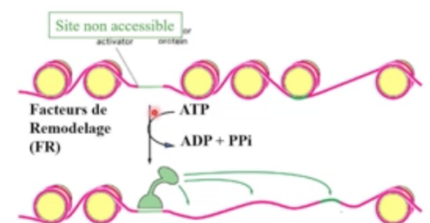
→ Rendent l'ADN **accessible** aux **FT** (qui ont besoin de place pour se fixer) et pour la **transcription**

→ Ils agissent sur la **structure** et la **mobilité** des nucléosomes en utilisant l'ATP. Ils sont capables de créer localement des zones **sans** nucléosomes (en les déplaçant grâce à leur domaine ATPase qui va hydrolyser l'ATP en ADP) pour permettre aux FT de se placer.

Ici on voit une séquence promotrice avec un site d'activation de la transcription qui est **coincé** entre les **nucléosomes** - donc **inactif**.

Et si les facteurs de **remodelage** agissent à cet endroit, ils créent une petite séquence d'ADN **nu** qui **facilite** la fixation du **FT** et l'activation de la **transcription**.

Au niveau des promoteurs, il faut souvent remodeler la fibre des nucléosomes pour permettre la fixation de protéines régulatrices



III. BOUCLES ET DOMAINES

3^{ème} niveau d'organisation de l'ADN : **Boucles et domaines**

NB : Niveau moins bien défini par rapport à la grande précision du nucléosome car c'est une structure plus complexe à étudier expérimentalement

A. NIVEAUX D'ACTIVITÉ DES GÈNES

Simplification : Un gène est soit **ON** soit **OFF**

À chacun de ces niveaux de structure de la chromatine correspond des niveaux de transcription des gènes correspondants.



Dans un même domaine, les gènes peuvent être co-régulés



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

N.B. : L'activité de la DNase est de couper l'ADN et son activité est augmentée lorsque l'ADN n'est pas associé au nucléosome

1) Cas du gène **OFF**

- Lié à une transcription **inactive** due à une **méthylation H3K9**
- Gène très **condensé**
- Cette région est **résistante** à la DNase1.



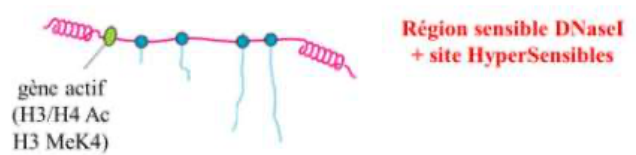
2) Cas du gène **compétant** (gène entre l'activation et l'inactivation)

- Chromatine ouverte mais non transcrite
- Principalement des **acétylations**
- Cette région est **sensible** à la DNase1. On change sa composition en nucléosomes : H3 et H4 acétylés.



3) Cas du gène **ON**

- Lié à une transcription **active**
- Présence d'une **acétylation** + une **méthylation H3K4**
- Cette région est **sensible** à la DNase1 et comporte des sites **hypersensibles** (HS) au niveau d'une gène transcrit



B. DOMAINES CO-RÉGULÉS

Les gènes sont **transcrits** de manière **indépendantes**, mais ils peuvent être **co-régulés** / **co-exprimés** ++

→ C'est ce que l'on appelle des **domaines de co-régulation** car ça se passe au sein d'un **même** domaine et donc les gènes ne sont **pas régulés** de manières **indépendantes**. Par exemple, les **insulateurs** protègent un certain nombre de gènes de l'**action** des enhancers et silencers.

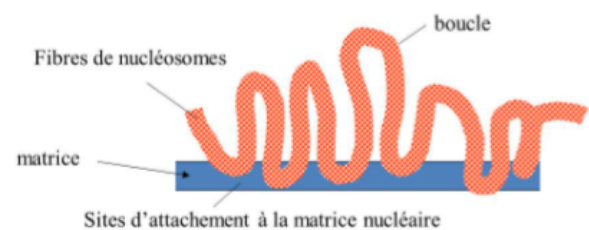
Cela veut dire qu'il doit y avoir un niveau d'organisation qui fait que ces domaines ont leur structure propre (découverte avec une expérience historique dans les années 80-90).

Il doit y avoir des structures au-delà du nucléosome pour condenser, alors les chercheurs ont essayé d'enlever les histones à partir de chromosomes métaphasiques.

DESCRIPTION SCHÉMA

→ En bleu : **Matrice nucléaire**

→ En orange : **Fibre nucléosomale**

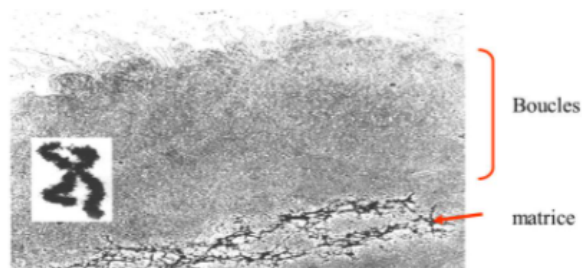


DESCRIPTION DE LA VUE EN ME

→ Chromosome métaphasique

→ Au centre, en foncé : Matrice, partie fibreuse

→ En gris, tout autour : Boucles d'ADN émanant de la matrice centrale



MODÈLES EN BOUCLE

C'est une **matrice** sur laquelle l'ADN (donc la fibre nucléosomale) va **s'accrocher** et former des **boucles**, en sachant qu'une boucle correspond à un **domaine**.

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

MATRICE NUCLÉAIRE

Formée de **différentes protéines** essentielles pour la régulation de l'expression des gènes, par exemple :

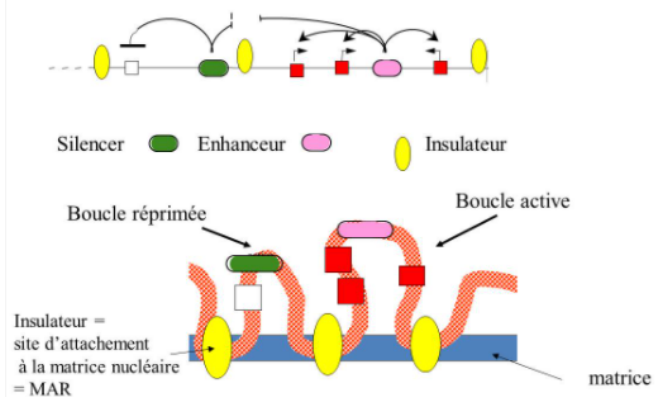
- Lamina nucléaire (filament intermédiaire)
- Protéines du nucléosquelette : actine, lamine A/C, NuMa
- Complexes nucléoprotéiques

Elle **isole** des domaines qui correspondent aux **boucles**. Chaque boucle correspond à des gènes

Sur la figure, on passe d'une régulation à 1 dimension à une régulation à 2 dimensions grâce aux boucles.

Les régions **insulatrices** (ovales jaunes) sont des éléments **frontières** qui séparent physiquement les boucles. C'est au niveau des insulateurs, qu'on retrouve les **attachements** de l'ADN à la matrice.

Ces insulateurs **protègent** les gènes des éléments **silencers** ou **enhancers** présents dans les boucles d'à côté. Il peut y avoir une boucle activée par un enhancer d'un côté et de l'autre une boucle réprimée par un silencer.



Les sites **d'accrochage** de la chromatine à la matrice correspondent donc à des **insulateurs** +

Les **domaines transcriptionnels** (gènes actifs ou réprimés) correspondent aux **boucles** limitées par les insulateurs +

Mini récap' : Nucléosome < Fibre Nucléosomale 1^{ère} niveau < FN 2^{ème} niveau < Boucles et domaines

IV. HÉTÉROCHROMATINE

A. DESCRIPTION DE L'HÉTÉROCHROMATINE

La chromatine est présente sous différents niveaux de condensation au sein du noyau. L'état du cycle cellulaire (comme la mitose ou l'expression des gènes) est un facteur jouant sur sa condensation.

Fiche d'identité de l'hétérochromatine

Définition : Forme **extrême** de chromatine hyper-condensée

Niveau de condensation en fonction du cycle : Régions très condensées de manière permanente, tout au long du cycle, mais condensation extrême en **début** de **mitose** pour permettre de ségréger le matériel génétique (mais certaines portions du chromosome sont déjà hyper-condensées et ne se condensent pas plus durant la mitose)

Activité des gènes : Très **peu** ou **pas** actifs (car plus c'est condensé, moins c'est accessible pour les éléments permettant la transcription...)

📍 Localisation de l'hétérochromatine : Essentiellement au niveau de l'enveloppe nucléaire, tapissant sa face, en contact direct avec la lamine des filaments intermédiaires

🔬 Microscopie : Facilement visible en **ME** dans les noyaux interphasiques
 En coloration DAPI : Très **dense**

→ Ce sont des zones importantes pour l'**organisation** globale du noyau.

B. OBSERVATION AU MICROSCOPE

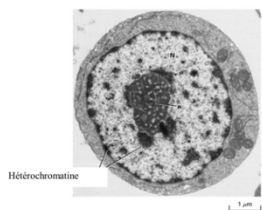
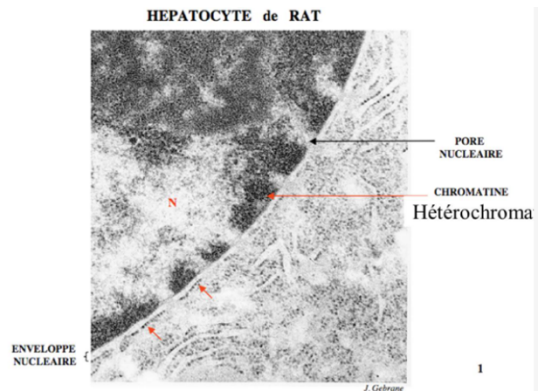
1) Image d'un hépatocyte de rat en ME

→ Cadran de noyau : Partie gauche un peu sombre avec des zones délimitées par une double membrane de l'enveloppe nucléaire

→ REG et ribosomes (certains libres, d'autres associés à la membrane externe de l'enveloppe nucléaire) : à droite avec les flèches qui montrent des ribosomes

→ Hétérochromatine : zones noires (= zones extrêmement denses aux électrons) à l'intérieur du noyau avec une coloration particulière

N.B. : Entre les domaines d'hétérochromatine, il existe des canaux qui correspondent à une interruption de la double membrane qui correspond aux pores nucléaires. Ces zones qui permettent l'échange dans les 2 sens entre le noyau et le cytoplasme.



2) Image en ME

→ Visualisation de l'ensemble des zones d'hétérochromatine sur l'ensemble d'un noyau. L'hétérochromatine est essentiellement liée à la membrane, et des zones d'hétérochromatine sont attachées au nucléole, au centre.

C. EFFET DE POSITION

Les **niveaux d'organisation** de l'hétérochromatine sont importants. Il n'est pour autant **pas** facile d'**organiser** ces niveaux supérieurs de condensation mais un processus génétique a beaucoup aidé les chercheurs à comprendre les facteurs qui interviennent dans cette hétérochromatine et sa fonction : c'est l'**effet de position**.

Effet de position : En génétique, c'est quand l'**activité d'un gène dépend** de son **contexte chromosomique** (permet d'étudier la chromatine hypercondensée, milieu du XXème siècle).



Exercice d'imagination (osef) :

Un gène, qui possède un contrôle proximal et distal se trouve à un endroit d'un chromosome. En fonction de ses éléments de régulations et dans un type cellulaire particulier, il va s'exprimer d'une certaine façon. Maintenant, si on prend ce même gène, avec ces éléments de régulations (ça peut donc correspondre à une grande partie du chromosome) et qu'on le place sur une autre portion du chromosome, il va s'exprimer différemment (dans la grande majorité des cas).

Il existe un autre niveau qui va déterminer l'expression des gènes, c'est le contexte chromosomique qui définit l'effet de position.

Il faut toujours penser à un **gène** dans une **localisation particulière** dans le noyau, pas seulement au gène tout court, parce que sa localisation va **influencer** son **expression**.

D. ÉTUDE D'UNE EXPÉRIENCE HISTORIQUE

Au cours de la première moitié du 20^{ème} siècle, (aucune interprétation moléculaire des phénomènes génétiques n'est pour le moment faite) un outil de choix était les mouches, notamment les drosophiles (vraiment trop bo ;)). Dans les années 30, la radioactivité était connue, et c'était une méthode de choix pour les généticiens qui obtenaient des mutants grâce aux irradiations (certains mutants ont des yeux variés).

++ Les généticiens de la drosophile ont l'habitude d'appeler les gènes comme le phénotype muté (ils aiment se compliquer la vie ouïoui) ++

GÈNE ÉTUDIÉ : Gène White

→ **Sauvage** = Normal : Code pour les yeux **rouges**

→ **Muté** : Code pour les yeux **blancs** (d'où son nom)

1) Quand tout va bien : Non muté, sauvage, normal

Phénotype : Yeux **rouges**

Explication : En situation normale, la drosophile présente une **protéine** qui détermine la couleur rouge.

Schéma explicatif : On retrouve le gène **White ON** puis **l'insulateur** puis **l'hétérochromatine**. L'insulateur qui se trouve entre les deux joue le rôle de **barrière** et empêche donc l'hétérochromatine de se **propager** et de **réprimer** l'expression des gènes

2) Mutation

Phénotype : Yeux **blancs**

Explication : Quand le gène qui code pour la couleur rouge n'est **pas présent**, les drosophiles ont les yeux blancs.

3) Variégation du gène White +

Phénotype : Entre les 2 avec des zones **blanches** et **rouges**

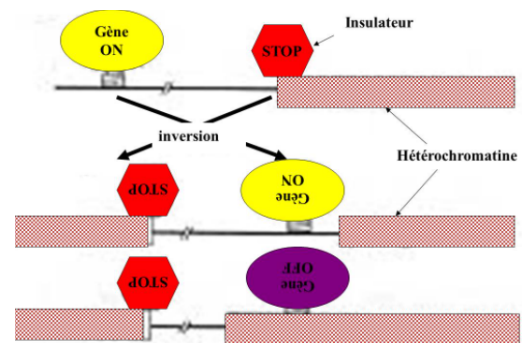
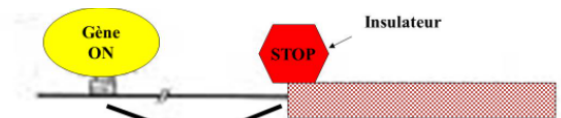
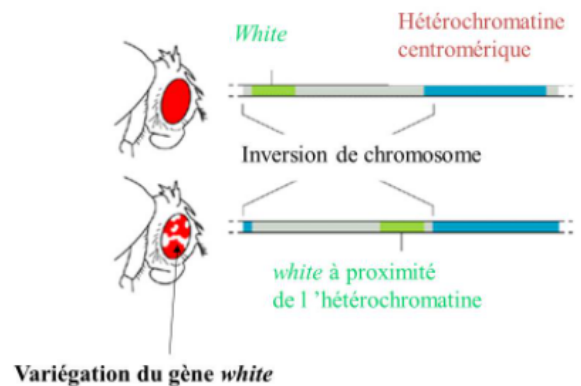
Explication : Le gène White est normalement localisé à **l'extrémité** du gène X de la drosophile (puisque quand c'est normal on a l'organisation suivante : gène White - insulateur - hétérochromatine). Dans ces mutants particuliers, grâce à des techniques de cartographies génétique, on sait que le gène White est toujours **présent**, qu'il n'est **pas** muté, mais il a changé de **contexte chromosomique**.

Le gène White subit une **inversion** sur le chromosome par radiation, ce qui change l'organisation car il se retrouve à **proximité** du **centromère** qui est une grande région **d'hétérochromatine** : insulateur (STOP) - gène White - hétérochromatine. L'insulateur ne s'interpose plus entre les 2 donc ne joue plus le rôle de barrière et l'hétérochromatine peut donc se propager et réprimer le gène.

→ Gène White toujours **ON** (yeux **rouges**) : **Pas** de propagation de l'hétérochromatine malgré la proximité entre les deux (décision prise au cours du développement dans certaines cellules)

→ Gène White **OFF** (yeux **blancs**) : **Propagation** de l'hétérochromatine qui **réprime** l'expression du gène White dans certaines cellules

L'effet **variégué** est lié à cette propagation **aléatoire**, c'est pourquoi certaines cellules sont blanches et d'autres rouges. Malgré des éléments de régulation, le gène White peut être réprimé à proximité d'une zone **d'hétérochromatine**.



Mais pas dans toutes les cellules, il est reprimé, alors que toutes les cellules possèdent l'inversion.
C'est une balance entre des cellules ON et des cellules OFF pour un gène qui est toujours localisé de la même façon.
C'est lié à l'effet de position aussi appelé **PEV** (Position Effect Variegation) +++

MUTATIONS SECONDAIRES

✎ SCHÉMA :

Le blanc sur le schéma correspond au **blanc** dans la réalité, et le noir au **rouge**
Condition initiale : On part d'un œil « variégué »



1) Gène suppresseur de variégation Su(var) +

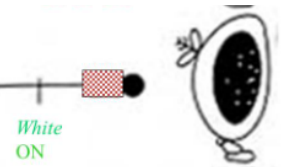
→ **Sauvage** :

- **Favorise** la variégation et encourage l'**hétérochromatine**
- Phénotype **muté** : Yeux **blancs**

→ **Muté** (porte le nom de sa mutation : suppression) :

- **Empêche** la variégation et encourage l'**euchromatine**
- Phénotype sauvage : Yeux **rouges**
- Mutation perte de fonction

Mutants suppresseurs = **Su(var)**
= suppressor of variegation



Les protéines Su(var) correspondent à des protéines de l'hétérochromatine = HP1, Su(var)3-9, des histones désacétylases.

2) Gène En(var) +

→ **Sauvage** :

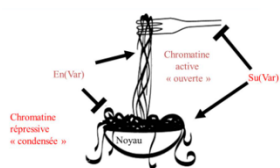
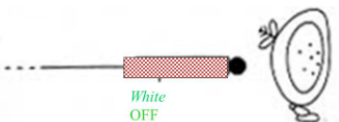
- **Empêche** la variégation et encourage l'**euchromatine**
- Phénotype **sauvage** : Yeux **rouges**

→ **Muté** :

- **Favorise** (augmente) la variégation et encourage l'**hétérochromatine**
- Phénotype muté : Yeux **blancs**

Les protéines En(var) sont des protéines de l'euchromatine, actives pour la transcription = FT, HAT, histones acétyltransférases

Mutants de renforcement = **En(var)**
= enhancer of variegation



Imaginez (là aussi ossez) que votre noyau soit un plat de spaghettis, c'est un peu compliqué à manger comme ça, il vous faut une fourchette (honte à ceux qui coupent leur spaghettis !!) pour démêler ce plat de spaghettis, c'est ce que font les gènes En(var) (car ils donnent de l'euchromatine) tandis que les gènes Su(var) vont contribuer rendre les spaghettis compactes et indigestes (favorisent l'hétérochromatine).

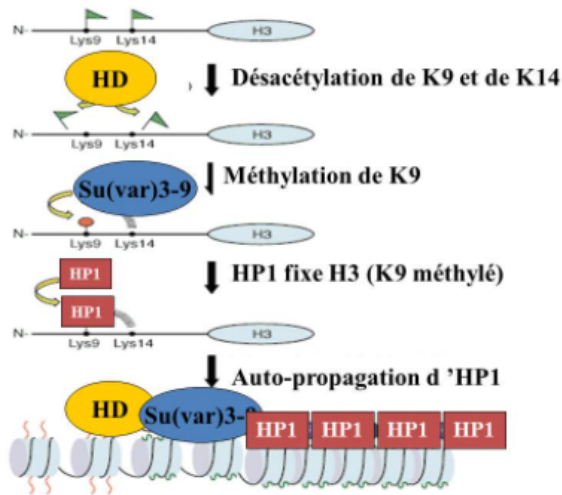
E. RÉPARTITION ENTRE LES 2 DOMAINES

✎ DESCRIPTION SCHÉMA :

→ En bas : Portion de chromatine avec des fibres nucléosomales et des nucléosomes

→ Partie droite et en bas : Hypercondensée associée à HP1

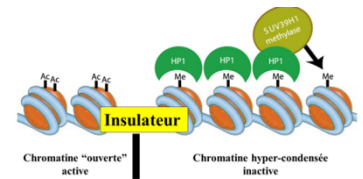
→ Partie gauche et en bas : Moins condensée, plus ouverte donc plus susceptible d'avoir des gènes transcrits



Au niveau de l'histone H3, on retrouve une suite de réactions :

- 1) **Désacétylations** de K9 et K14
- 2) **Méthylation** de K9 de H3 par la protéine **Su(var) 3-9**
- 3) Une fois méthylée, la lysine H3 sert de site de fixation pour les protéines à chromodomaine dans la protéine **HP1**. En effet, HP1 attire d'autres protéines **Su(var) 3-9**
- 4) **Auto-propagation** de **HP1** (et des autres protéines) en bas de droite à gauche par l'action combinée de l'**histone désacétylase** et de **Su(var) 3-9** → Propagation de l'hétérochromatine

Dans la vraie vie, d'un côté, on retrouve de la chromatine « ouverte » et les insulateurs qui l'isolent de la chromatine hyper-condensée.



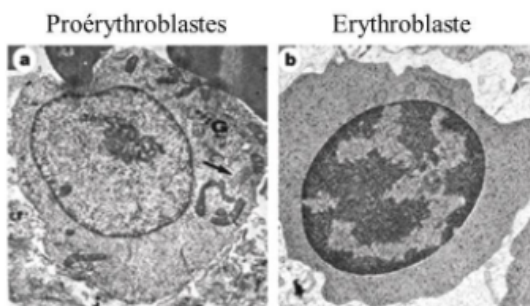
☀ RAPPEL APPRONFONDI :

Les 3 niveaux d'expression des gènes **ON**, **OFF** et **compétent** peuvent être décrits par l'organisation à la fois en termes de code **génétique** et de **tridimensionnel** de ces régions mais également de la **sensibilité** à la **nucléase**. Leurs caractéristiques sont les suivantes :

- Gène **transcrit**, **ON** / zones **actives** : H3 acétylé, K4 méthylé, c'est la fibre de **11nm**
- Gène **inactif**, **OFF** / zone **résistantes** à la DNase1 : K9 triméthylé qui est **hypercondensé**
- Gène **compétent**, **ouvert** mais **non transcrit** / zones compétentes : fibre de **30 nm**, haut niveau d'**acétylation** (sur les histones) avec des **sensibilités différentielles** à la DNase1 - pas encore transcrit

Donc on a superposé les différents niveaux d'organisation de la chromatine avec les différents niveaux de compétence et d'activation transcriptionnelle des gènes correspondants.

F. NIVEAU DE COMPACTION AU COURS DE LA DIFFÉRENCIATION



Au cours de la différenciation, ces profils chromatinien de condensation vont se modifier.

Le noyau en ME du proérythroblaste (stade précoce de différenciation) est essentiellement ouvert.

Le noyau en ME de l'érythroblaste (stade de différenciation plus avancé) est largement condensé.

Dans les cellules multipotentes, on a 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**.

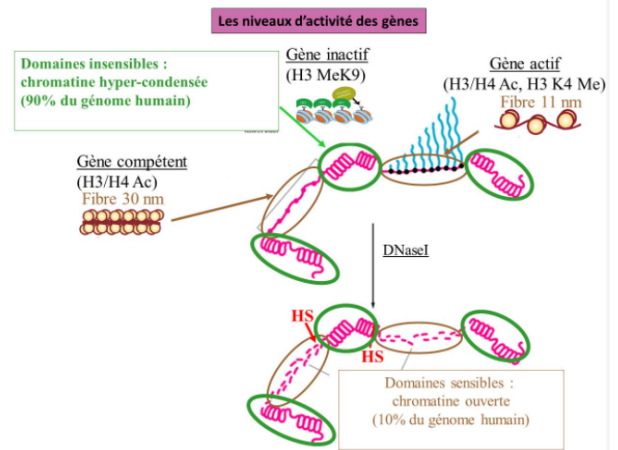
Tandis qu'au fur et à mesure de la condensation, la cellule va **restreindre** ses possibilités de différenciation et être de plus en plus dans un état **non permissif** sauf pour les gènes importants de la fonction **cellulaire** donnée.

Il va y avoir une **condensation progressive** de la chromatine et une **ouverture** sélective, lors de l'engagement et de la **différenciation**.

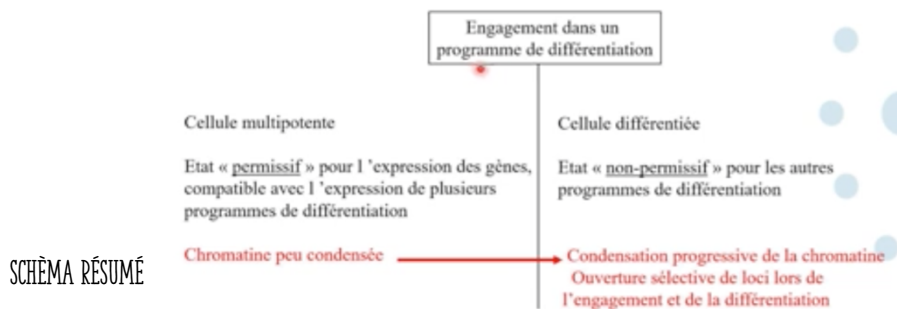
Une cellule différenciée (manière terminale) dans le corps humain a :

- approximativement **90%** de sa chromatine **hypercondensée**
- **10%** de gènes **libres** de s'exprimer

On rend silencieux tous les gènes qui ne servent à rien pour un type de cellules.



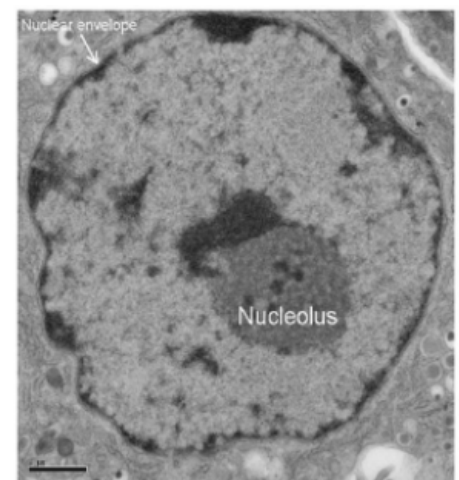
Condensation de la chromatine et différenciation



V. CORPS NUCLÉAIRES ET TERRITOIRES CHROMOSOMIQUES

A. CORPS NUCLÉAIRES

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



- Nucléole
- Espace inter-chromatinien
- Corps de Cajal

Est-ce que la localisation d'un gène dans le noyau va avoir un impact sur son activation ?

Le **noyau** (et le nucléoplasme) est **très bien structuré** ++ mais l'étude a été complexe parce que ce n'est pas entouré de membranes.

FICHE D'IDENTITÉ DU NUCLÉOLE

Définition : Structure / domaine **nucléaire** proéminente et **dynamique**, qui rentre dans la catégorie des **organites** malgré son **manque** de membrane

Observation : Facilement **visible** en microscopie conventionnelle ou à contraste de phase (d'où son appellation d'organe)

Localisation : à l'intérieur du noyau

Rôle : Centre de **synthèse** des **ribosomes**

L'activité du nucléole reflète un **équilibre** entre le niveau de **synthèse** des ARNs ribosomiques directement liée à la **croissance** et prolifération cellulaire. Ensuite la petite et la grande sous-unité du ribosome seront ensuite exportées vers le cytosol.

HÉTÉROCHROMATINE

Localisation : Tapisse la partie périphérique du noyau

CORPS NUCLÉAIRES

→ Corps PML

→ Granules inter-chromatiniens : zones de **stockage** de **facteurs d'épissage** (les splicéosomes)

→ Corps de Cajal : permettent l'**assemblage des splicéosomes** et l'**activation d'enzymes** utilisant l'ARN (comme la télomérase)

Les gènes actifs sont localisés à proximité des granules inter-chromatiniens, à la surface des zones plus condensées avec les gènes compétents.

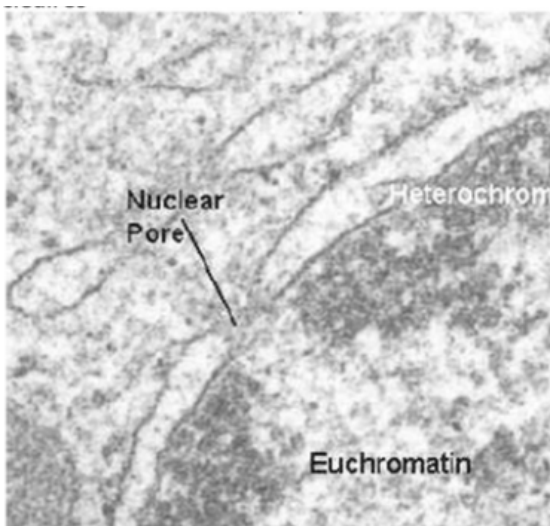
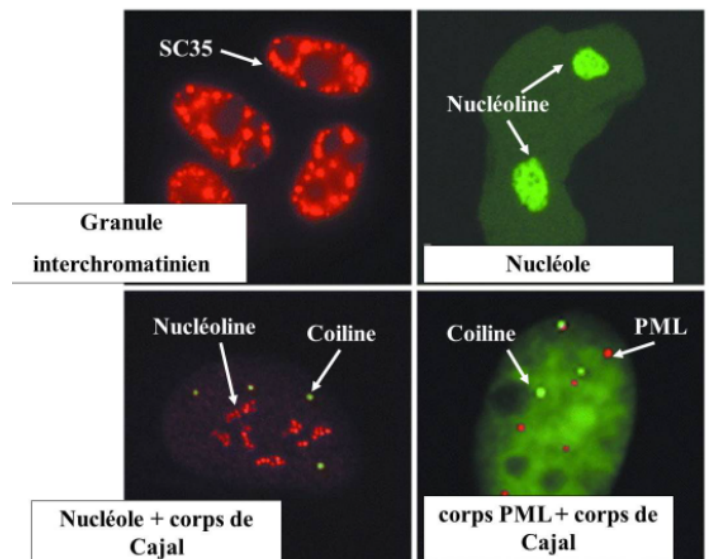
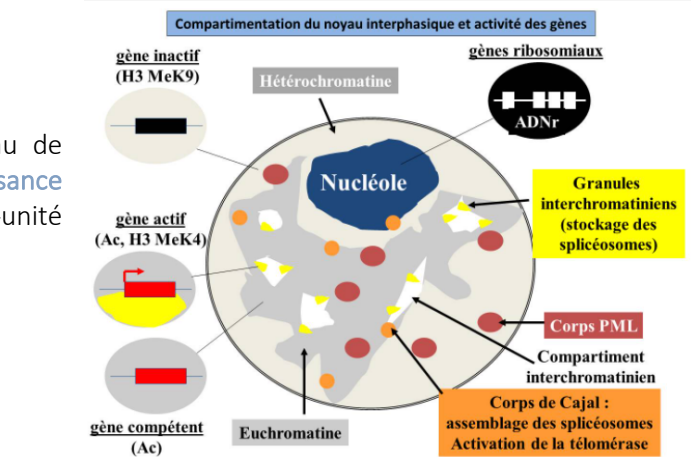
EN MICROSCOPIE

→ Granules inter-chromatiniens marqués par la protéine riche en sérine et en arginine : SC35

→ Nucléole caractérisé en immunofluorescence grâce à la nucléoline

→ Corps de Cajal et nucléoles covisualisés en fonction d'anticorps

→ Corps de Cajal visualisés avec la Coiline et les corps PML visualisés avec la protéine PML



B. LOCALISATION DES GÈNES INACTIFS

→ La plupart des gènes **inactifs** sont localisés dans l'**hétérochromatine** et plutôt en **périphérie** du noyau +

⚠ L'hétérochromatine se localise en **périphérie** du **noyau** mais au **centre** des **territoires chromosomiques** +++

En ME, on retrouve : la double enveloppe nucléaire, le pore nucléaire, l'euchromatine, l'hétérochromatine

Les expériences chez la drosophile ont permis de déterminer que la position d'un gène dans le noyau, indépendamment de son contexte, est essentielle pour son expression +



ÉTUDES D'UN MUTANT PARTICULIER D'EFFET DE POSITION DU GÈNE BROWN, COULEUR DE LA DROSOPHILE

Gène sauvage : Gène **brown** (couleur)

1^{ère} partie de l'expérience : On a soumis le gène **brown** à un effet de position

Conséquence : Effet de **variéguation** qui prédomine avec une **insertion** d'environ **100Mb** d'hétérochromatine qui provient du **centromère**, qui du fait des radiations a été inséré en plein milieu du gène **brown**

→ Formation du mutant **brownD** (sur un des deux chromosomes)

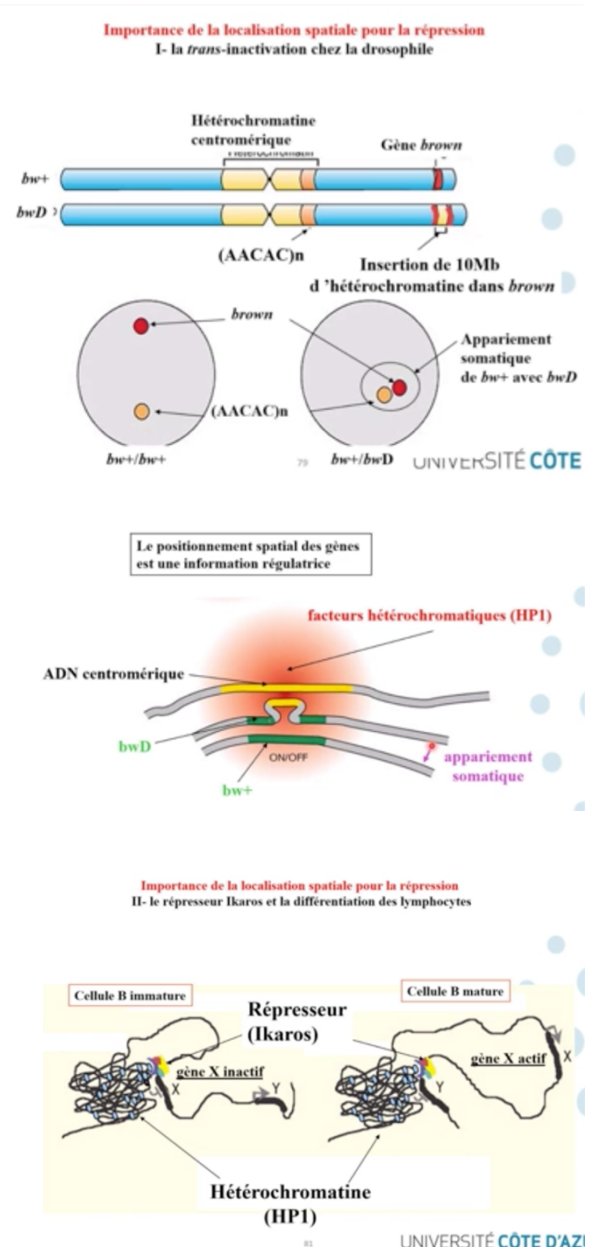
→ Le gène **brown +**, allèle sauvage, (sur l'autre chromosome) est sauvage mais le **phénotype** est **muté**

Les chercheurs ont effectué des **marquages** de cellules de drosophile et avec la **mutation dominante**. Ils ont fait un marqueur qui correspond à une séquence **centromérique** et le gène **brown**.

Localisation dans une cellule normale : les 2 gènes **brown+** sont localisés à **distance** du centromère

Localisation dans le mutant brownD : le gène normal et celui muté se trouvent **associés** à de l'**hétérochromatine** car c'est dû à l'**appariement somatique** des deux X homologues.

Le gène normal va être entraîné par l'**insertion de ces 10Mb** sur l'autre allèle vers l'hétérochromatine, donc ça veut dire que même le gène normal ne s'exprime **pas** parce que sa **localisation nucléaire** est **modifiée** du fait de son allèle.



Donc le positionnement spatial d'un gène est une information de régulation +++

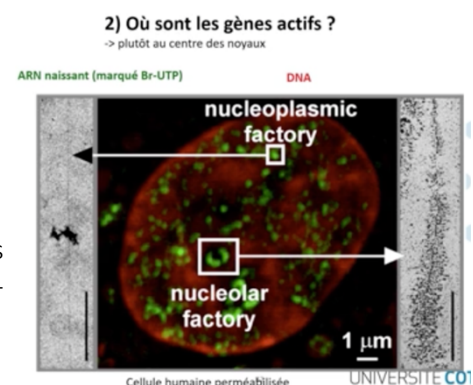
Ce concept de la drosophile est généralisable. Par exemple, des facteurs qui interviennent dans la différenciation des lymphocytes chez la souris (les facteurs de la famille Ikaros), au cours de la maturation, ces gènes vont entraîner les gènes inactifs vers l'hétérochromatine pour stabiliser cet état de différenciation et de programme transcriptionnel.

C. LOCALISATION DES GÈNES ACTIFS

→ Les zones de transcriptions **actives** du génome et donc les gènes actifs se trouvent à l'**intérieur** du noyau + et ils sont en périphérie des territoires chromosomiques

Pour visualiser en microscopie les gènes actifs, des marquages utilisent des **précurseurs de la transcription** comme le ribonucléotide UTP marqué : Br-UTP.

Les gènes actifs sont visualisés en vert.



D. TERRITOIRES CHROMOSOMIQUES

Les territoires chromosomiques sont un niveau **supérieur** d'organisation des chromosomes. Ils sont mis en évidence par immunolocalisation, **FISH**, dans le noyau des K. Cette technique permet grâce à des sondes et des colorations de **repérer** chaque chromosome : **chromosome painting**.

On peut les visualiser en métaphase et en interphase les chromosomes ne se mélangent pas beaucoup et définissent des territoires chromosomiques (TC).

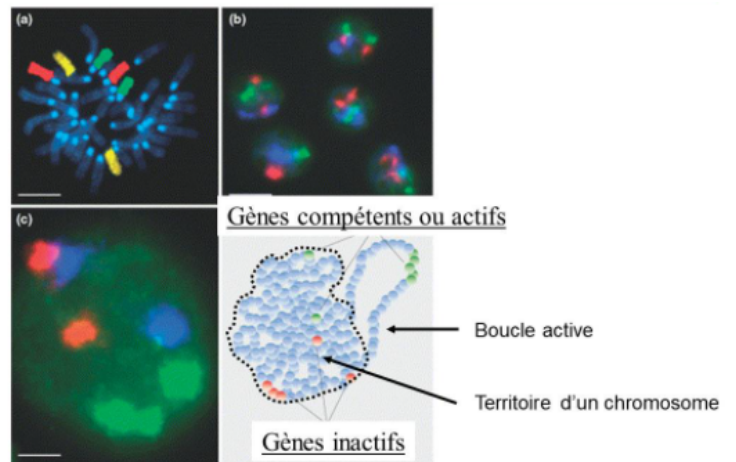
Chaque **chromosome** occupe un **espace défini** même en **interphase ++**

On est dans une cellule diploïde, les tâches sont en double (chaque tâche correspond à un chromosome)

En termes d'**organisation** fonctionnelle :

→ Gènes **inactifs** plutôt à l'**intérieur des TC**, du territoire du K en question

→ Gène **actif** de ce TC va **sortir** et se retrouver à l'extérieur du TC pour pouvoir être **transcrit** activement, c'est un processus **dynamique** : boucle active. Le gène **revient** à l'**intérieur** du territoire quand il est réprimé



TELEMENT DE PLACES POUR LES DÉDIS (COMME SUR LA PRÉCÉDENTE)

WOOOOW, déjà que j'attendais avec impatience la fin de la première version de la fiche alors vous ne pouvez même pas vous imaginer ;) Comme je vous l'ai dit, c'est un cours un peu plus long (pas qu'un peu, je sais...) que les autres, avec beaucoup de notions mais comme pour les autres, il ne faut pas avoir le moindre détails et qu'on vous avait pu voir, Gigi a fait quelques modifications sur ce cours :)

Dédi aux dédis que je vais réutiliser oupsi 🙄

Dédi à toutes les personnes qui utiliseront ma fiche parce que c'est grâce à vous que toutes ces heures passées (x2) devant mon ordinateur n'ont pas servi à rien en espérant qu'elle vous aide ❤️

Dédi particulière à Anax, merci encore :)

Dédi à toutes les personnes qui ont un taux de concentration aussi nul que le mien, et vous pouvez constater que même ça ne m'a pas empêché de passer en deuxième année. Donc ce qui est important de retenir, c'est que tout défaut est surmontable, si vous gardez votre motivation, si vous faites des sacrifices (RIP les séries que je n'ai pas pu regarder en P1), si vous avez des coups de mou (totalement normal), si vous conservez un nombre de sommeil convenable (super important, pas de 5h de sommeil votre cerveau ne peut pas bien travailler ensuite... au moins 7h30), si vous vous accrochez à votre rêve, on se reverra vite en P2 :)

Dédi à la Dynastie Biocell car c'est la meilleure des dynasties 🍀

Dédi à Gigi of course, car sans lui, on n'aurait pas ces merveilleux cours 🙄

Dédi au Tutorat Niçois et à l'ensemble des tuteurs (quelle que soit l'année) :)