

ORGANISATION DU NOYAU

*Sans lui, on serait comme des moules
sans leur coquille ...*



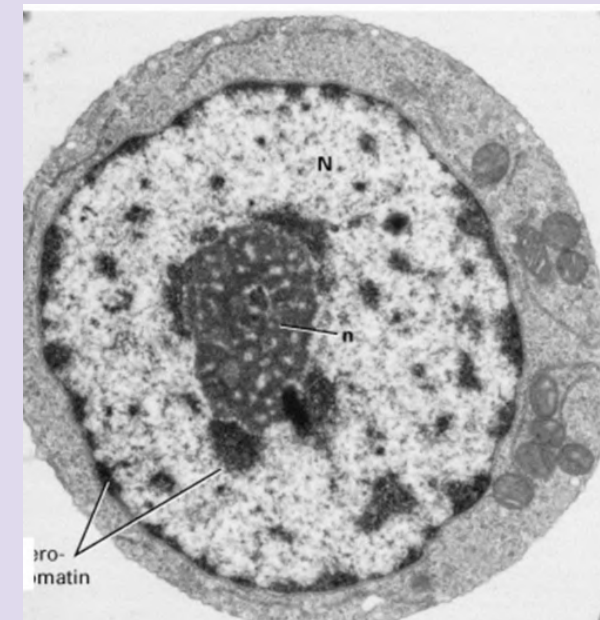
Introduction

L'ADN fait à peu près 2m dans un noyau qui fait quelques microns – on est obligés de le condenser plusieurs milliers de fois pour le faire rentrer dans le noyau. Il y a plusieurs niveaux de compaction qui s'effectueront en différentes étapes.

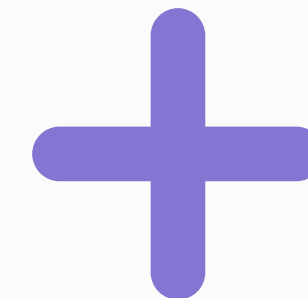
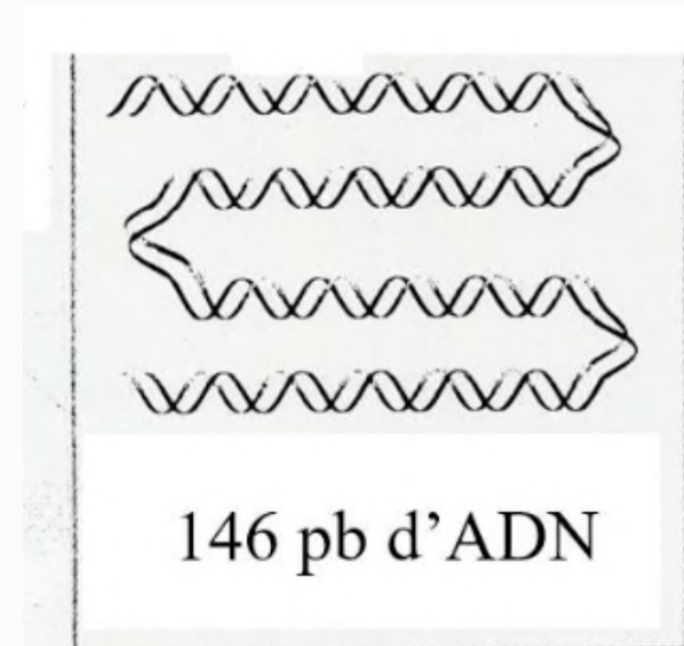
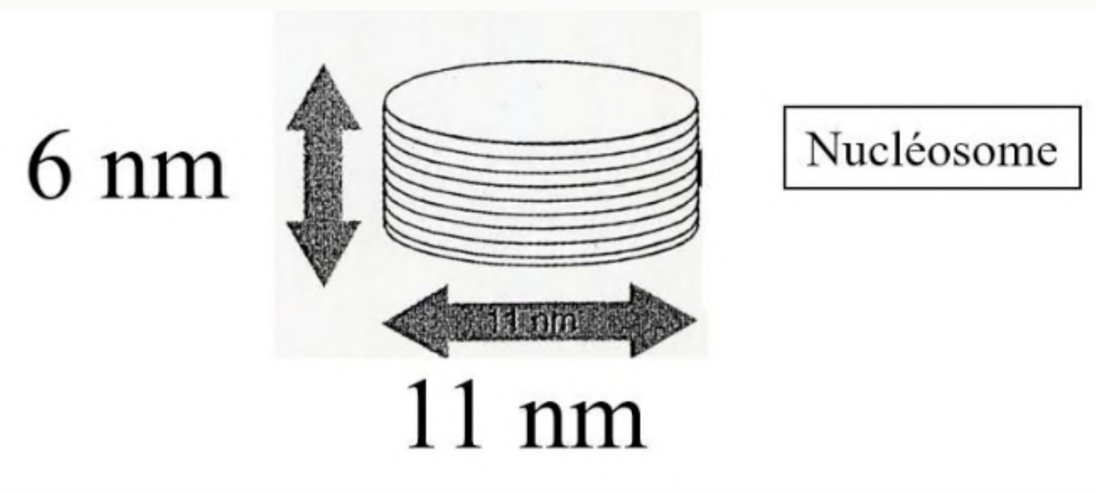
Le nucléosome



L'hétérochromatine



Caractéristiques du nucléosome

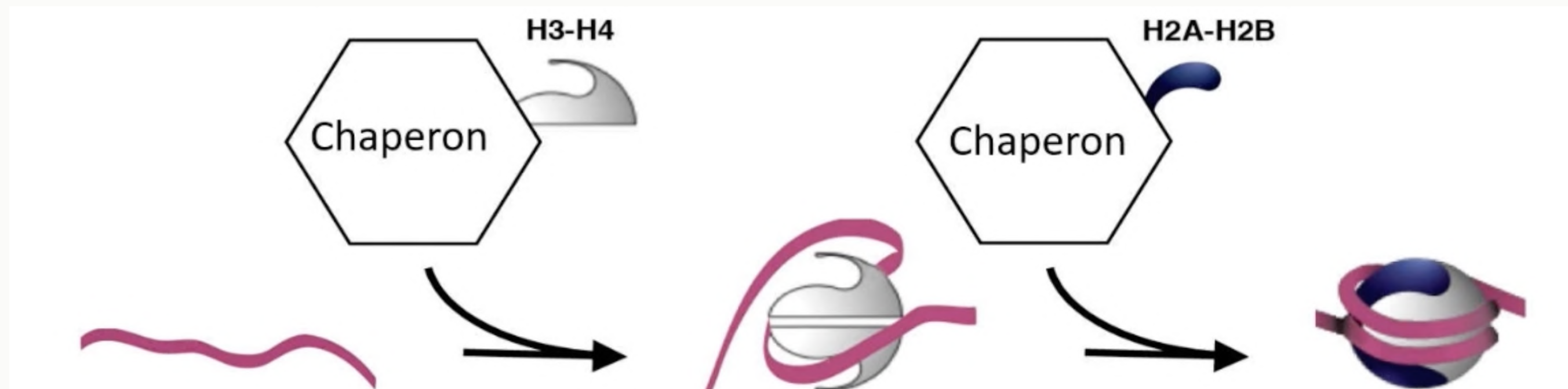


	H2A x 2 = 28 kD
	H2B x 2 = 28 kD
	H3 x 2 = 30 kD
	H4 x 2 = 22 kD
Octamère d'histones = 108 kDa	

⚠ L'Histone H1 ne fait pas partie de l'octamère d'histone du nucléosome 🧣🧣🧣

La formation du nucléosome

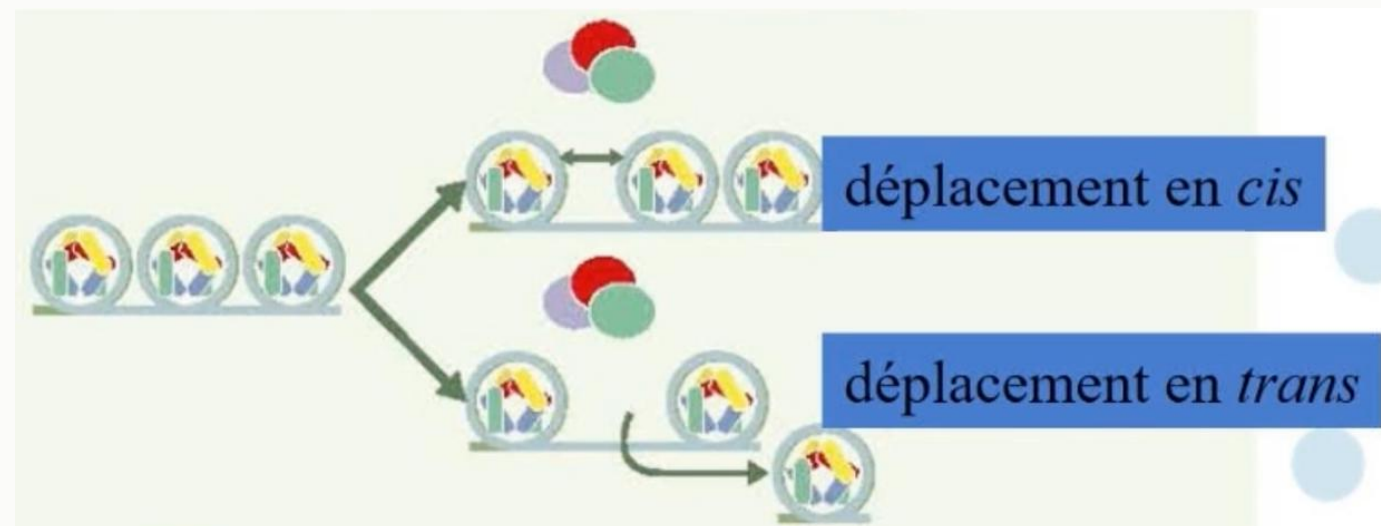
- L'assemblage des nucléosomes est **stimulé** par des protéines "chaperon" qui interagissent avec des dimères d'histone dans un ordre bien précis : H3/H4 PUIS H2A/H2B



⚠ Les nucléosomes et la fibre de chromatine défavorisent la transcription (comme il constitue un niveau de compaction/condensation de l'ADN + 🧣 +)

Diversification des nucléosomes

- Les nucléosomes ne sont pas tous identiques ! 🧬 + 🧬 . En effet, la cellule doit pouvoir modifier/moduler ces nucléosomes en fonction de ses besoins (expression ou répression des gènes).



Acétylation, phosphorylation,
ADP-ribosylation, méthylation,
ubiquitinylation

- **Complexe de Remodelage**

On change la position du nucléosome, **CIS** = sur la même molécule d'ADN et **TRANS** = vers une autre molécule d'ADN

- **Variants d'Histones**

Variant de **H2A** (H2A-X/Z, MacroH2A)
Variant de **H2B** (H3.1/3, CenpA)
PAS DE VARIANT DE H4 +++
(codé par 1 seul gène)

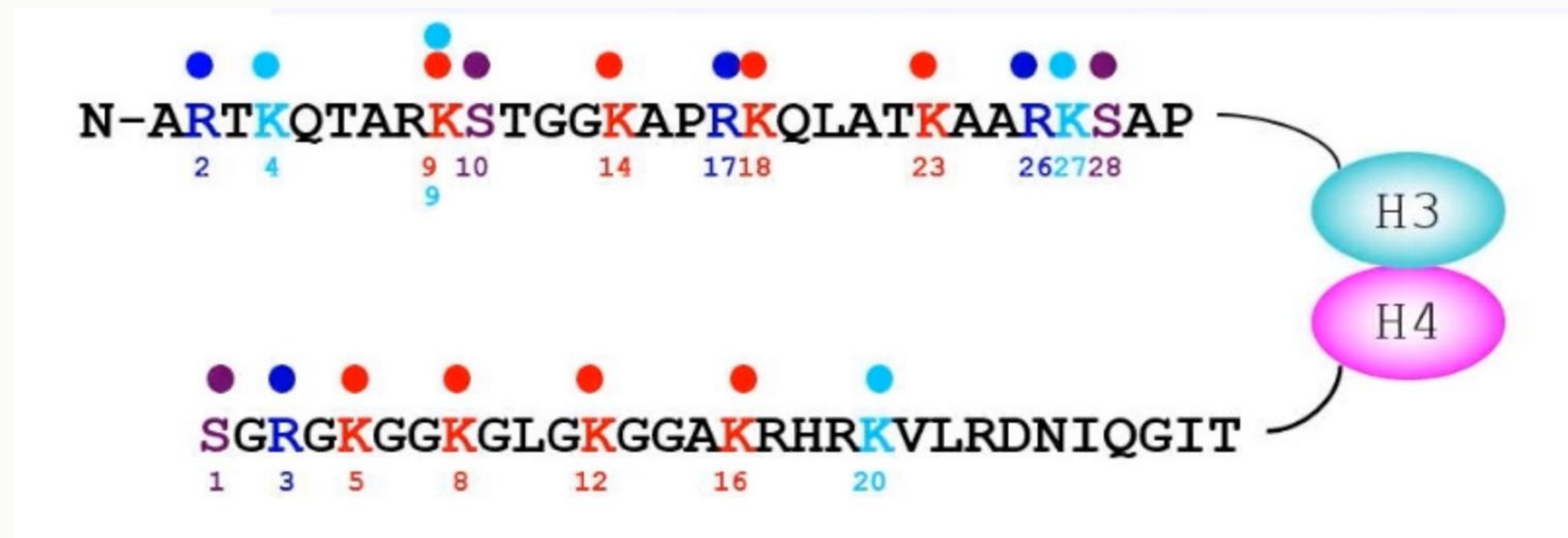
- **Modifications post-traductionnelles**

Au niveau de la **Queue N-term des histones** et assurées par des enzymes spécialisés 🧬

- **Acétylation** : HAT et HDAC
- **Méthylation** : HMT et HDM

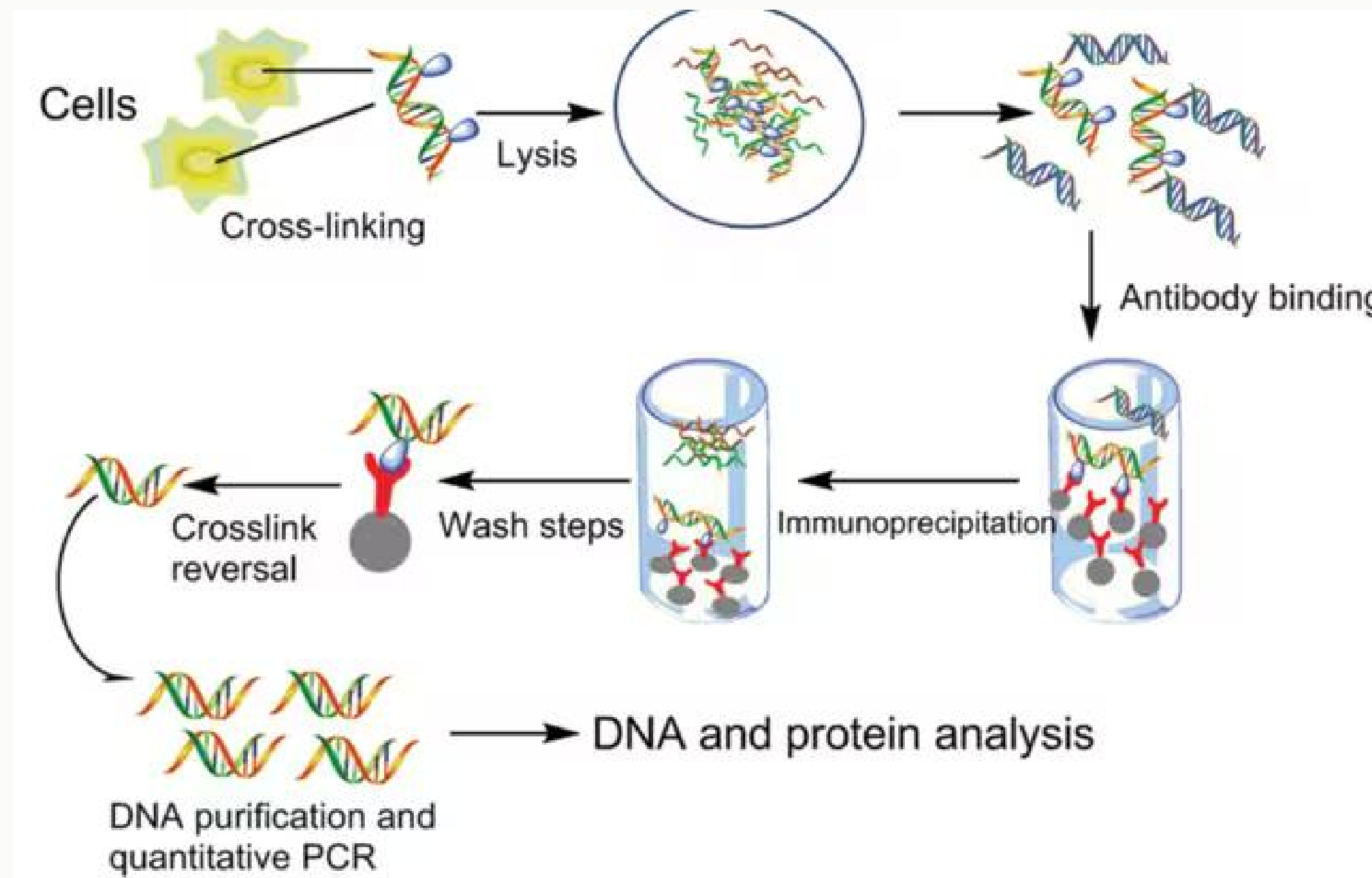
Le code histone

- La diversité des modifications post traductionnelles et l'existence de variant des histones constituent un code particulier : le code histone caractéristiques des EUcaryotes . Il se superpose au code génétique et participe à la détermination de l'expression de l'information génétique (Gène ON/OFF)



L'immunoprécipitation de chromatine = l'IP

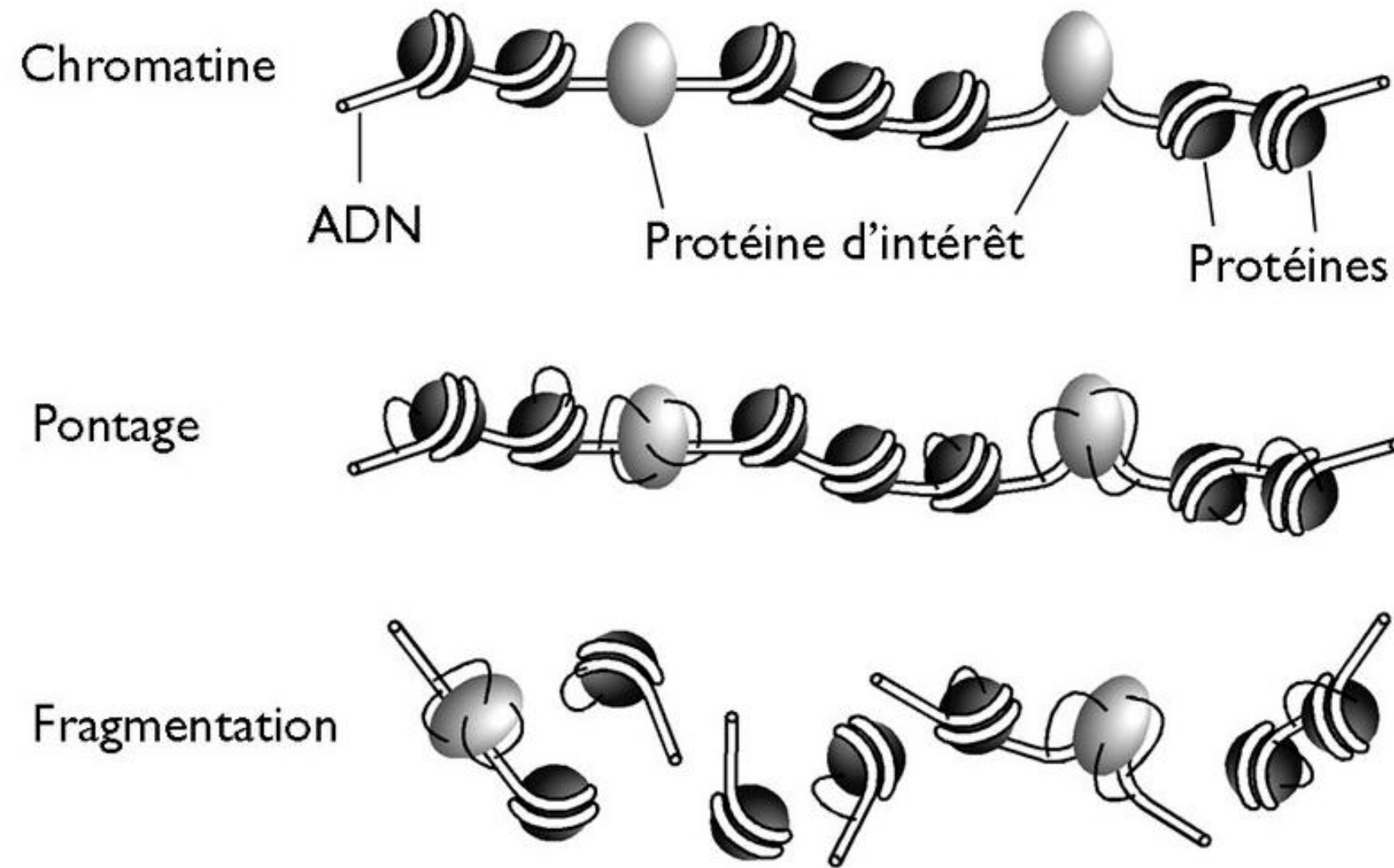
Objectif: Étudier le **code histone de la chromatine** et donc les **modifications de la queue N-terminale des histones** + 🧬. Il faut avoir des **agents spécifiques** pour le lire expérimentalement = **des Anticorps**



Les étapes de l'IP

- 1** Pontage des protéines avec l'ADN avec formaldehyde = "cross-linking"
- 2** Fragmentation des cellules et de la chromatine par ultrasons + Purification de la chromatine
- 3** Incubation des fragments de chromatine en présence d'anticorps
-> IMMUNOPRECIPITATION +++
- 4** Purification des complexes immuns par des lavages
- 5** Reversion du pontage (et donc des liens entre l'ADN et protéine) + Purification de l'ADN
- 6** Quantification des molécules d'ADN immunoprécipitées par PCR

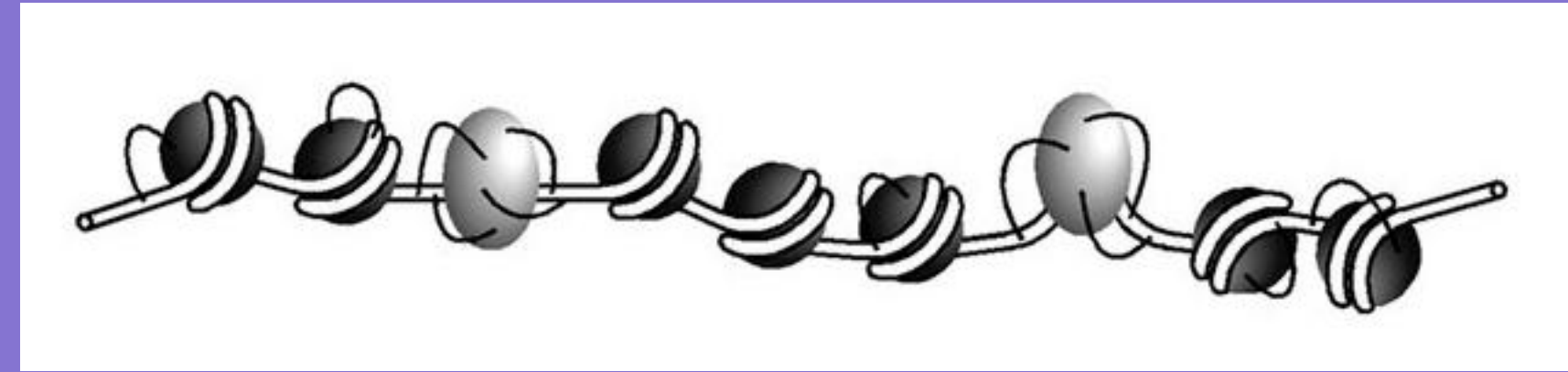
Pontage ADN-Protéines



On **fige** la cellule dans un état par pontage/cross-linking (entre ADN et protéines) grâce au **formaldéhyde**

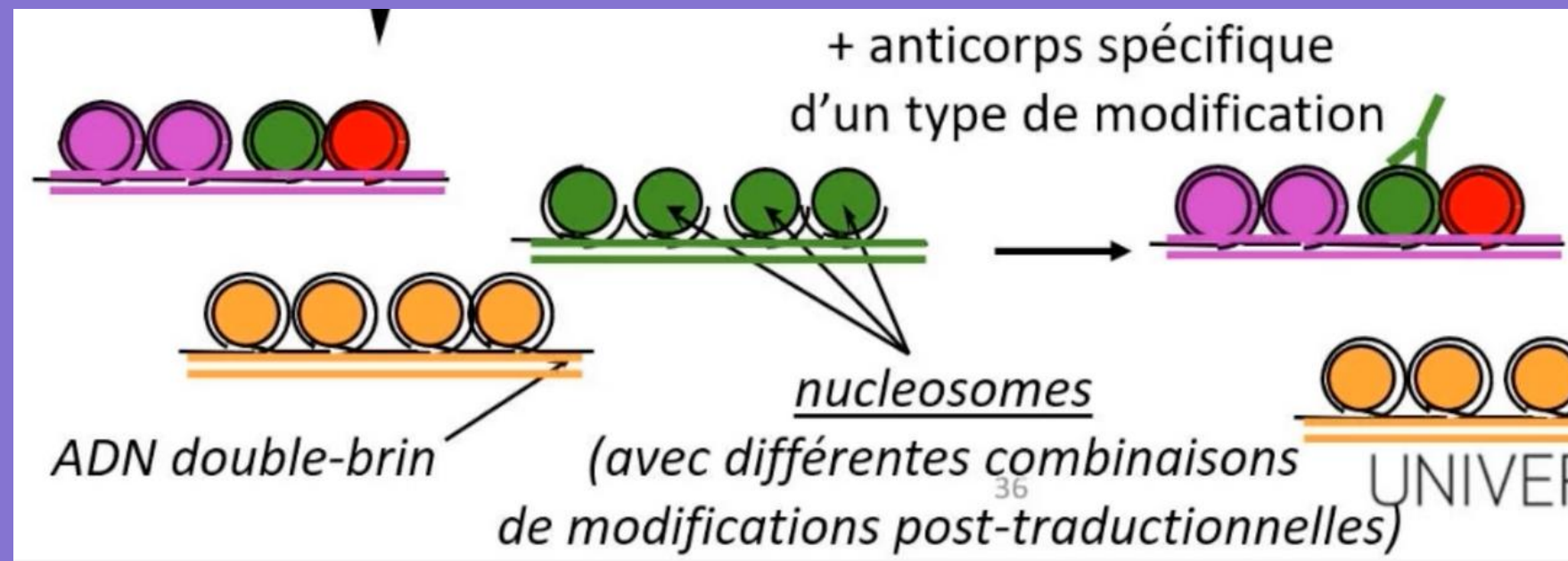
Fragmentation + Purification de la chromatine

Les cellules et leurs noyau sont **lysés** puis la **chromatine** est **fragmentée** via **ultrasons**. La chromatine isolée est ensuite **purifiée**.



Immunoprécipitation

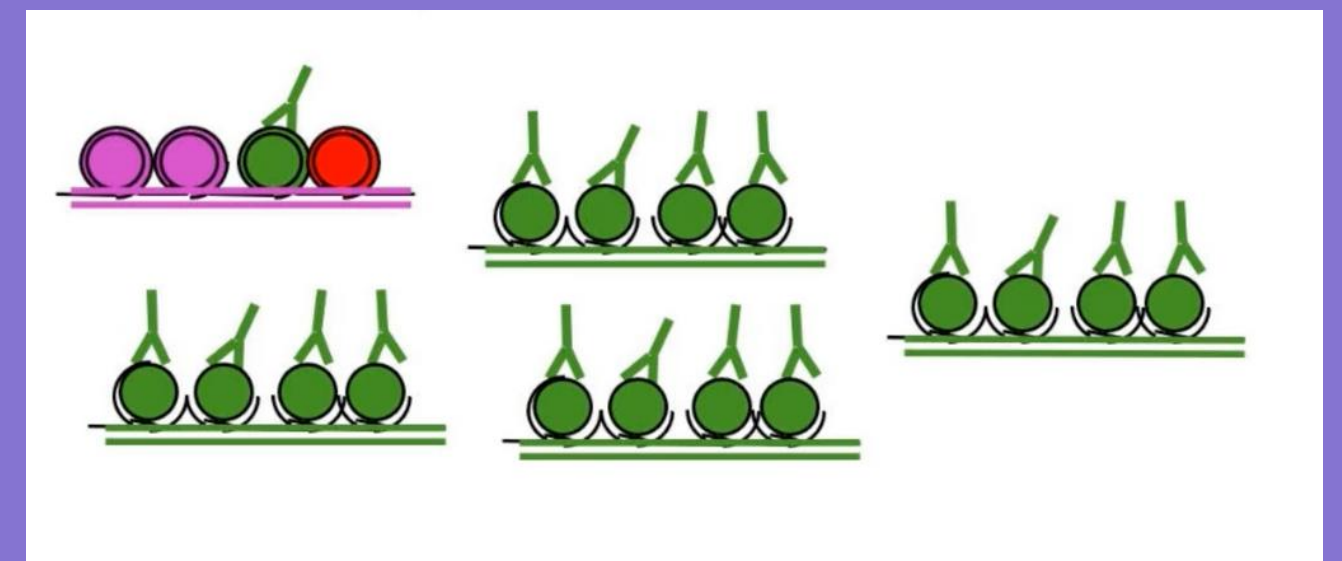
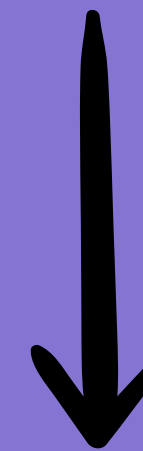
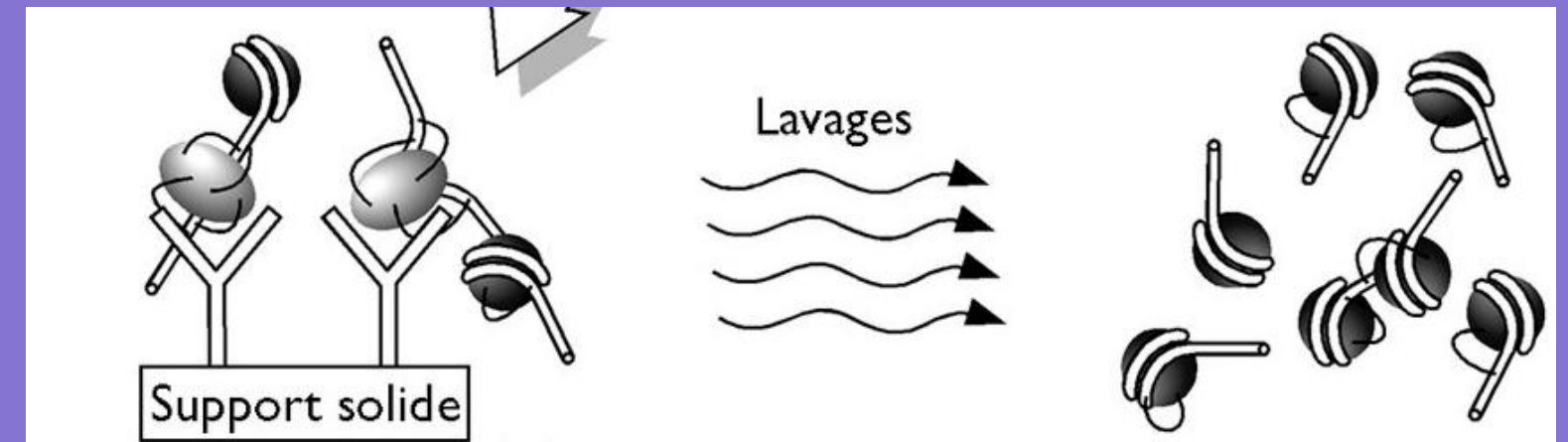
On incube les fragments de chromatine avec des **Anticorps (AC)** **spécifiques** d'un **type de modification post- traductionnelle des histones +++**. C'est l'étape d'immunoprécipitation ++



Purification des complexes immuns

On **enrichit (augmente)** ensuite les fragments de chromatine contenant cette modification (ici **verte**) reconnues par nos **AC spécifique** par **purification du complexe immun**, consistant à des **lavages**.

⚠ On ne visualise cependant toujours pas ces fragments de chromatine et leur proportion par rapport au reste de la chromatine



Reversion du pontage + Purification de l'ADN

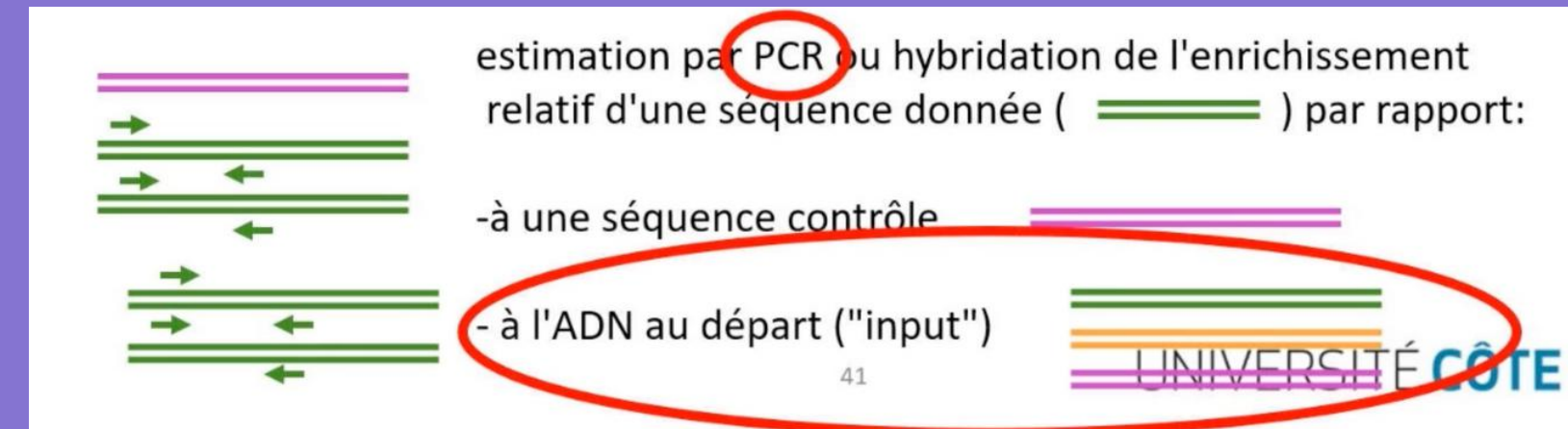


On va donc **renverser le pontage**,
c'est à dire rompre les liaisons
covalentes entre ADN et protéines
(sinon les fragments ne seront pas
analysable) et **purifier simplement**
la partie ADN

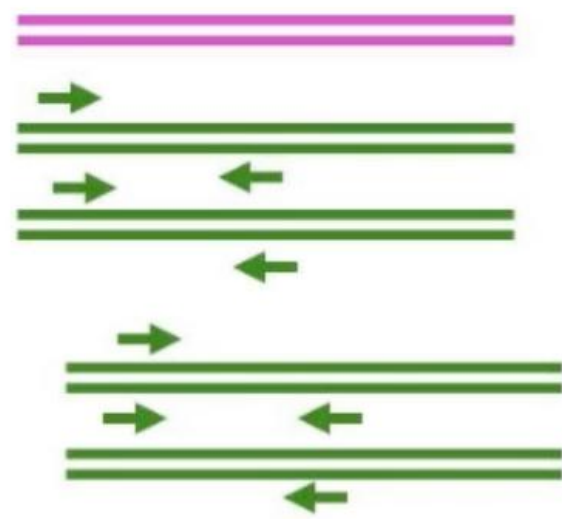
Quantification par PCR

On amplifie une séquence d'**intérêt** d'ADN (ex: Promoteur d'un gène en utilisant des amorces spécifiques) et on fait pareil avec une séquence **contrôle** et pour l'ADN de départ avant immunoprécipitation = l'**Input**

Cette PCR peut être rendue **quantitative**, pour être comparée à la PCR et à l'amplification de fragments verts MAIS présents dans **l'ensemble des fragments de chromatine du départ**.



Immunoprécipitat



PCR



$$R_{ip} = \frac{Q \text{ fragment PCR}}{Q \text{ ADN réaction}}$$

Input



PCR



$$R_c = \frac{Q \text{ fragment PCR}}{Q \text{ ADN réaction}}$$

$$R_{ip} \gg R_c$$

On a **deux réactions** à étudier :

- L'**Immunoprécipitat** (= la Solution Test **fixées par les AC spécifiques**)

- l'**Input** (= **La situation de départ, avant IP**)

On a par **PCR**, l'estimation de la quantité de ces fragments de l'**immunoprécipitat** par rapport à la **quantité de l'ADN de la réaction**, par un **premier facteur = R_{ip}** . Et un 2e facteur qui est le **facteur contrôle** pour l'**input = R_c**

Si $R_{ip} \gg R_c$ -> Enrichissement de l'immunoprécipitat (ici fragment vert) et donc de la modification post traductionnelle dans les séquences d'ADN d'intérêt

On définit alors un Facteur d'Enrichissement :

$$F = \text{Facteur d'enrichissement} = \frac{R_{ip}}{R_c}$$

Expression Génique

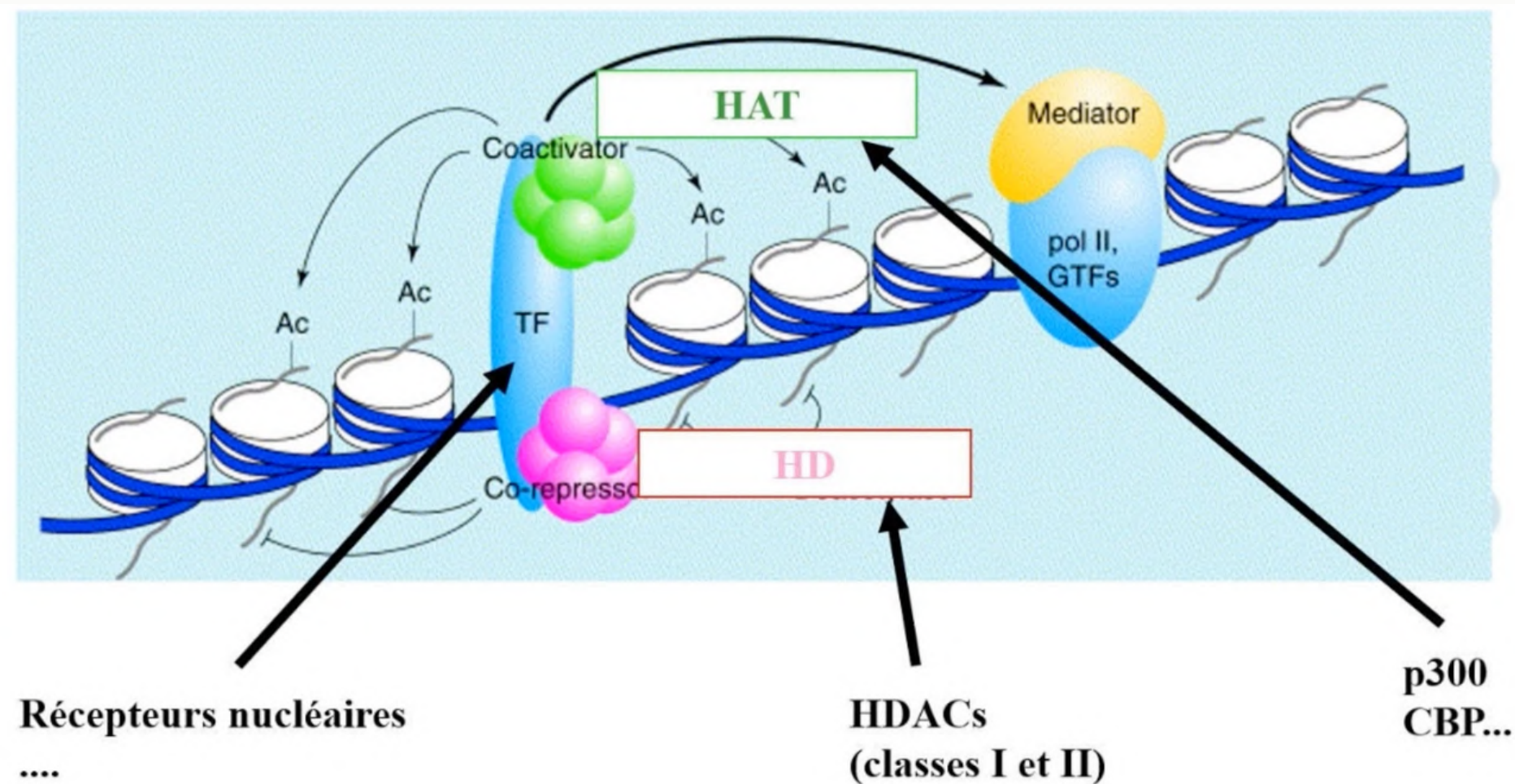
- Les modifications post-traductionnelles des histones régulent l'expression des gènes +++ (niveau de transcription) et les interactions entre les nucléosomes et certaines catégories de protéines 🧣 :

Transcription <u>active</u>	Transcription <u>inactive</u>
Chromatine hyper acétylée	Chromatine hypo acétylée
Chromatine méthylée en K4 (Lysine 4/Histone H3)	Chromatine méthylée en K9 (Lysine 9/Histone H3)

⚠ La méthylation ne conduit pas toujours à l'inactivation d'un gène, cela dépend de l'acide aminé affecté (c'est le cas pour K9 mais pas K4) 🧣🧣🧣

Structure et Expression Génique

- Nos nucléosomes sont compatibles avec l'expression génique parce qu'ils sont modifiés d'une certaine façon :

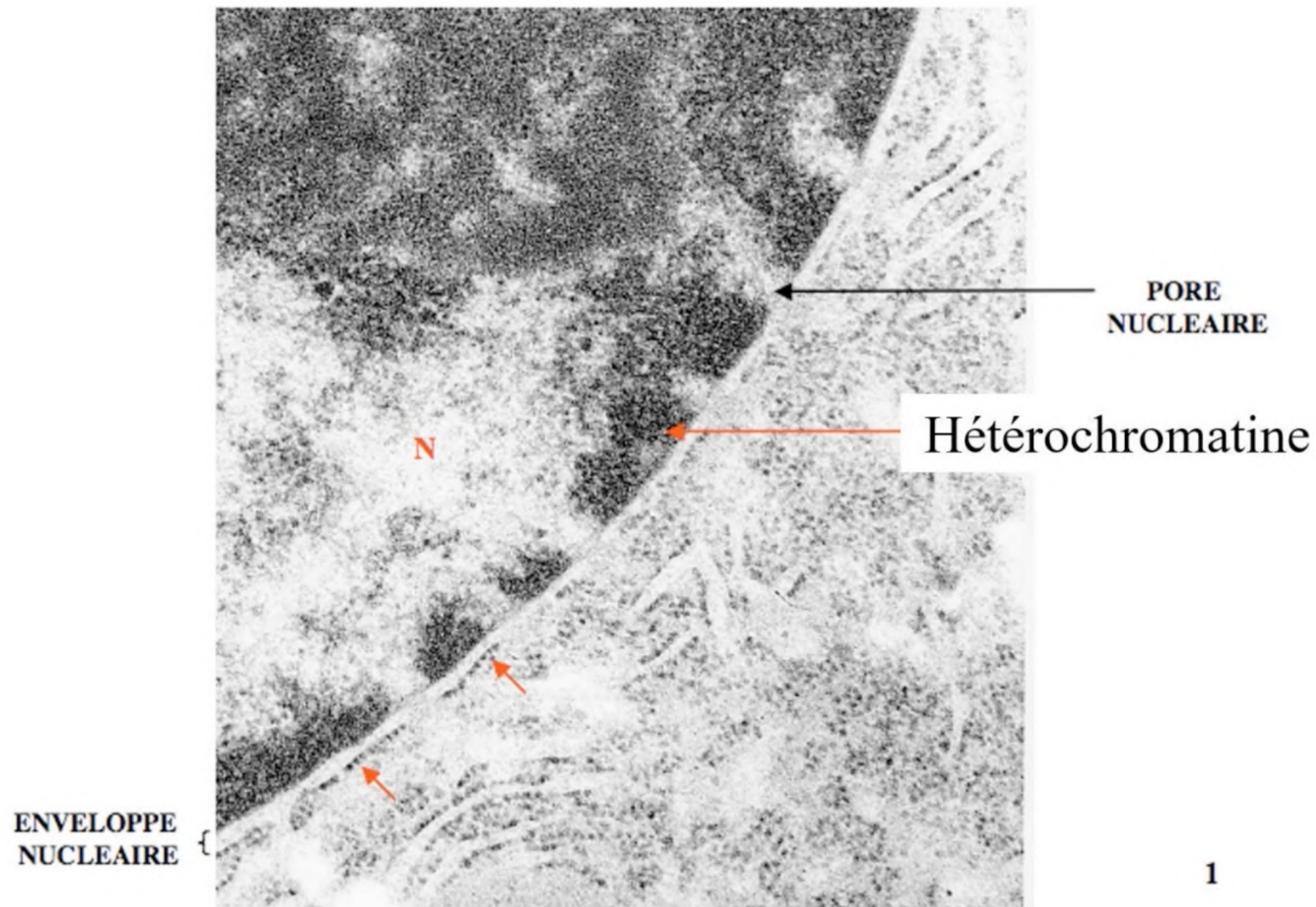


-> C'est justement le rôle des facteurs de transcription qui s'associent à des co-activateurs/ co-répresseurs qui portent ces activités de modification des histones et de modification de la structure chromatinienne 🧣 + 🧣 . Les protéines HAT et les HDAC agissent souvent ainsi en tant que Co-activateurs ou Co-répresseurs en interagissant avec les facteurs de transcription + 🧣 + .

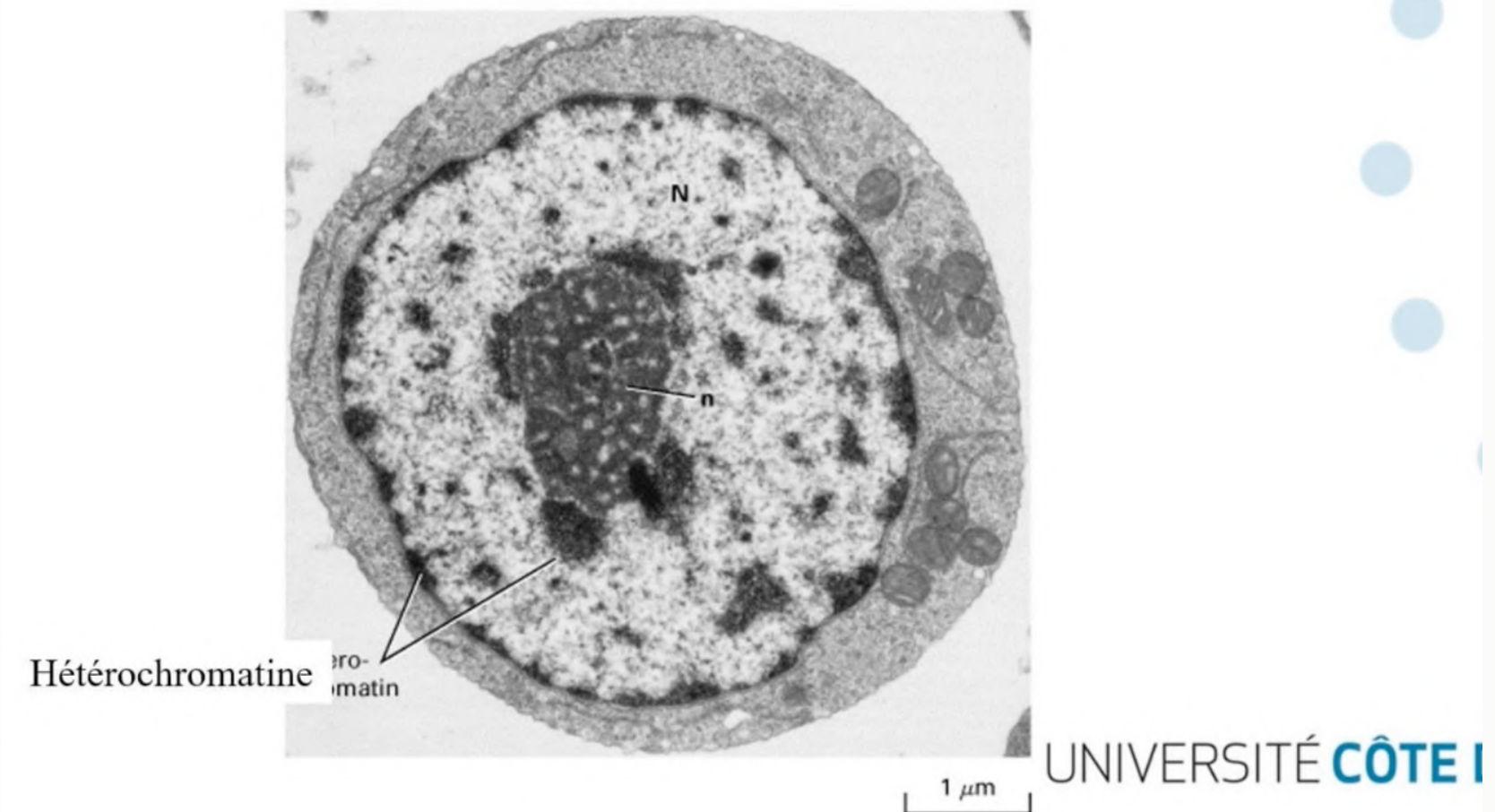
- Le code histone est ensuite traduit par des protéines particulières du noyau qui reconnaissent et interprètent ces modifications. C'est donc en régulant les interactions entre les queues des histones et ces protéines, non-histone, que le code histone pourra être traduit ++ (ex: K acétylée -> protéines à bromodomaines ; H3K9 et H3K27 méthylés -> protéines à chromodomaines ...)

L'hétérochromatine

HEPATOCTYTE de RAT

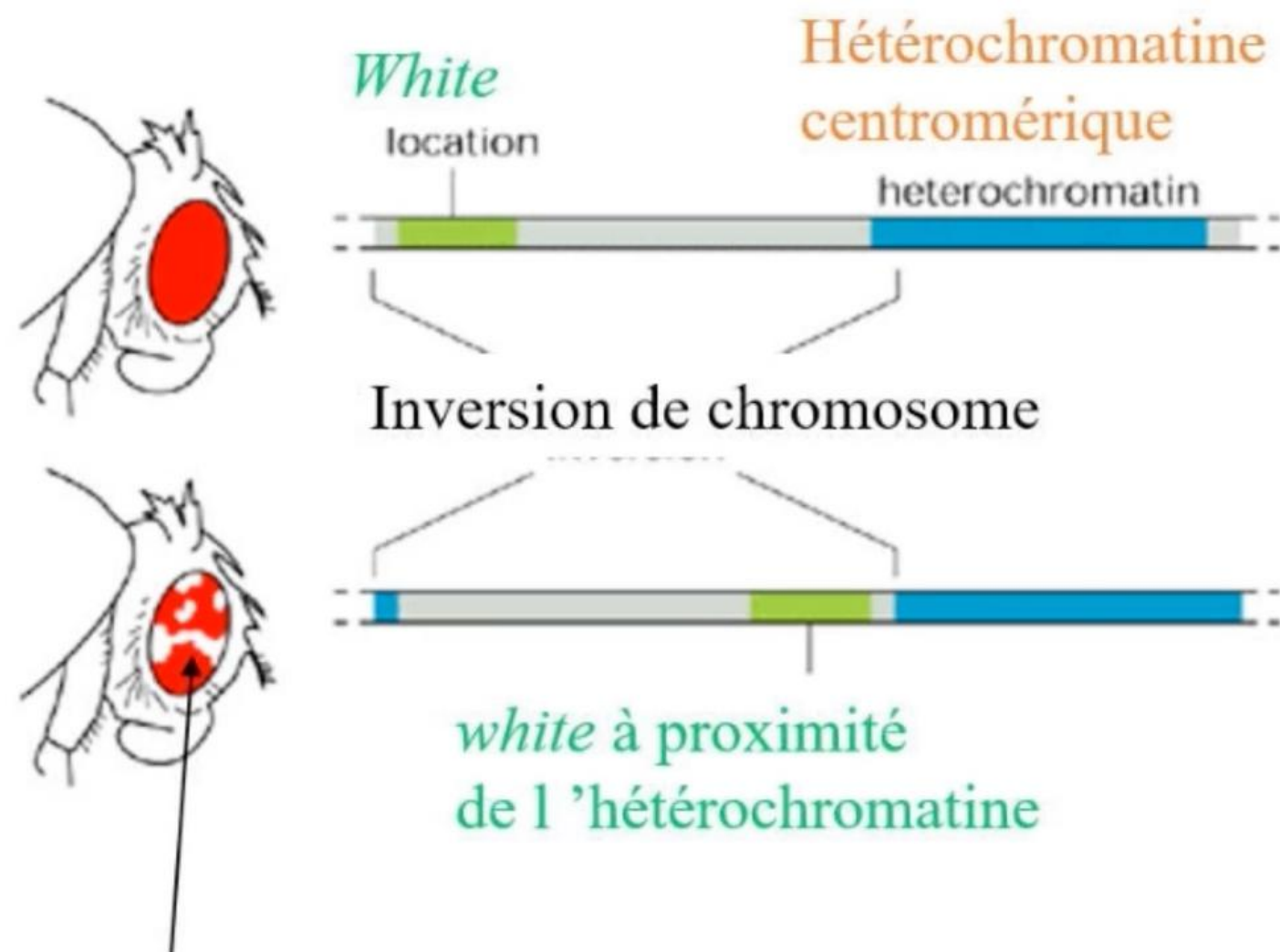


L'hétérochromatine correspond à une forme extrême de chromatine hyper-condensée, facilement visible en microscopie électronique dans des noyaux interphasiques



L'effet de position

- Il a permis d'étudier et de comprendre les facteurs qui interviennent dans cette hétérochromatine et sa fonction. En génétique, on parle d'effet de position quand l'activité d'un gène dépend de son contexte chromosomique 🧬 + 🧬



Variégation du gène *white*

-> Le gène *White* code pour une protéine qui va déterminer la couleur rouge des yeux de drosophile

-> Les généticiens de la drosophile ont observé un phénotype particulier, certains mutants où les yeux étaient avaient des zones blanches et rouges ils ont appelé ça une **variégation de l'expression du gène *White* +++**.

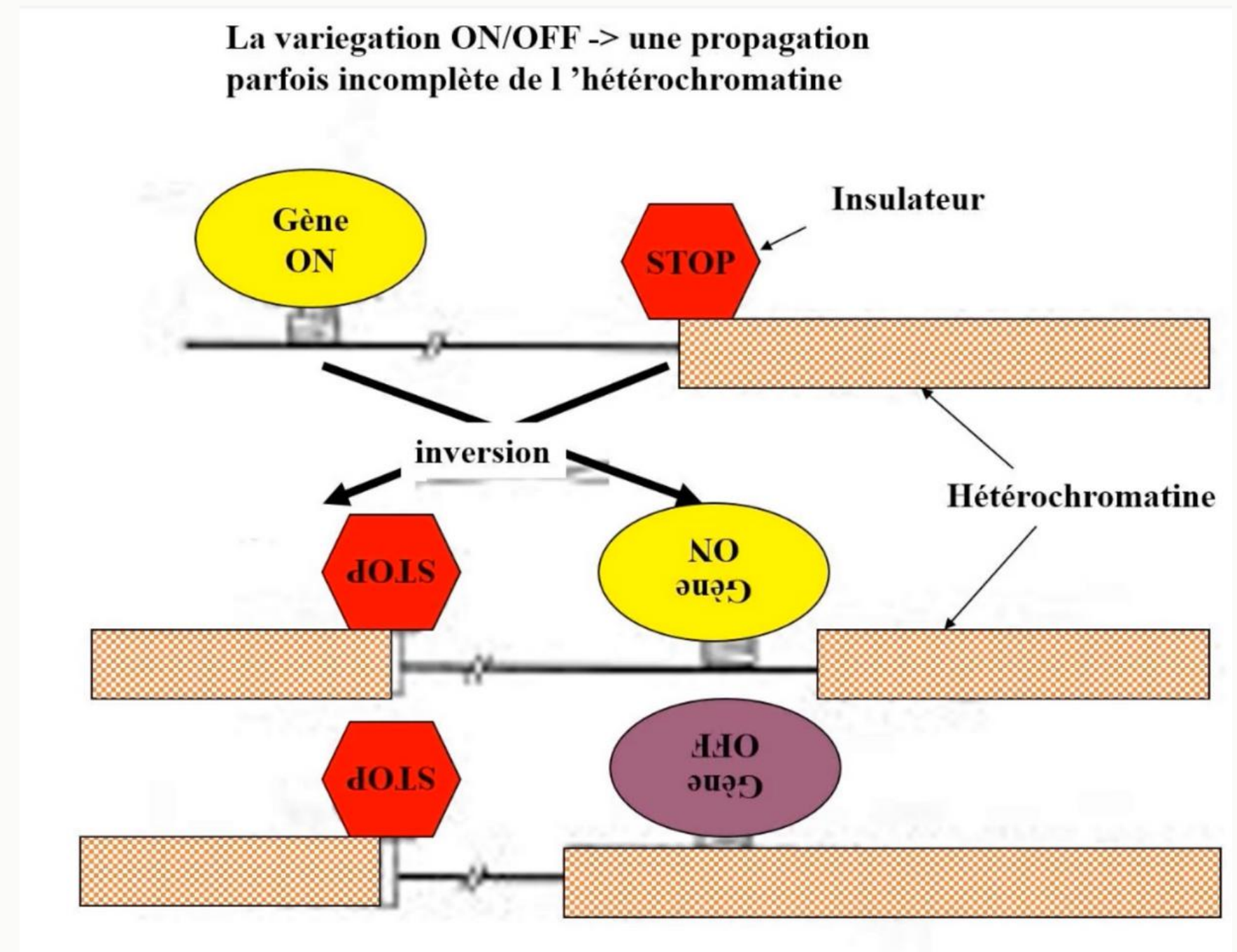
PEV = Variégation des effets de positions

- Le gène white n'est PAS reprimé dans toutes les cellules, alors que celle-ci possèdent l'inversion = PEV:

-> En haut la situation normale :
l'hétérochromatine avec l'insulateur (STOP) qui empêche cette hétérochromatine de se propager et donc de réprimer l'expression des gènes ++.

-> 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.

-> Dans d'autres cellules, comme l'insulateur n'est pas là, l'hétérochromatine va se propager et réprimer l'expression du gène White.

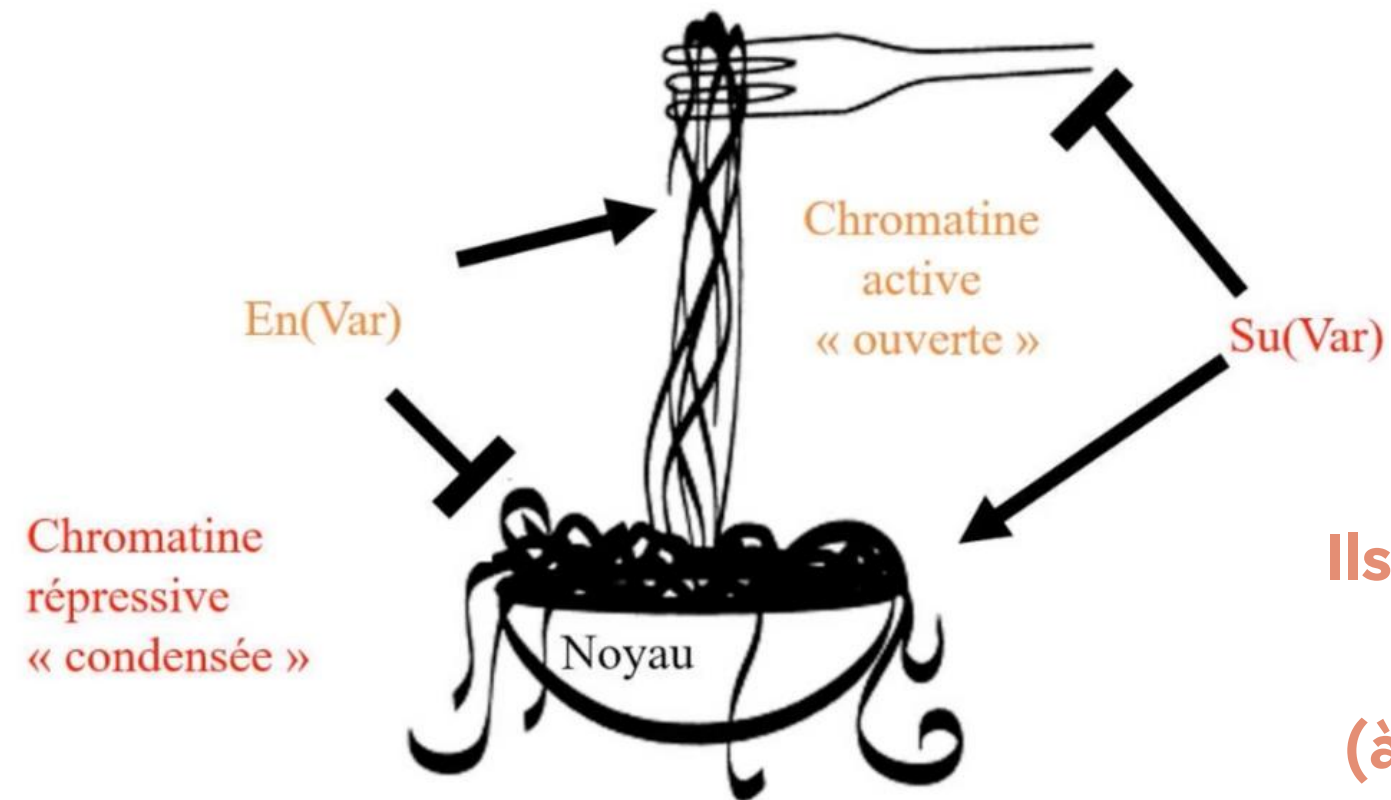


Condensation de la Chromatine

Antagonisme Su(var)/En(var)

En(var)
protéines de l'euchromatine -> FT, HAT, Set1.....

Ils favorisent l'expression des gènes et
DIMINUE la variégation +++
(à l'état "normal" et donc non muté)



Ils favorisent la répression des gènes
et **AUGMENTE** la variégation +++
(à l'état "normal" et donc non muté)

Su(var)
protéines de l'hétérochromatine ->
HP1, HD, Su(var)3-9.....

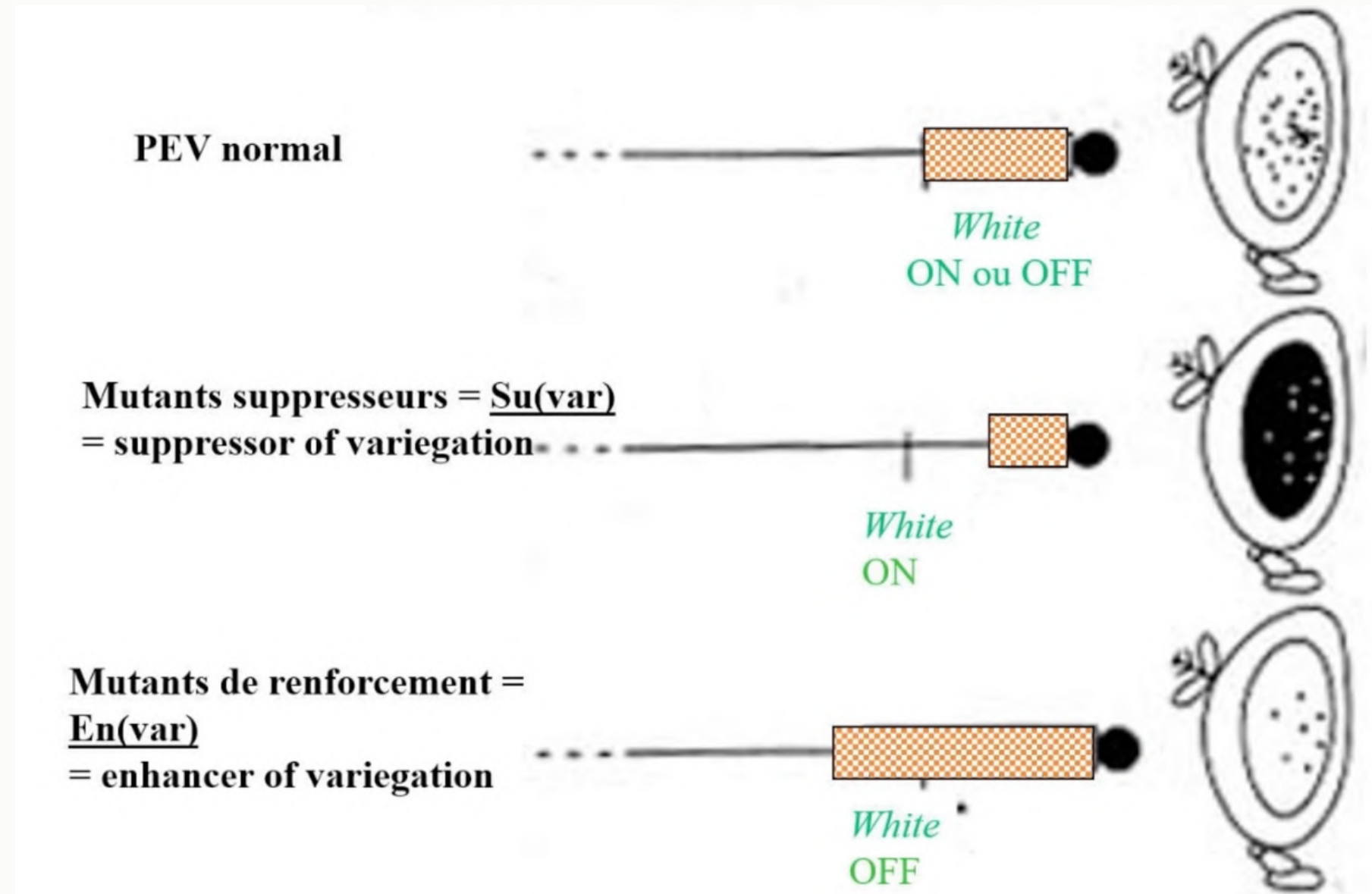
-> Les protéines En(Var) et Su(var) (codés par les gènes En(Var) et Su(Var)) vont contrôler l'état de condensation d'une structure hyper-condensée = l'hétérochromatine

Mutants secondaires du PEV

→ Pour le **PEV normal**, la variégation est présente et les cellules présentes des gènes White **On** ou **OFF**

→ Des mutations **pertes de fonctions** du gène **Su(Var)** vont donc favoriser l'**expression génique** et donc la **diminution de la variégation = supressor of variegation**

→ Des mutations **pertes de fonctions** du gène **En(Var)** vont donc favoriser la **répression génique** et donc l'**augmentation de la variégation = enhancer of variegation**



G A G I P G SCHOOL

賭ケグルイ
KAKEDORUI

© 2019 KADOKAWA



FIN...