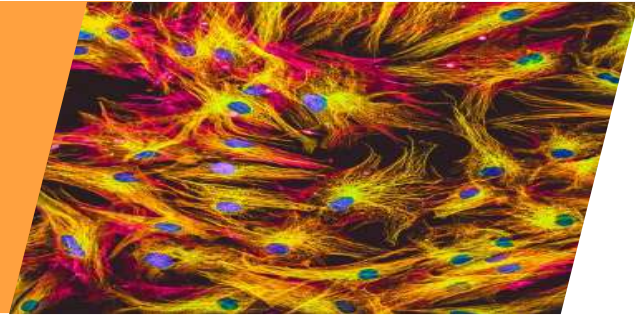


ORGANISATION FONCTIONNELLE DU NOYAU (pt 3)

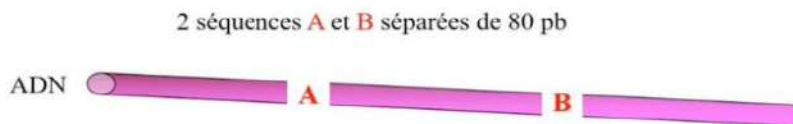


Les petits potes on se retrouve pour ma dernière fiche de l'année (snif...) que j'ai nommée : **« Organisation du noyau (pt 3) »**

Bon les deux autres parties (qui sont bien plus courtes ne prenez pas peur je vous vois) vous aurez l'occasion de les voir avec mon co-tut Clémendocyte. Pour ce qu'il en est du cours qui va suivre si je devais le décrire en trois mots : Intéressant, Unificateur et Redondant. Je m'explique : En gros ce cours va vous paraître long parce que ce que l'on y trouve est déjà un peu détaillé en Biomol et puis je trouve que le prof se répète un peu tout le long. Mais n'empêche que comprendre ce cours permet de comprendre une multitude de notions abordées dans les autres matières ou bien au sein du programme de Biologie Cellulaire. Alors on prend son courage à deux pieds et on y vaaaa !

III - Structure de la chromatine

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



L'**ADN (Acide DésoxyriboNucléique)** fait à peu près **2m** dans un **noyau** qui fait **quelques** microns (μm).

→ **DUCOUP** on est obligé de le **condenser plusieurs milliers de fois** pour le faire rentrer dans le **noyau**.

On prend le cas de **deux séquences** A et B séparées de **80 pb** : il y a **plusieurs niveaux de compaction** qui s'effectueront en **différentes étapes**.

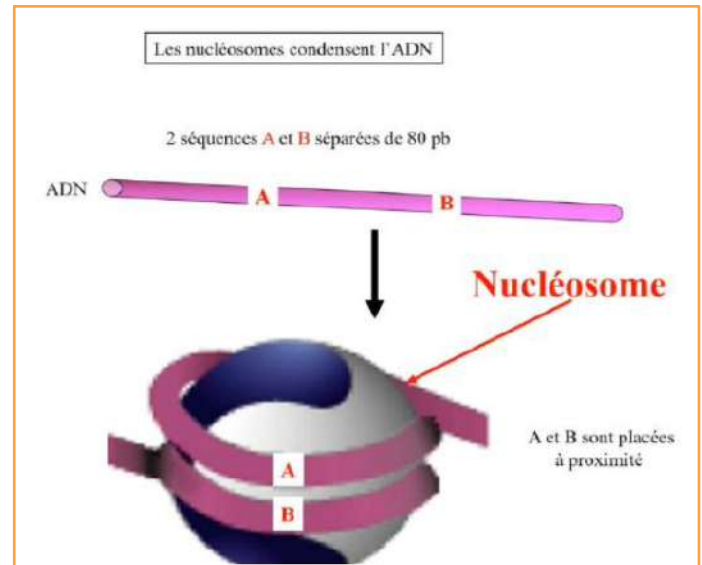
Pour faire plus simple : faut imaginer l'ADN comme un gros tuyau d'arrosage et le noyau comme le chariot enrouleur → comme vous pouvez le voir sur la photo à votre droite (c'est qui ce PNJ ???). La compaction de l'ADN qui se fait par l'intermédiaire de différentes étapes (normalement vu en Biomol) peut être apparenté de façon très schématique au fait de tourner la manivelle afin d'enrouler le tuyau autour du chariot (oohhh les gens qui ont la main verte manifestez-vous). Pour rappel le tuyau est bien plus long que le chariot mais pour autant à la fin il est bien « compacté » autour de lui.



1ère étape : le **Nucléosome** (ou octamère d'histones associée à l'ADN)

Si ces **deux séquences** (toujours **A** et **B**) sont distantes de **80 pb**, elles vont se retrouver **proches dans le génome** ce qui constitue une **forme de condensation** par association au **nucléosome** (ADN est enroulé **2 fois** autour de celui-ci).

On estime une condensation d'un **facteur 7** sur l'ensemble du **génome**. Et pour autant ce n'est que *le début de la condensation*.

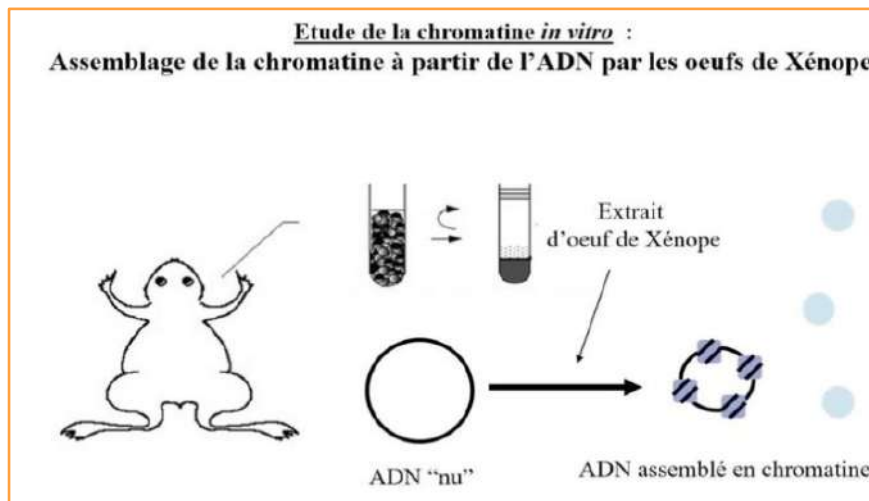


Pour comprendre **cette structure**, il faut l'étudier et donc la **reconstituer en laboratoire** :

Le système expérimental mis en œuvre : les **œufs de Xénope**

On les **centrifuge** pour obtenir un **concentrat d'extrait d'œufs** qui constitue une source incroyable **d'activités biologiques** nécessaires à la production de chromatine. Cet extrait d'œuf, est mis en contact d'un **ADN nu** et à il va s'associer en **chromatine**.

C'est à partir de là que l'on peut étudier à la fois la **structure** et les **propriétés** de la chromatine.



→ On réalise alors une :

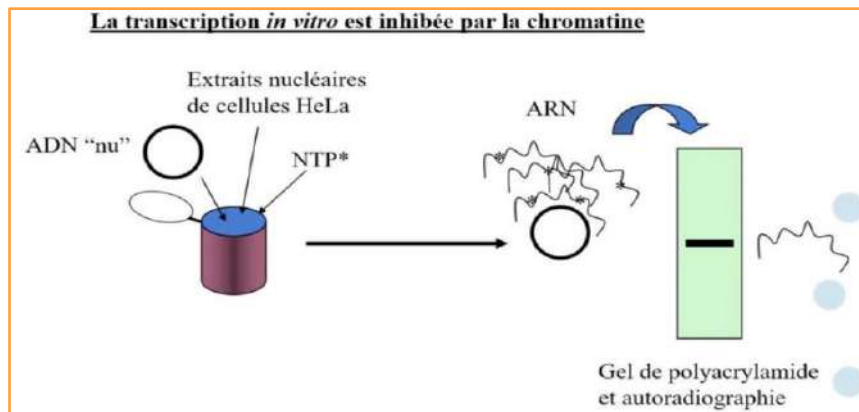
- Expérience : **Inhibition de la transcription in vitro** par la **chromatine**

On part d'un **ADN nu** auquel on ajoute des **extraits nucléaires** de cellules HeLa humaines dérivant de cancers (très utilisées) et on va premièrement se demander s'il peut être **transcrit**. On obtient donc un **ARN**.

On utilise au cours de la **transcription** des **nucléotides isotopes radioactifs (NTP*)** pour pouvoir les suivre facilement par **autoradiographie** et on utilise technique du **gel polyacrylamide** (pas dénaturante dans ce cas, donc sans SDS).

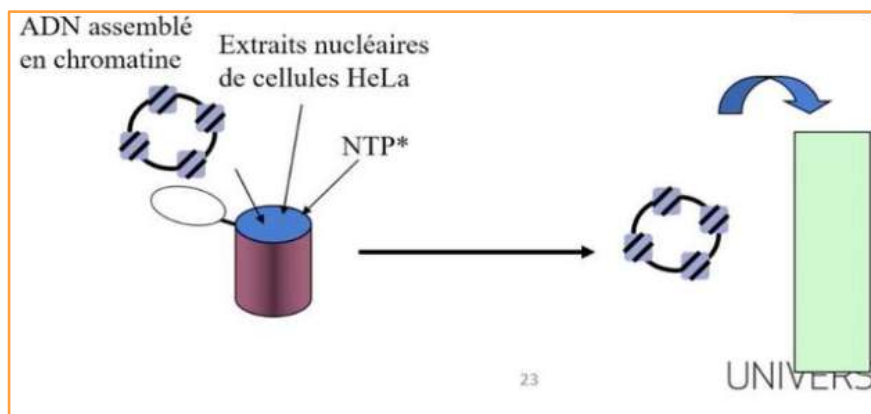
Le laurylsulfate de sodium ou plus communément appelé dodécylsulfate de sodium SDS (de l'anglais = Sodium Dodecyl Sulfate) est un détergent et tensioactif ionique fort, couramment utilisé pour dénaturer les protéines.

L'**ARN** va **migrer** en fonction de sa **taille** et par **autoradiographie**, on visualise le produit de **transcription**.



CONCLUSION : L'ADN nu a été **transcrit en ARN** donc *tout va bene ma bella* 🎵🎵

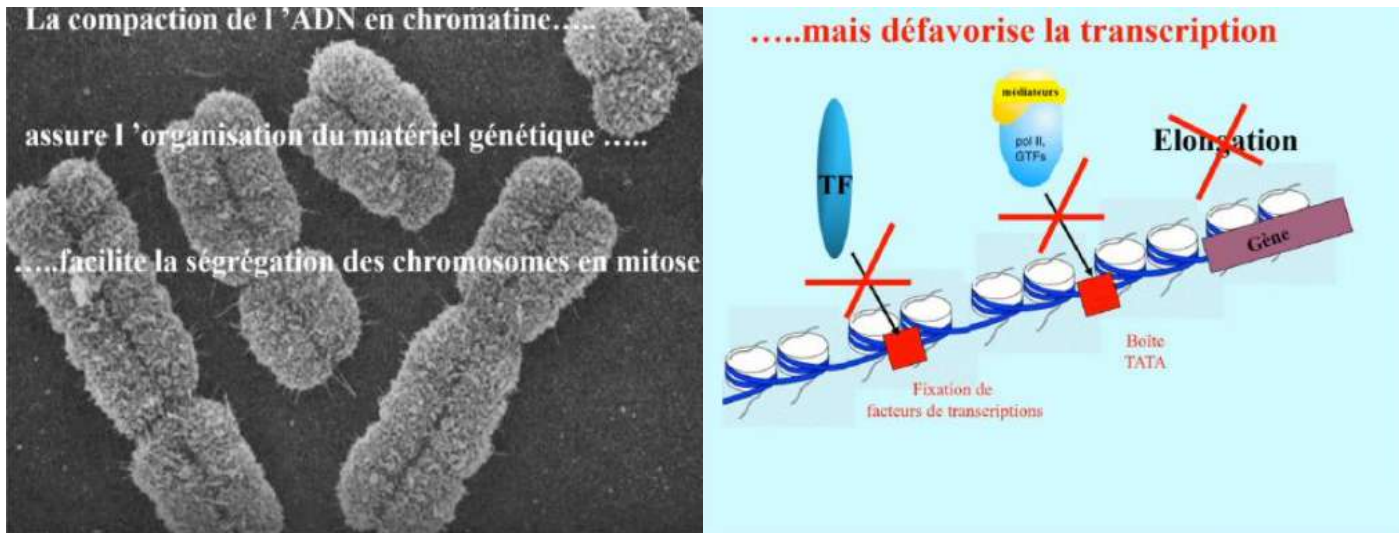
MAIS si on refait la **même expérience** avec les **œufs de Xénope**, l'ADN est assemblé en **chromatine** et on ne voit **rien sur le gel** car il n'y a **pas eu de transcription** (quand l'ADN est sous forme de chromatine). La transcription ne s'effectue pas et là c'est problématique (la tuile...)



CONCLUSION : La transcription *in vitro* est inhibée par la chromatine !!

Mais tout cela est embêtant quand on sait qu'elle **se réalise** quand même ***in vivo***, au sein de notre **organisme** où on retrouve sans aucun doute de l'ADN compacté sous forme de **chromatine**.

Alors c'est cette **constatation** qui a motivé des *travaux ultérieurs*...



Cette condensation de **l'ADN en chromatine** assure une **bonne organisation** du matériel génétique et **facilite** la **ségrégation des chromosomes** en mitose (en plus de permettre la **protection** de l'information génétique au cours de ce processus de division), mais **défavorise la transcription**.

Mais comment cela se passe sachant que la transcription peut quand même s'effectuer ?

En effet, tous les **éléments de régulation** de l'**expression des gènes** (ARN polymérases, médiateurs, facteurs de transcriptions → ce que j'appelle vulgairement **machinerie transcriptionnelle**) ne pourront pas accéder à leur **site d'action** car l'ADN va être **masqué** par une **structure condensée** de **chromatine**. Ainsi ils doivent être **débloqués** pour agir !

Nous allons donc voir, comment la cellule est capable de lever ces difficultés. Tout d'abord, il faut connaître la structure du **nucléosome** *et ce que nous allons voir de suite par le biais d'une description on ne peut plus précise ☺*

A) Le Nucléosome :

Le **premier niveau** d'organisation de la **chromatine** c'est le **nucléosome** et son organisation spécifique le long de la molécule d'ADN : la **fibre nucléosomale**.

Structure et composition du nucléosome :

☀ 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'histone = 8 protéines histones**).

Alors c'est tout bête mais ça sera plus clair avec une petite explication : on a plusieurs paires d'histone comme sur le schéma notamment une paire (donc 2 histones) H2A, une paire H2B, une paire H3 et pour finir une paire H4. On a alors au total $2 \times 4 = 8$ histones dont le nom d'octamère qui en s'associant avec l'ADN nu (s'enroulant par deux fois autour de celui-ci) forme le fameux nucléosome !

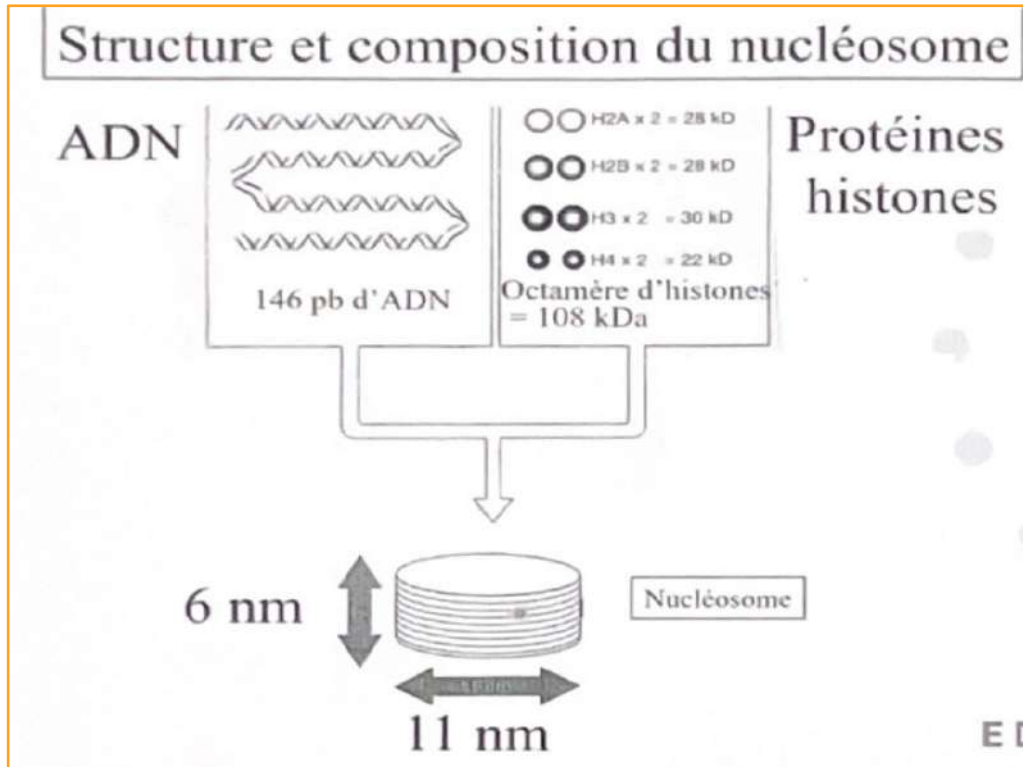


✳ Les **histones** sont des **petites protéines basiques** (riches en **AA chargés positivement +**) qui vont **s'assembler les unes avec les autres** et qui vont avoir pour **propriété d'enrouler l'ADN** (car l'ADN est **chargé négativement -**).

Ces **8 protéines** sont regroupées en **4 dimères d'histone** :

$2 \times H2A + 2 \times H2B + 2 \times H3 + 2 \times H4$ +++

✳ Au final, un **octamère d'histone** fait un poids moléculaire de **108 kDa** et permet d'enrouler **146 paires de base (pdb)** d'ADN qui font **2 fois le tour**.



✳ La cellule synthétise les **constituants de base des nucléosomes** : ils ont des propriétés **d'autoassemblage**, mais on a besoin d'aide pour **augmenter l'efficacité** de la réaction : **rôle des protéines chaperonnes** +++

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 "chaperon"**

Les chaperons **guident les histones** pour permettre leur **assemblage mutuel**.





L'assemblage des nucléosomes est stimulé par des protéines chaperonnes qui interagissent avec les hétérodimères d'histone

IL EXISTE UN **ORDRE D'ASSEMBLAGE PRÉCIS** (=ça ne se fait pas au hasard)

1 Un premier chaperon est associé à un **hétérodimère H3/H4** qui enroule ensuite l'**ADN** (1 tour).



2 Ensuite, toujours à l'aide d'une **protéine "chaperon"**, on aura l'assemblage de **H2A** et **H2B** à la structure précédemment formée → **Nucléosome** (ADN enroulé 2 fois autour)

TUT'RÉCAP : L'assemblage des nucléosomes est donc stimulé par des protéines chaperonnes qui interagissent avec des dimères d'histone dans un ordre bien précis :

H3/H4 → H2A/H2B

Alors là il faut faire gaffe : quand on parle d'hétérodimère H3/H4 (par exemple, c'est la même chose pour H2A/H2B) en réalité on évoque 2 protéines histones (soit 1 par paire).

En gros on va retrouver dans notre hétérodimère H3/H4 :

- 1 histone H3
- 1 histone H4

Au final, on retrouve l'assemblage de 4 hétérodimères (2 H3/H4 et 2 H2A/H2B) afin de réunir 2 histones par paire pour les 4 types d'histones composant l'octamère qui ne sont pas les seuls types d'histones existants (vu en Biomol)

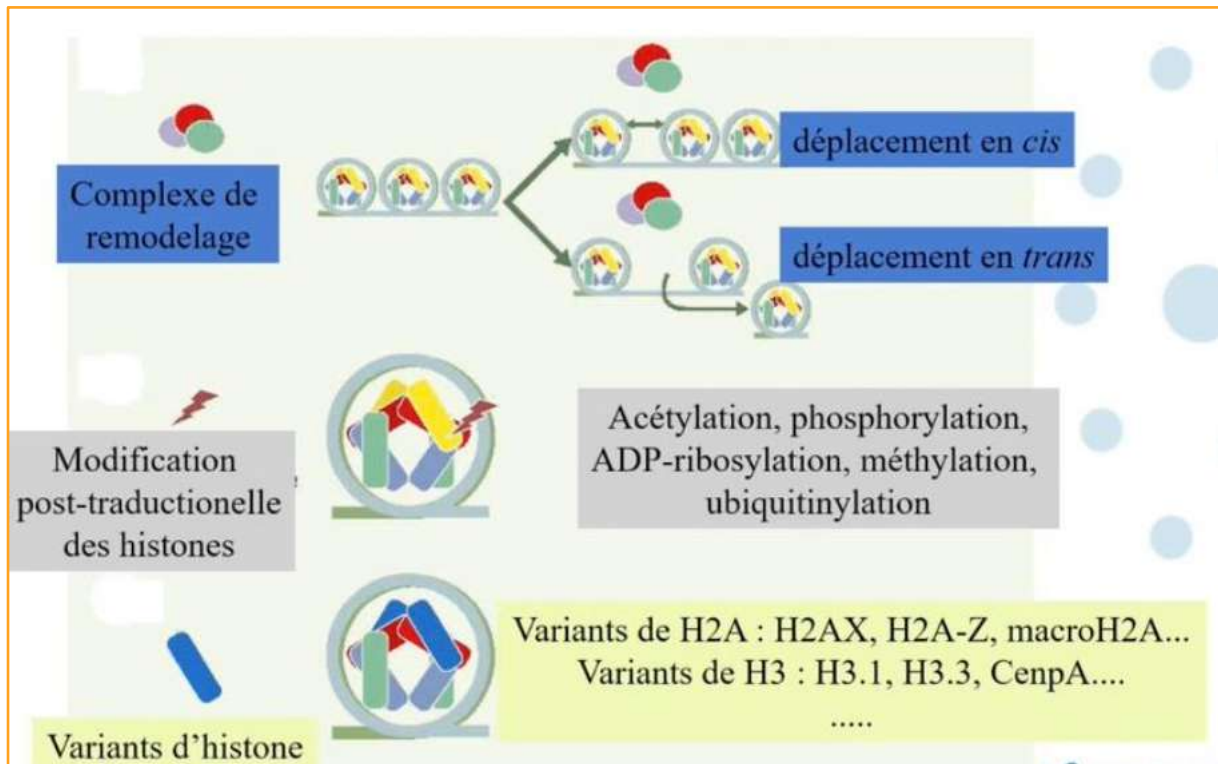
Les nucléosomes défavorisent la transcription (comme il constitue un niveau de compaction/condensation de l'ADN 🧑🏻🧑🏻)

Les nucléosomes ne sont pas tous identiques 🧑🏻🧑🏻

☀ On a une **structure nucléosomale** commune mais qui va présenter plusieurs **variants**. En effet, la cellule doit **pouvoir modifier/moduler** ces **nucléosomes** en fonction de ses **besoins** (*expression ou répression des gènes*).

MAIS PAR QUELS MOYENS LA CELLULE MODIFIE NUCLÉOSOMES ?

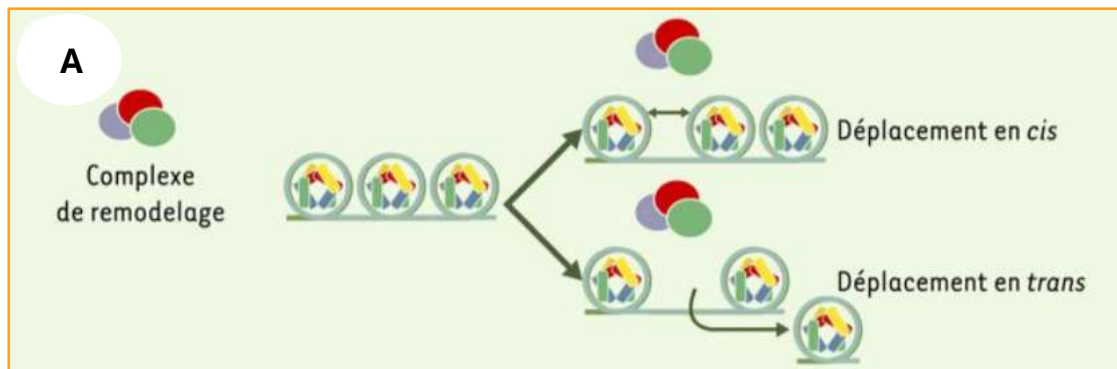
En effet, il existe **3 voies de modifications des nucléosomes** :



A - Le complexe de remodelage :

✳ On peut d'abord modifier un nucléosome en **changeant sa position**, selon les **besoins** de la cellule. Par exemple, à **certains endroits**, il n'y aura **pas de nucléosomes** (comme on n'en a pas besoin).

✳ Il existe donc des **complexes protéiques** (= **complexe de remodelage**) qui vont, en fonction de la **localisation** dans le génome, choisir de déplacer **tel ou tel nucléosome**.

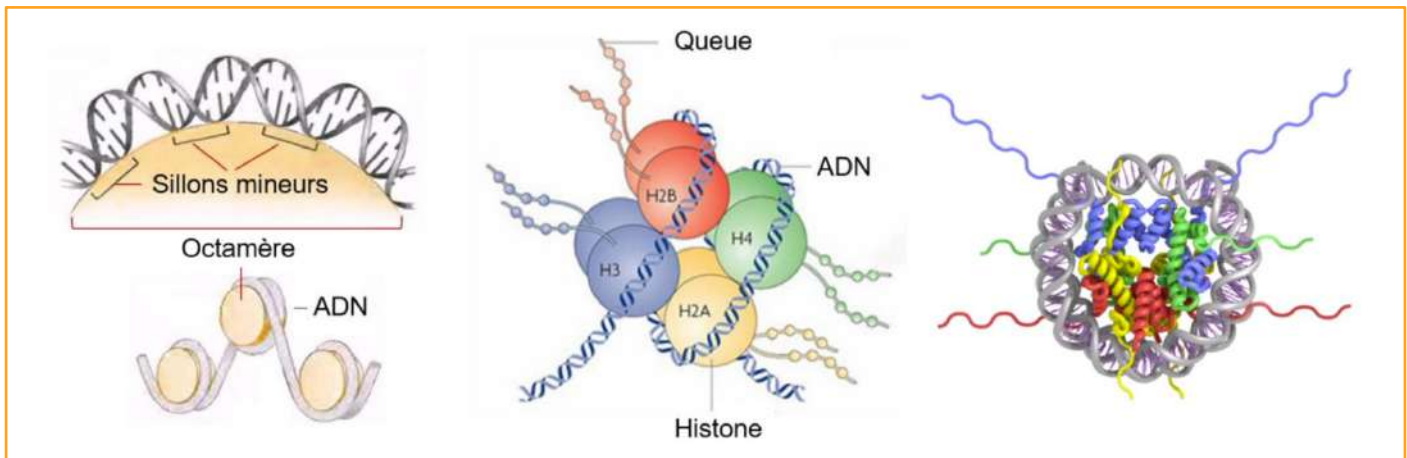


La position des **nucléosomes** peut être modifiée de **différentes façons** :

- Déplacement **en CIS (en haut)** = le **long** de la **même molécule d'ADN**.
- Déplacement **en TRANS (en bas)** = **éviiction du nucléosome**, il **quitte** le brin d'ADN pour aller sur une **autre molécule d'ADN**

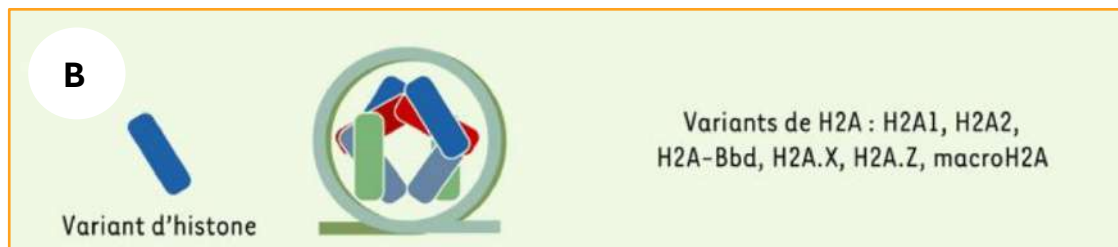
B - Les variants d'histones :

Rappel : un octamère classique est constitué des protéines **H2A, H2B, H3 et H4**. Il existe pleins de gènes codant pour **H2A**, pour **H2B** et pour **H3**.



Ici l'ADN chargée négativement au niveau de son squelette sucre-phosphate (alternance de désoxyribose et de PO_4^-) interagit de par ses sillons mineurs avec les charges positives du cœur du nucléosome riche en acides aminés basiques (chargés positivement). Sur ce schéma on peut bien distinguer les 4 types de paires d'histones de l'octamère classique.

✳ Ces **différents gènes** vont donc coder pour **différentes histones** (complexité d'organisation): ce sont des **variants d'histones** **H2A, H2B, et H3** qui vont leur conférer une **propriété particulière**



EXEMPLE DE GIGI :

Variants de H2A : H2AX, H2A-Z, macroH2A...
Variants de H3 : H3.1, H3.3, CenP A....

Bonus HP : CenP A est un variant de H3 qui est exprimé dans les kinétochores lors de la mitose (coucou Lilapoptose 🙌)

✳ Comme vous pouvez le voir, H4 quant à elle n'a pas été mentionnée plus haut. En effet, il faut savoir que **H4 est codée par un seul gène ++++ : elle ne possède donc pas de variant !**

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

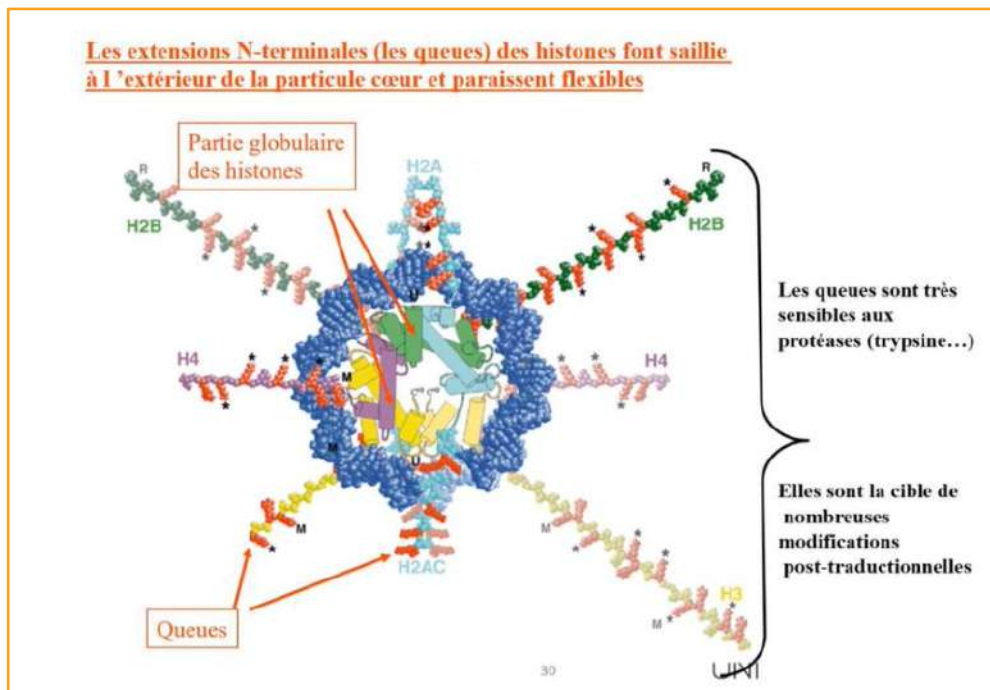
Récap : La présence de tel ou tel variant au sein d'un nucléosome **affectera la fonction du nucléosome** et donc son rôle vis-à-vis de l'ADN et des gènes environnants

Mais les gars (et les filles je ne vous oublie pas) est-ce que vous savez comment sont disposées les histones au sein du nucléosome ? Parce que moi oui mdr et on va voir ça tout de suite !

- **Organisation d'un nucléosome :**

☀ Les histones sont constituées d'une **partie globulaire** (au centre) et d'une **queue N-terminale +** (projetée vers la périphérie), elle n'est pas incluse dans le **cœur du nucléosome** et sort entre les **deux tours d'ADN**. Elle se trouve donc en **surface** du nucléosome (voir schéma ci-dessous)

☀ Ce sont elles qui 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**.



☀ **L'octamère** d'histone va se disposer de façon à permettre **sa modification post traductionnelle** (les queues sont facilement accessibles). Par ailleurs, les histones sont **basiques** là où l'ADN est clairement **acide**.

- **Description du schéma :** on peut voir les **4 paires d'histones** formant le **nucléosome**. Les **queues** sont représentées sous forme de **longues extrémités** toutes droites car elles ne sont **pas assez structurées**. On distingue l'**ADN** qui entoure 2 fois le **nucléosome** (gros truc bleu épais qui forme une boucle au centre).

☀ Les **queues** des histones sont par ailleurs **très sensibles aux protéases** comme la **trypsine**, ce qui permet d'étudier le comportement des nucléosomes sans celle-ci. On fait alors des *expériences* pour tester ça (heureusement pas dans ce cours 😊)

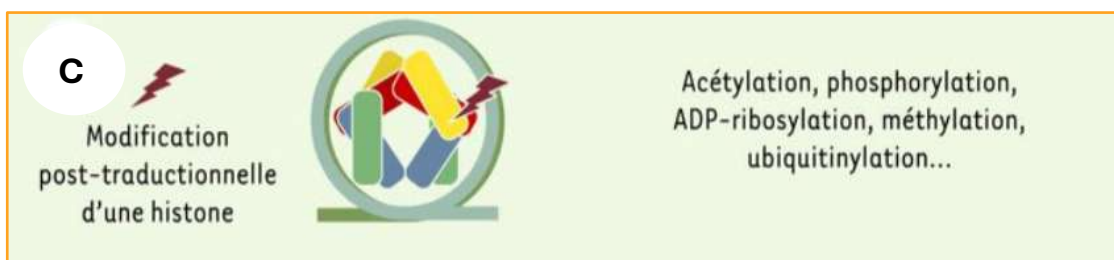


TABLEAU RÉCAP *(assez cool celui-là)*

Parties globulaires centrales	Queues N-terminales périphériques
<ul style="list-style-type: none"> Elles se regroupent au centre/cœur du nucléosome (cylindre sur le schéma) Elles possèdent de nombreux acides aminés basiques qui sont chargés positivement (surtout lysine et arginine). L'ADN, acide, étant chargé négativement, il va y avoir une forte interaction entre la partie globulaire et l'ADN. L'ADN va donc s'y enrouler. 	<ul style="list-style-type: none"> Elles 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 AA 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.

C - Les modifications post-traductionnelles :

☀ 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. Elles sont dites post-traductionnelles

☀ C'est le cas pour les histones où des **modifications spécifiques** peuvent avoir lieu après la **traduction dans le cytosol** (avant d'être **réimportée** dans le noyau en passant par les pores nucléaires dont la solidité est assurée par les lamines #CyTOUTsquelette il est partout ce fou) grâce à des **enzymes spécialisées** 🧑🧑🧑

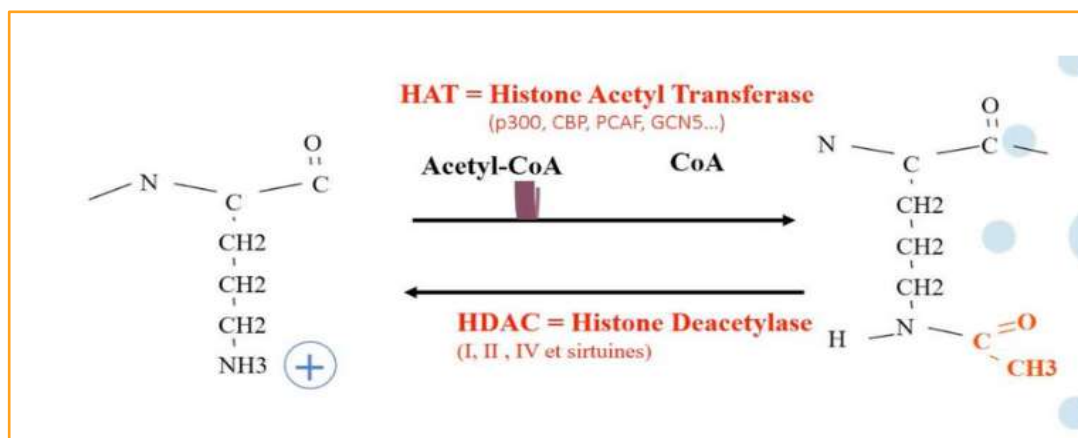
LISTE DES PRINCIPALES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES :

Il en existe **pleins** de type. Parmi les plus importantes, on retrouve :

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

Ces modifications ont un sens fonctionnel particulier pour la cellule +++

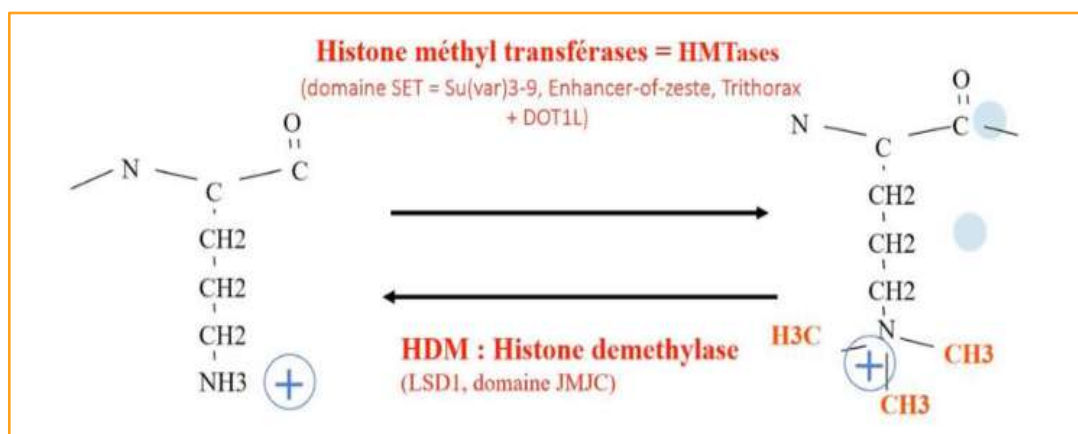
Exemple : Acétylation (sur une lysine)



Les **enzymes** qui catalysent cette réaction s'appellent les **HAT** (= **Histone Acétyl Transférase**). Le **co-acteur** (co-enzyme) qui lui est associé est **l'Acétyl-CoA**. Son groupement **acétyle** est transféré sur le groupement **NH3** des acides aminés basiques comme la **lysine**. C'est ce qu'on appelle l'**Acétylation** !

La **réaction inverse** est possible : on parle de **Désacétylation** catalysée par les **HDAC** (= Histone DesAcétylases) de différents types (I, II, IV et sirtuines)

Autre exemple : Méthylation (sur une lysine ou sur une arginine \neq Acétylation)





Les **enzymes** qui catalysent cette réaction s'appellent les **HMT** (= **Histone Méthyl Transférase**). On assiste à l'**ajout** d'un ou plusieurs **groupes méthyl** (-CH₃) sur l'**amine** des acides aminés comme la lysine ou bien l'arginine.

La **réaction inverse** est possible, c'est la **Déméthylation** catalysée par les **HDM** (= **Histone DéMéthylases**) de différents types (LSD1, domaine JMJC)

Petite explication HP : *(pour votre compréhension la team)*

→ Une lysine/arginine peut être **mono**, **di** ou **triméthylée** ce qui lui confère des propriétés différentes à chaque fois. Ainsi, 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 méthylation**, 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** (îlots CpG cf. biomol) ⊖
⊖ **sont deux choses bien distinctes ++** ⊖

MAIS COMMENT CES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES PORTENT-ELLES DES INFORMATIONS ÉPIGÉNÉTIQUES ?

→ LE CODE HISTONE :

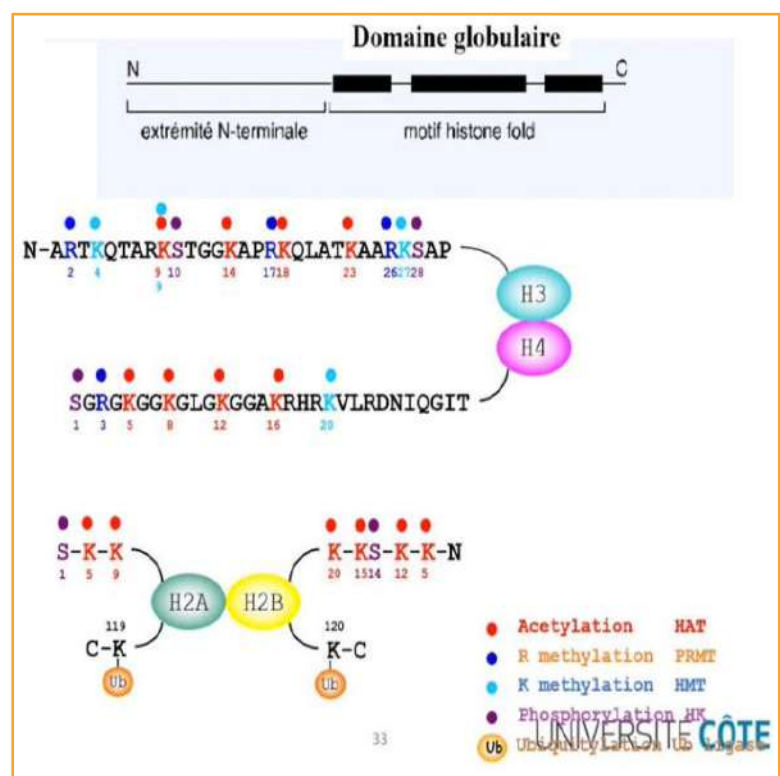
La **diversité** des **modifications post traductionnelles** et l'existence de variant des histones constituent un code : le **code histone** **qui est caractéristique des eucaryotes** 🧑🧑

Celui-ci :

- se rajoute au code génétique
- est **facilement modifiable** (contrairement au code génétique qui est le même pour tous les types cellulaire)

Sur ce schéma on peut voir des **queues N-terminales**. Ces queues sont composées de **différents acides aminés**.

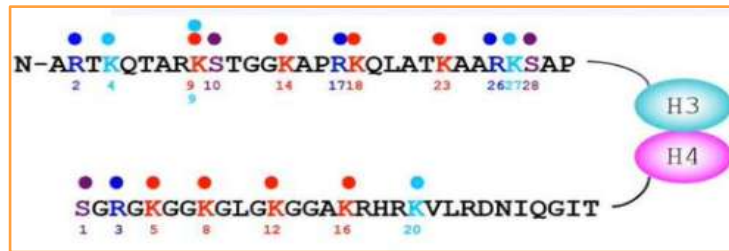
À côté de chacun des AA, les petits points représentent toutes les **modifications** qu'il est possible de faire. Toutes les histones ne sont pas forcément **modifiées**, et certaines modifications sont **alternatives**.





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 deux en même temps). On retrouve bien cette notion de **modification alternative** !



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 histone**.

✳ Si le **code génétique** correspond à la séquence des nucléotides, il ne constitue pas en revanche le **seul déterminant de l'expression de l'information génétique**, car à ce code génétique se superpose un "surcode", **le code histone** puisque ce sont les protéines qui sont *intimement liées à l'ADN* au sein de la chromatine. Le **couplage de ces 2 codes** va constituer les informations principales décryptées par la cellule afin d'**exprimer** (ON) ou de **réprimer** un gène (OFF)

✳ Tous ces codes communiquent 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 (*et donc de la différenciation spécifique des cellules souches*)

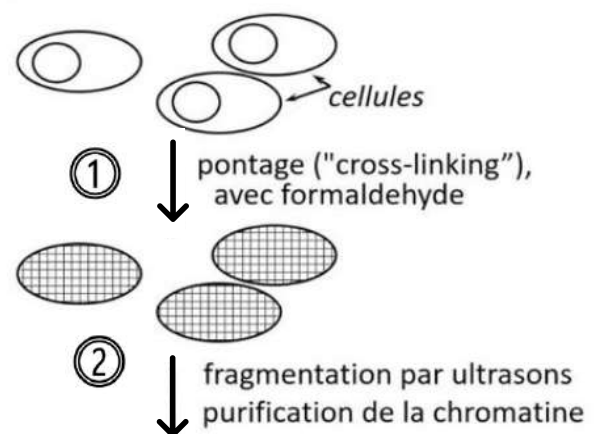
✳ Ce code est à étudier pour développer de nouveaux agents thérapeutiques
→ **L'immunoprécipitation = IP (ChIP)**

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

IMMUNOPRÉCIPITATION : (*différentes étapes*)

① On **fige** la cellule dans un état par **pontage/cross-linking** (entre ADN et protéines et entre protéines elles-mêmes) grâce au **formaldéhyde** (afin de faciliter la purification des facteurs sans dénaturation au cours de l'isolation)

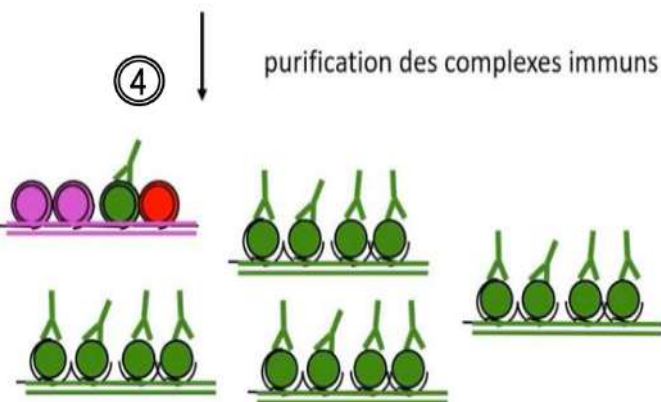
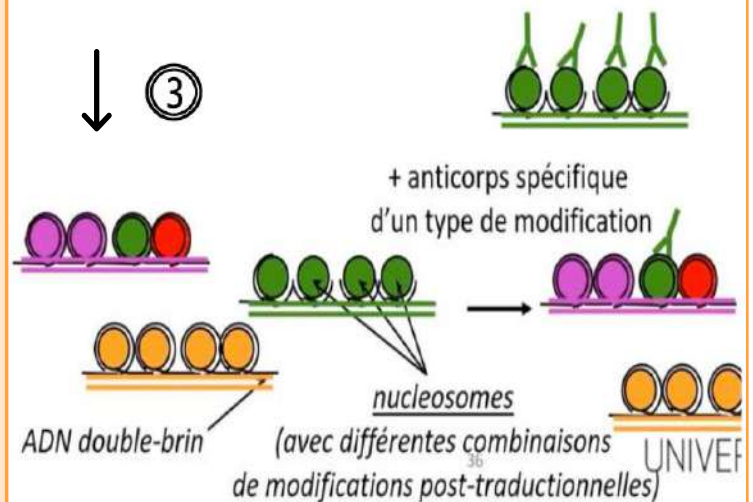
② On prépare ensuite des **extraits** de ces cellules **Crosslinké** par **fragmentation via ultrasons et purification** de la **chromatine**



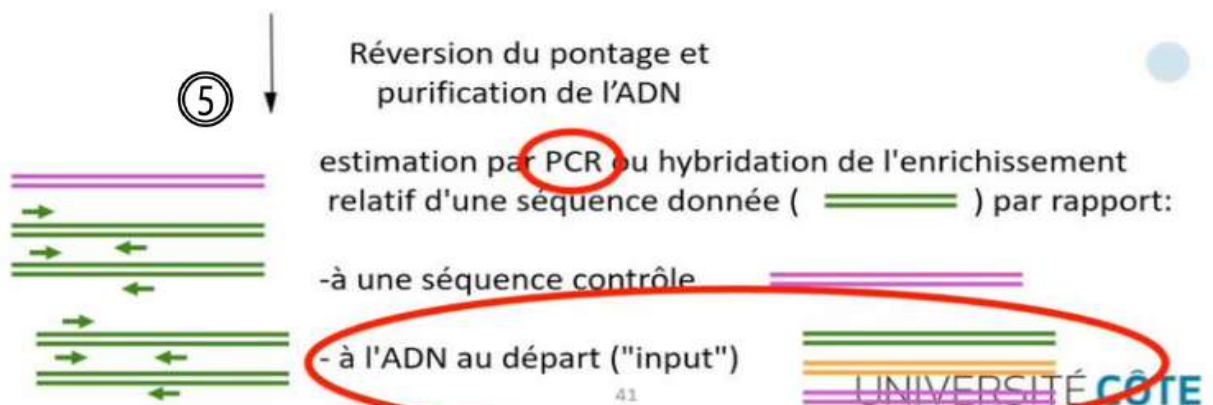
★ On veut savoir la **couleur du nucléosome** par production **d'anticorps spécifiques** d'un type de **modification post- traductionnelle des histones +++**

③ On **incube** les fragments de chromatine avec ces **Anticorps = AC** (ici exemple d'AC qui reconnaissent les modifications des nucléosomes verts)

④ On **enrichit** (augmente) ensuite les **fragments de chromatine** contenant cette **modification** (ici vert) reconnues par nos **AC spécifique** par **purification du complexe immun**.



★ Cependant on ne visualise toujours pas ces **fragments de chromatine** et leur **proportion** par rapport au reste de la chromatine = il faut donc calculer un **degré/facteur d'enrichissement** afin de donner une réponse sur la présence de cette modification sur telle ou telle séquence d'ADN.



⑤ On va donc **renverser le pontage** (sinon les fragments ne seront pas analysables) et purifier simplement la **partie ADN** (surtout le vert) = ADN associé à la chromatine qui porte cette modification.

★ Il existe tout un ensemble de méthodes pour "**compter**" le nombre de molécules d'**ADN vert**.

→ Ici on s'intéresse à la **technique par PCR** (*Polymérase Chain Reaction*). On amplifie une **séquence d'intérêt** d'ADN (ex: Promoteur d'un gène) et on fait pareil avec une **séquence contrôle** et pour l'ADN de départ avant immunoprécipitation = l'**Input**

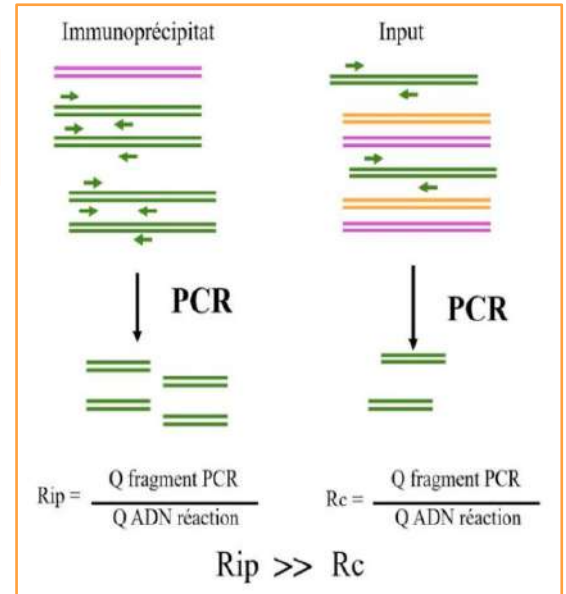


☑ Cette PCR peut être rendue **quantitative**, pour être comparée à la PCR, à l'amplification de fragments verts mais présents dans l'**ensemble des fragments de chromatine du départ**.

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 = **Rip** et un deuxième facteur qui est le **facteur contrôle** pour l'**input** = **Rc**

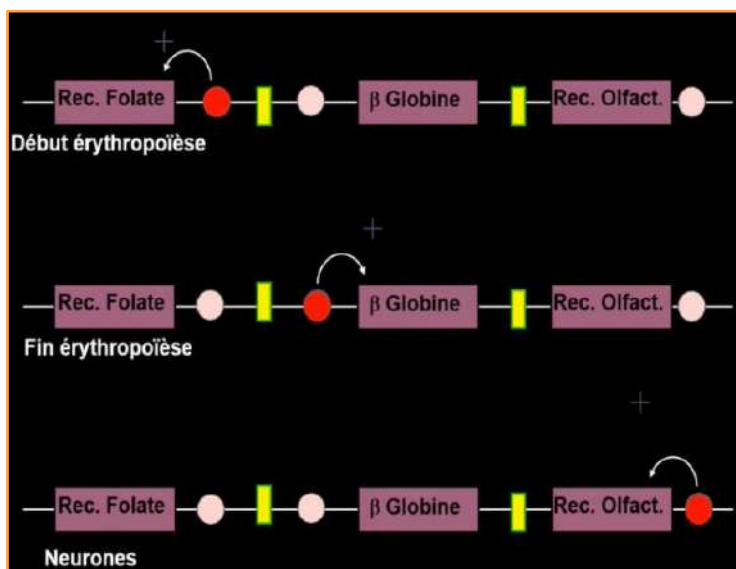


☑ Si le facteur IP = **Rip** (de l'immunoprécipitation) est **très largement supérieur** au fragment contrôle = **Rc** ça veut dire qu'on a **enrichissement de ce fragment vert** = donc dans les cellules de départ on avait dans les **séquences** du promoteur du gène qui nous intéresse, un **enrichissement de la modification post-traductionnelle verte** reconnue par l'AC qu'on avait utilisé *(et ainsi le nucléosome vert porteur de ces modifications est présent au niveau de ces séquences → compréhension du code histone)*

On définit alors un **Facteur d'Enrichissement** :

$$F = \text{Facteur d'enrichissement} = \frac{Rip}{Rc}$$

Prenons désormais un exemple pour illustrer la théorie : L'Érythropoïèse
(processus de formation des globules rouges)



Sur ce **schéma** (à gauche coco), en se promenant sur une partie du génome, on voit des **éléments régulations** à **distance** pour réguler de manière **tissulaire spécifique** l'expression des gènes. Les **rectangles** sont des **insulateurs** et les **ronds** sont des **enhancers** (on les verra plus tard où peut être que vous les avez déjà vu avec Clémendocyte)



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

- Le gène du récepteur folate,
- Le gène codant pour la bêta globine,
- Le gène codant pour un récepteur olfactif

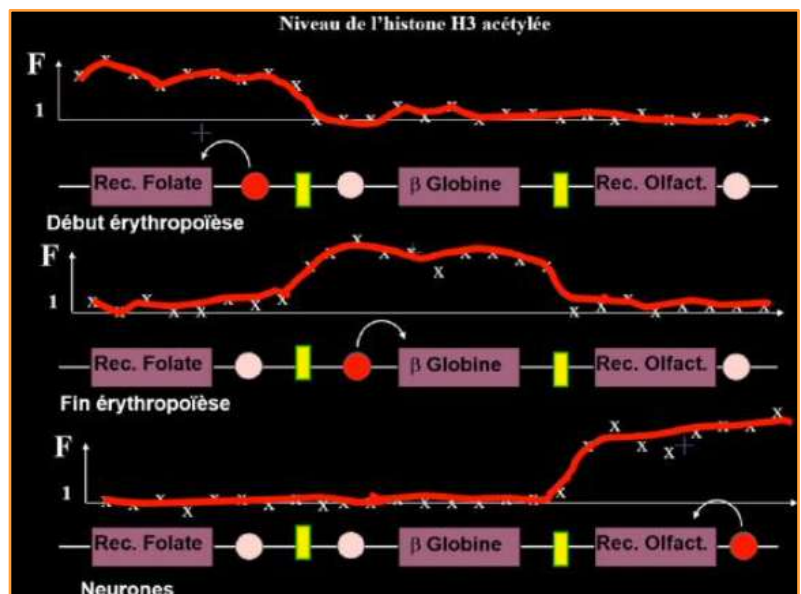
✳ On étudie la **structure de la chromatine** dans ces trois régions (portant respectivement chacune un des trois gènes cités au-dessus), dans **3 conditions** :

1. **Au début de l'érythropoïèse** : on a besoin du **récepteur folate** donc il est exprimé par l'**enhancer**. Mais nous n'avons pas besoin du **gène bêta globine**, et encore moins du **récepteur olfactif**. Ces deux gènes sont donc réprimés grâce à la présence de l'**insulateur** qui **empêche l'action de l'enhancer**.
2. **À la fin de l'érythropoïèse** : On a plus besoin du **récepteur folate** (qui est **réprimé**) mais on a besoin du gène **bêta 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.
3. **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**.

Au final, il faut bien retenir que ces **trois gènes** ne s'expriment **PAS dans les mêmes cellules** (*type cellulaire ou bien degré de maturation/différenciation*).

On effectue ensuite notre démarche **d'IP** et on utilise ensuite toute une série d'amorces **PCR** pour naviguer dans ce génome. *Qu'observe-t-on ?*

Nous voyons ici que la **quantité d'histones H3 acétylées** est représentée par le trait rouge (plus le trait monte en ordonné, plus on a **d'enrichissement en acétylation = Facteur F d'enrichissement**).



On retrouve à nouveau nos **3 situations** :

1. **Au début de l'érythropoïèse** : On trouve qu'il y a beaucoup plus d'**enrichissement** au niveau du gène qui est exprimé (gène du Rc.Folate) qu'au niveau des 2 autres gènes. Au niveau du gène du **récepteur folate**, il y a beaucoup **d'histones H3 acétylées** au **début de l'érythropoïèse**.



2. À la fin de l'érythropoïèse : On découvre alors qu'il y a beaucoup d'**enrichissement** au niveau du **gène bêta globine**. Cependant, il n'y a plus d'**enrichissement** au niveau du **récepteur folate**. Au niveau du gène bêta globine, il y a beaucoup **d'histone H3 acétylées** en **fin d'érythropoïèse**.
3. Dans un neurone : c'est le même principe : au niveau du **récepteur olfactif** il y a un **enrichissement d'histones acétylées** contrairement aux 2 autres gènes qui ne sont **pas exprimé**, et où il n'y a **pas d'enrichissement**.

Ces résultats suggèrent donc que **les modifications post traductionnelles des histones régulent l'expression des gènes** + 🧑 + .

🌟 On peut établir des **règles générales** qui vont nous permettre d'appréhender l'**activation** ou l'**inactivation** d'un gène en fonction de sa **modification post-traductionnelle** +++ :

RÈGLES GÉNÉRALES :

Transcription active	Transcription inactive
Chromatine hyperacétylée	Chromatine hypoacétylée
Chromatine méthylée en K4 (H3K4 -> Histone 3/Lysine 4)	Chromatine méthylée en K9 (H3K9 -> Histone 3/Lysine 9)

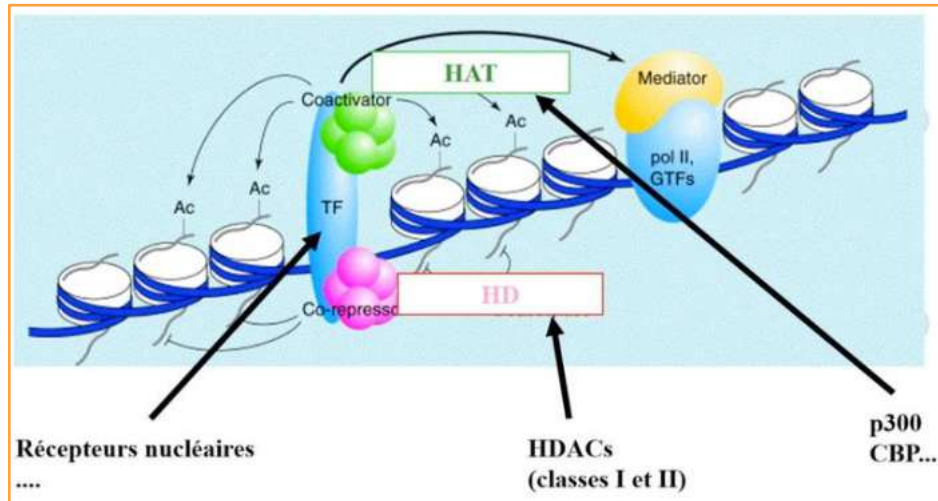
! TUT'WARNING !

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)

Il y a donc une relation entre les **modifications post-traductionnelles** des histones et l'**expression génique** = **niveau de transcription des gènes**.



→ Revenons donc à nos **fameux** petits 🥰 **nucléosomes d'amour** 🥰,



Pour que nos **nucléosomes** soient compatibles avec l'**expression génique et la transcription**, il faut qu'ils soient 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 🧑🧑

CO-ACTIVATEURS ET CO-RÉPRESSEURS :

☀ Les protéines **HAT** et les **HDAC** agissent souvent ainsi en tant que **co-activateurs** ou **co-répresseurs** en interagissant avec les **facteurs de transcription ++** 🧑🧑 :

CO-ACTIVATEURS	CO-RÉPRESSEURS
Ils présentent une activité HAT : ils favorisent la transcription en modifiant la structure locale de la chromatine +++ (par ajout de charge (-) induisant une répulsion électrostatique 🧑), permettant son accessibilité aux éléments de transcription .	Ils présentent une activité HDAC : ils défavorisent la transcription en modifiant localement la structure de la chromatine qui devient moins accessible aux éléments de transcriptions .

Mais comment cette information est lue par la cellule ? On sait que le code génétique est lu et traduit par le ribosome mais qu'en est-il du code histone ? Comment est-il traduit ?

EST LA RÉPONSE EST...

→ Ce sont des **protéines** présentes dans le **noyau** qui vont reconnaître spécifiquement ces **modifications** et les interpréter. C'est donc en **régulant les interactions** entre les **queues des histones** et ces **protéines, non-histone**, que le **code histone** pourra être **traduit ++**. Les **modifications post-traductionnelles** des histones peuvent donc réguler les **interactions** entre nucléosomes et certaine catégories de protéines 🧑🧑🧑



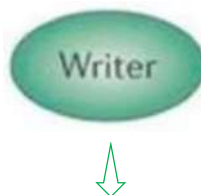
Modifications post-traductionnelles	Protéines de reconnaissance	Actions de ces protéines
Lysine (K) <u>acétylée</u>	Protéines à <u>bromodomaines</u>	Recrutement de facteurs de transcriptions pour les <u>zones hyperacétylées</u>
H3K9 et H3K27 <u>méthylés</u>	Protéines à <u>chromodomaines</u> : - <u>HP1</u> pour K9 - <u>Polycomb</u> pour K27	HP1 forme l' <u>hétérochromatine</u> . La méthylation en K9 ou K27 induit la <u>formation d'hétérochromatine</u>
H3S10 (sérine 10) <u>phosphorylé</u>	Protéines à domaine <u>« 14-3-3 »</u>	Facilite l' <u>acétylation</u> et l' activation de l'expression des gènes en réponse au stress
H4K20 <u>diméthylée</u>	Protéines à domaine <u>Tudor</u>	<u>Réparation de l'ADN</u>

On se trouve donc dans ces systèmes plutôt complexe mais qui ont tous, au final, la même **logique** :

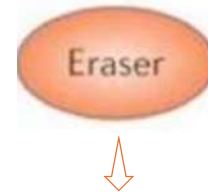
✳ On a trois catégories de protéines qui permettent **l'organisation de l'expression des gènes +++** :



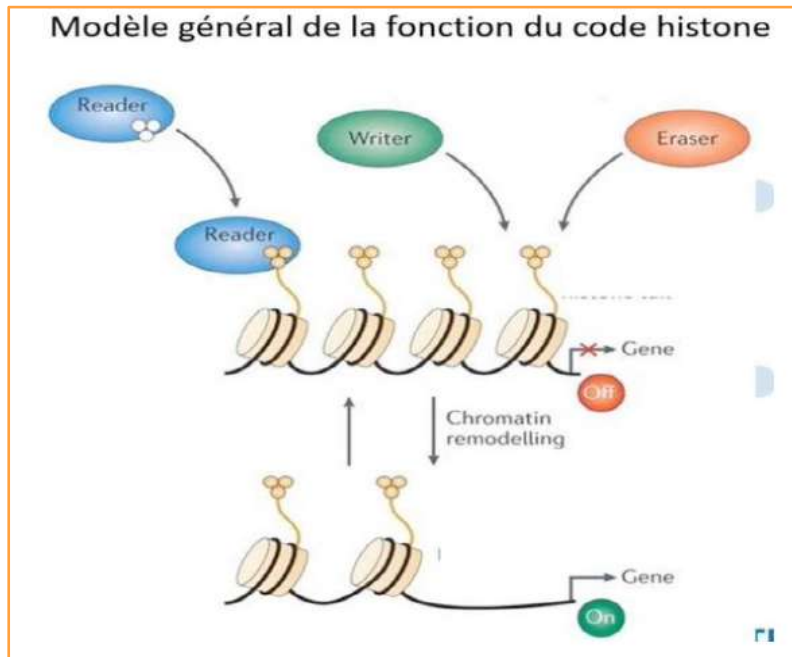
Les « readers » celles qui **lisent le code**. (Ex : protéines à domaine Tudor, chromodomaine...)



Les « writers » celles qui **écrivent le code**. (Ex : enzymes de type HAT, HMT...)



Les « erasers » qui **effacent le code**, réaction reverse. (Ex : déméthylase...)



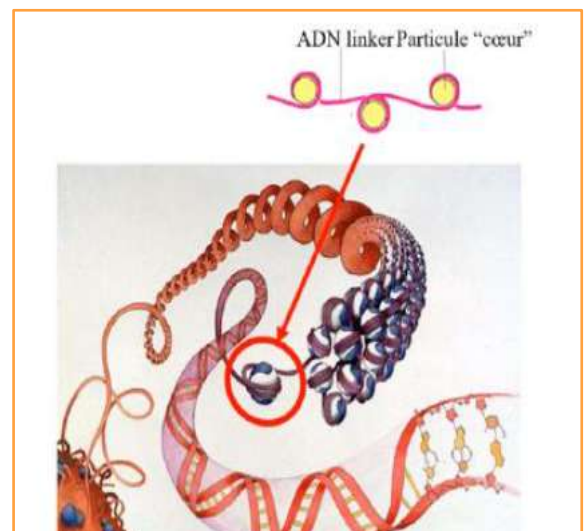
✳ C'est l'ensemble de ces catégories de **protéines de fonctions**, qui fait que localement la **séquence promotrice** d'un gène va être **acétylée**, et éventuellement soumise au remodelage de la chromatine afin de permettre au gène d'**être activée** sous la forme **ON**

B) La Fibre Nucléosomale

Nous allons 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** :

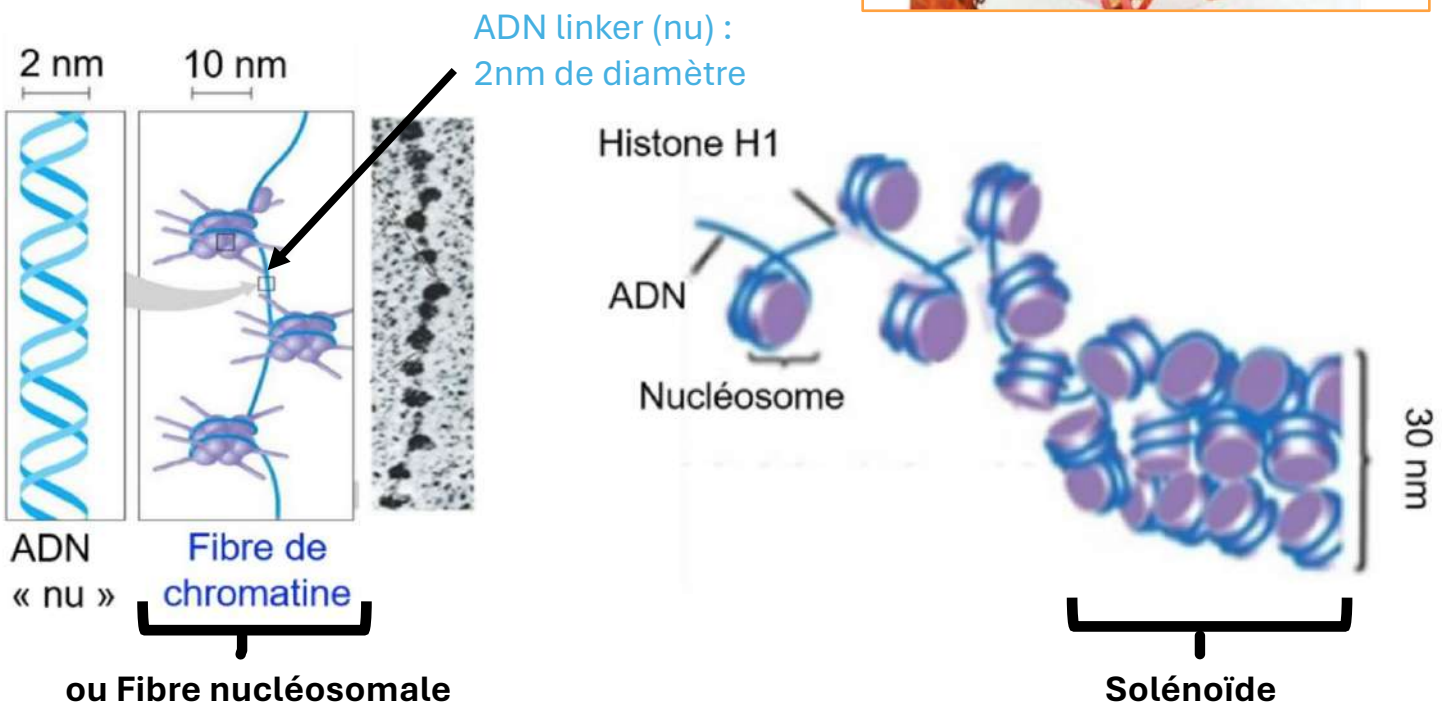
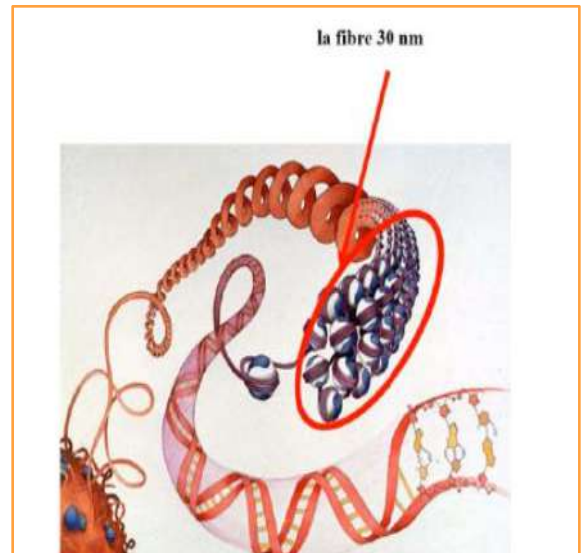
Fibre de 11nm : Fibre nucléosomale

- Ce premier niveau correspond au **nucléosomes** (vu précédemment) et à leur assemblage en une **structure en collier de perles** de **11 nm de diamètre**. *(ou comme vous l'avez vu en Biomol environ 10nm)*
- Cet assemblage est assuré par l'**ADN linker** reliant **2 nucléosomes voisins**, ce qui constitue une **conformation OUVERTE de l'ADN ++**



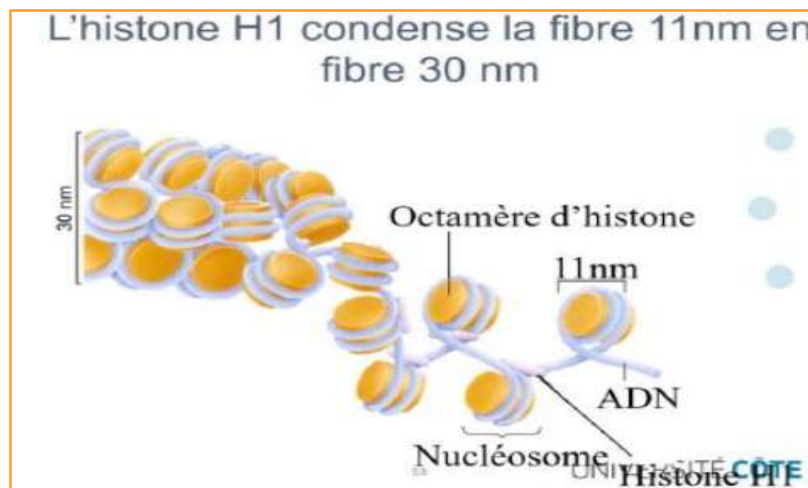
Fibre de 30 nm : Solénoïde

- **Niveau de condensation supérieur** : Le **solénoïde** constitue une fibre de **30 nm** correspondant à **un peu moins de 3 nucléosomes** ($3 \times 11 \text{ nm} = 33 \text{ nm}$)
- **L'histone H1 +++** permet la **transition conformationnelle** de la fibre nucléosomale vers ce solénoïde = **conformation FERMEE de l'ADN ++**



→ La **transition** entre la fibre 11 nm et 30 nm fait intervenir une **autre histone** :

H1 ++



⚠ L'Histone H1 ne fait pas partie de l'octamère d'histone du nucléosome ⚠
(H2A, H2B, H3 et H4) 🧑🧑🧑

C'est bien beau tout ça MAIS ce qu'il faut savoir c'est que cette fibre peut être soumise à des modifications locales notamment par :

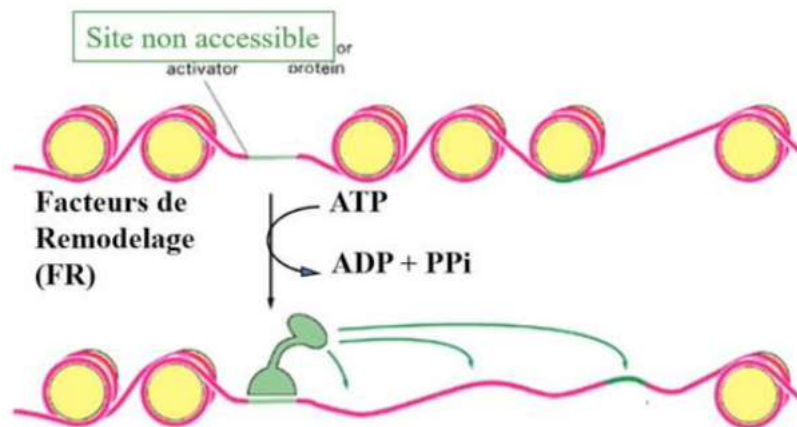
LE REMODELAGE DE LA FIBRE NUCLÉOSOMALE

☀ 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*)

☀ On a besoin d'enzymes, de facteurs de remodelage (FR) +++, des grosses machines **très consommatrices d'énergie**, qui rendent l'**ADN accessible** aux facteurs de transcriptions (FT) et donc d'énergie également issu de l'hydrolyse de l'ATP.

☀ Ils vont être capables de créer localement des zones sans nucléosomes, totalement **dénudées** (en les déplaçant grâce à leur domaine ATPase qui va hydrolyser l'ATP) pour permettre au **FT de se placer**.

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

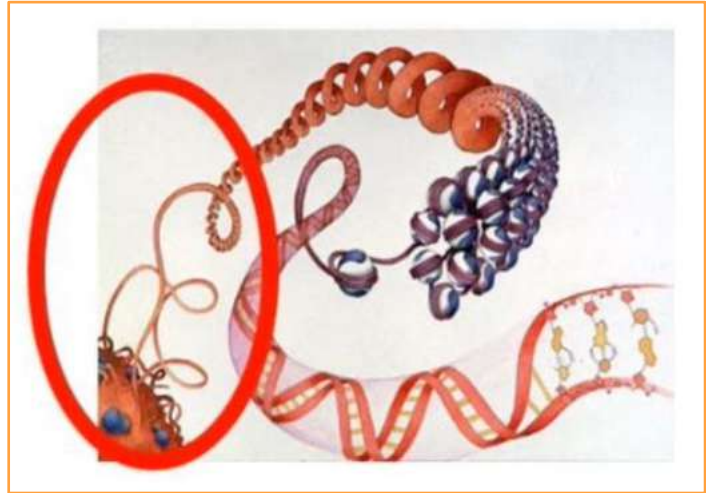


Description du schéma → Ici on voit une séquence promotrice avec un site d'activation de la transcription qui est **coincé entre les nucléosomes** donc inactif du fait de cet chromatine répressive.

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

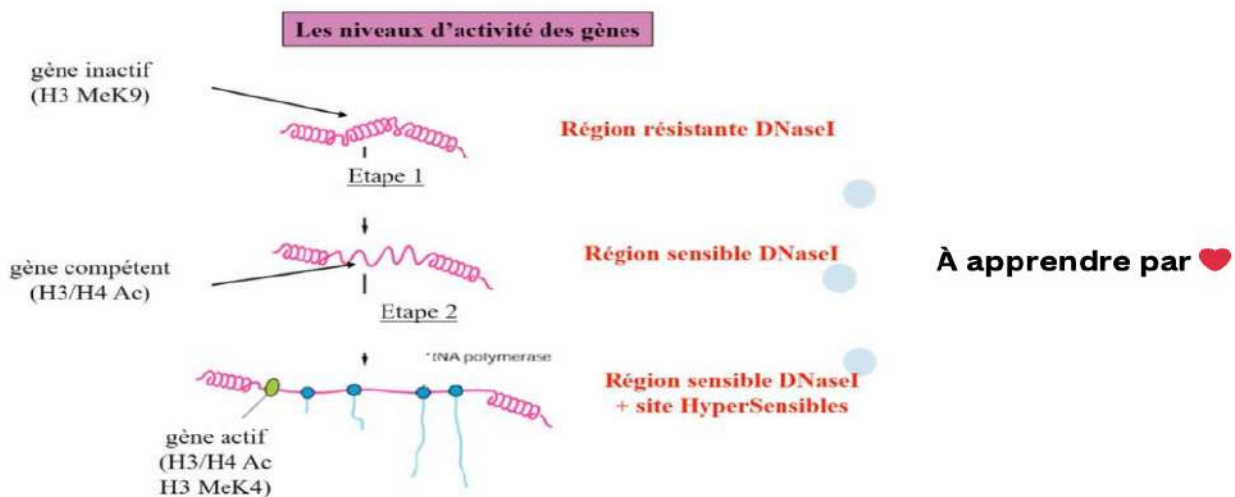
C) Domaines et Boucles

☀ On passe encore à un autre niveau : la **fibres chromatinienne** va s'organiser en **boucles** et **domaines**. Nous voyons sur ce 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** (comme le **solénoïde**).



MAIS QUELS SONT LES DIFFÉRENTS NIVEAUX D'ACTIVITÉS DES GÈNES ???

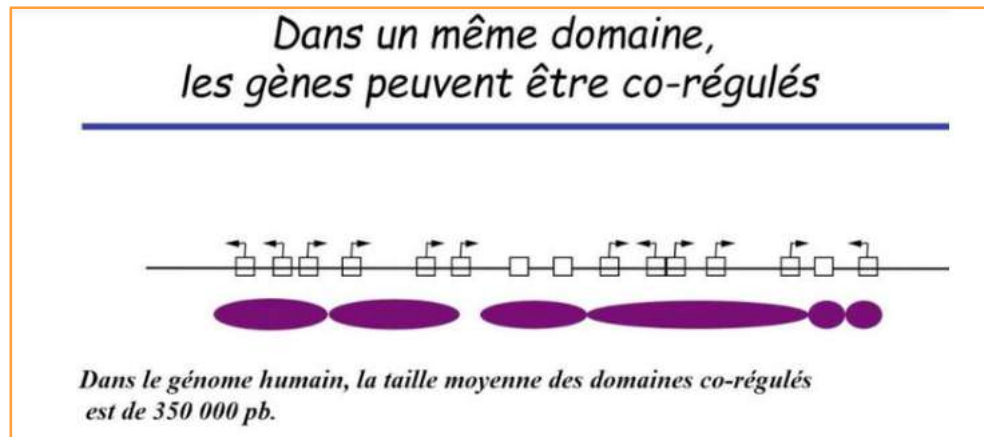
À chacun de ces **niveaux de structure de la chromatine** correspond des **niveaux d'expression**, de **transcription des gènes** correspondants :



Niveau d'activité	Gène inactif (OFF)	Gène compétent	Gène actif (ON)
Transcription	Transcription inactive	Transcription inactive → gène entre l'activation et l'inactivation	Transcription active
Modifications importantes	Méthylation H3K9 induisant une condensation de la chromatine	Acétylations H3/ H4 👤👤	Acétylation H3/H4 + une méthylation H3K4 +++ 👤👤
Sensibilité à la DNase	Résistante → trop condensée 👤👤	Sensible	Sensible et sites hypersensibles (ex : enhancer)

☀ Ce qu'il faut savoir c'est que c'est vraiment la **méthylation de K4 de l'Histone H3** qui déclenche l'activation du gène là où la **méthylation de K9 ou K27** induisent l'interaction avec les protéines à chromodomaines comme **AP1 ou Polycomb** et donc la mise en place d'**hétérochromatine** → **FERMETURE de la conformation**

LES DOMAINES CO-RÉGULÉS :



☀ Dans un domaine **donné**, les gènes peuvent être **co-régulés** (co-exprimés/réprimés) = c'est ce qu'on appelle les **domaines de co-régulation +++**.

☀ En effet, les **gènes ne sont PAS régulés de manières indépendantes ! +++**. 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 +++**. Dans le génome humain la **taille moyenne** des domaines co-régulés, est de **350 000 pdb** (*comme inscrit sur la diapo du prof ci-dessus*)

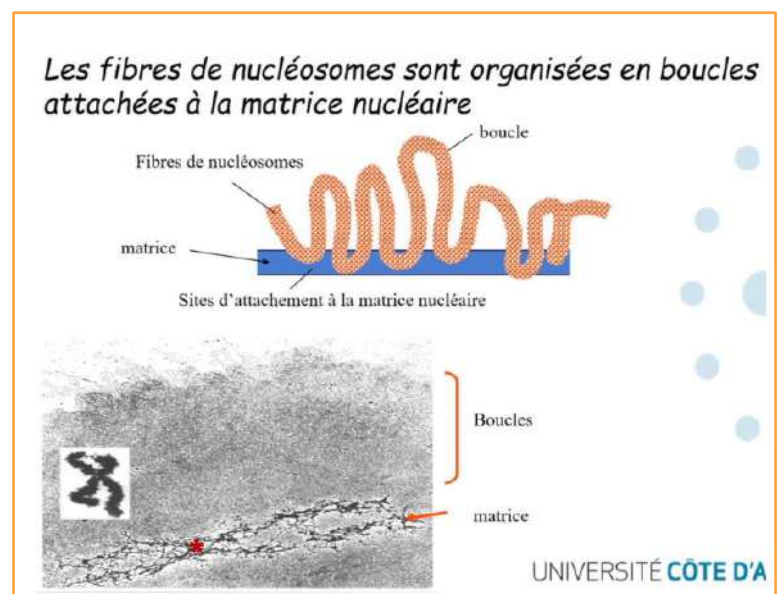
☀ Cela veut dire qu'il doit y avoir un **niveau d'organisation** qui fait que ces domaines ont leur **structure propre**. Elle à été découverte après une **expérience historique** des années 80. (*osef un peu nan ?*)

Observation d'un chromosome métaphasique :

Hypothèse :

Il doit y avoir des structures au-delà du nucléosome, des **super-structures** de la chromatine qui sont indépendantes du nucléosome pour pouvoir **condenser** et rendre **tout le matériel génétique fonctionnel**.

→ Alors le chercheur, pour valider cette hypothèse, à **retirer** tous les **nucléosomes** afin de potentiellement observer ces autres niveau de structuration. Il a donc pris des **chromosomes métaphasiques** dont il a essayé d'enlever les histones dans des conditions expérimentales particulières.



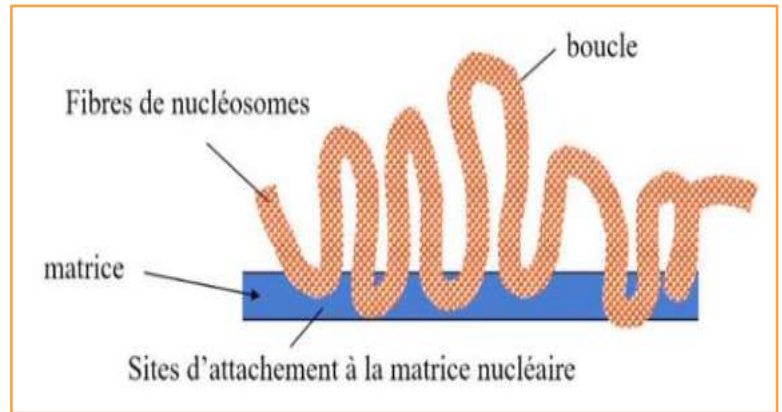
* Chromosome métaphasique



✳ En ME, nous observons donc un **K (=chromosome) métaphasique**. On voit très bien cette **partie fibreuse** qui correspond à la **matrice = Chromosome** (au centre, foncé) et les **boucles d'ADN** (en gris, tout autour). Finalement, ces **boucles d'ADN émanent de la matrice centrale +++**

CONCLUSION :

On sait désormais que 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 +++**. D'ailleurs cela est le cas également en **interphase** (entre deux mitoses), on a alors :



- Une **structure fibreuse** dans le noyau = **matrice nucléaire** → qui va posséder des **sites d'attachement** auquel la chromatine va s'attacher afin de former nos **boucles+++** (domaines co-régulés)
- Un **fibre nucléosomale** (de chromatine) qui s'y attache à des **endroits précis** (notamment là où se trouve des **insulateurs**, pas de panique on voit ça juste après petit spoil désolé...)

✳ Le modèle en boucle est donc une **matrice** sur laquelle l'**ADN va s'accrocher** et former des **boucles** → une **boucle** = un **domaine de co-régulation**. Cela forme donc une structure **au-delà du nucléosome**.

MAIS DE QUOI EST FAITE CETTE MATRISSE ✗ (ca c'est presque mon prénom)
MATRICE ✓???

✳ On connaît aujourd'hui un certain nombre de facteurs qui interviennent dans la structuration de la **matrice nucléaire**, qui n'est **PAS unique** mais **complexe, diverse, dépendante** des cellules et qui aura toujours comme **propriété d'organiser le génome en boucles de chromatines** :

- **Lamina nucléaire** (filament intermédiaire)
- **Protéines du réseau fibreux du nucléosquelette** : actine, lamine A/C, Numa
- **Complexes nucléoprotéiques**

→ Ces différentes protéines sont essentielles à la **régulation de l'expression des gènes**

Intéressons-nous maintenant à la chromatine **fonctionnelle** (avec ses **éléments de contrôles distaux** : **enhancer, silencer, insulateurs++++**)

Sur cette figure (page suivante), on passe d'une régulation à **1 dimension** à une régulation à **2 dimensions** grâce aux **boucles**.

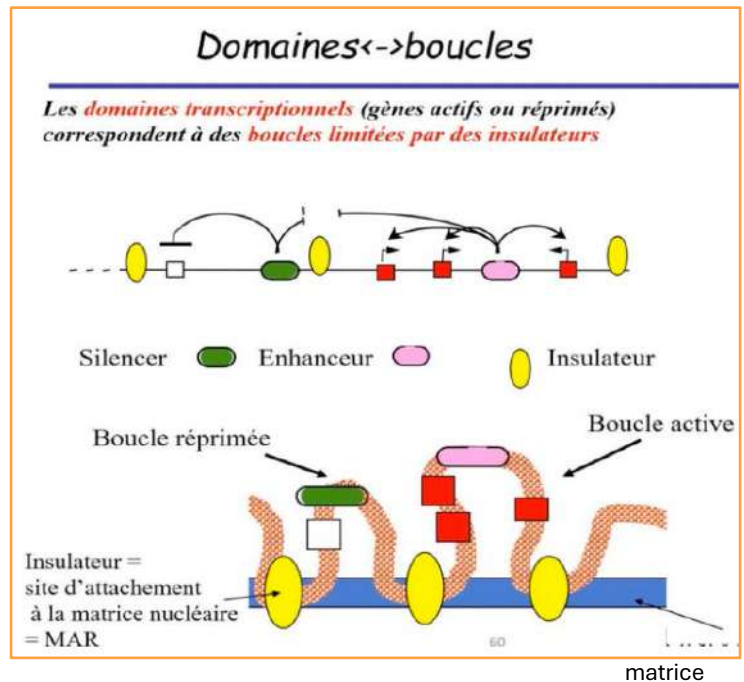
La **matrice** isole des **domaines** qui correspondent aux **boucles**. Chaque **boucle** correspond à des gènes qui sont soit **exprimés** soit **réprimés** du fait de leur proximité avec des éléments **enhancers** ou **silencers**.

Au niveau des régions **insulatrices** (forme **ovale jaune** sur le schéma) il y a des **sites d'attachement à la matrice nucléaire = MAR** (Matrix Attachment Regions). Ce sont des **éléments frontières** qui séparent **physiquement** les boucles.

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

✳ Ces **insulateurs** vont **protéger** les gènes des éléments **silencers** ou **enhancers** présents dans les **boucles** d'à côté et **segmenter les chromosomes en domaines indépendants de régulation de la transcription +++** 👤 👤 👤

✳ Donc les **domaines transcriptionnels** (gènes actifs ou réprimés) correspondent aux **boucles limitées par les insulateurs +++**. Ainsi, il peut y avoir une **boucle activée** par un **enhancer** d'un côté et de l'autre une **boucle réprimée**, par un **silencer**.

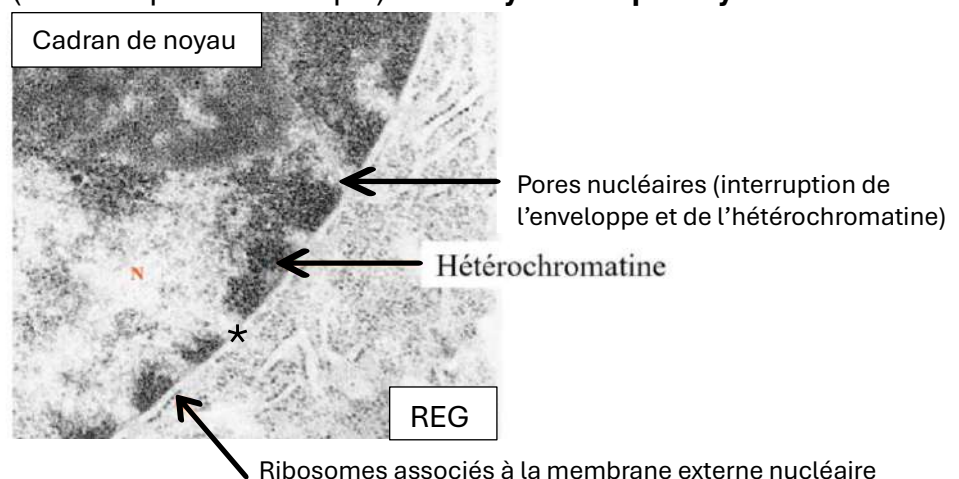


D) Hétérochromatine :

Tout d'abord il faut savoir que la **chromatine** correspond à **différents niveaux de condensation** de l'ADN dans le **noyau**. C'est lié à l'état du **cycle cellulaire** comme la **mitose** et aussi à l'**expression des gènes**. Certaines régions de nos chromosomes sont particulièrement **plus condensées** que d'autres régions de manière permanente. Ces régions particulières dont on a déjà parlé, en **DAPI** très dense, s'appelle l'**hétérochromatine**.

Voici une image en **ME** (microscopie électronique) d'un **noyau d'hépatocyte de rat** :

* double membrane de l'enveloppe nucléaire



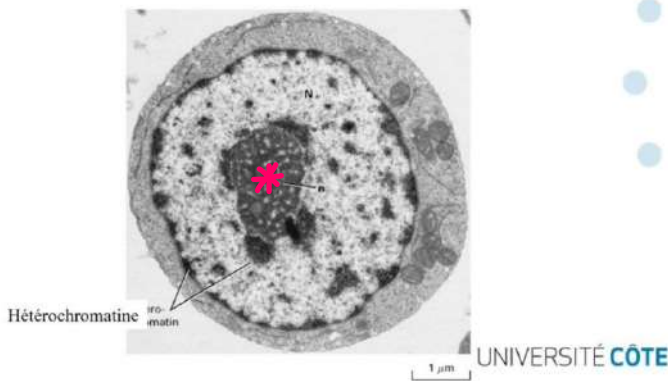
Description :

→ La partie gauche un peu sombre avec des zones délimitées par une double membrane, c'est un **cadran de noyau**. À droite on reconnaît le **REG** (Réticulum Endoplasmique Granuleux) avec les **ribosomes** qui sont **associés**, et certains **ribosomes libres**. On voit la continuité entre l'**enveloppe nucléaire** et le **RE** et une petite flèche (en bas) qui montre certains **ribosomes** associés à la **membrane externe de l'enveloppe nucléaire**.

→ À l'intérieur du noyau, par une coloration particulière, on voit des zones **extrêmement denses aux électrons** et plus c'est condensé plus c'est **dense**. Les **zones noires** correspondent à l'**hétérochromatine**. Vous voyez très bien que cette hétérochromatine est essentiellement localisée sur l'**enveloppe nucléaire**, tapissant plus spécifiquement sa face interne, en contact direct avec la **lamine** des **filaments intermédiaires** (pouvant s'associer à la **chromatine + 1**).

→ On voit aussi qu'il y a des sortes de canaux entre ces domaines d'**hétérochromatine**, ils correspondent à une interruption de la **double membrane** et de l'**hétérochromatine** (discontinuité). Ce sont les **poros nucléaires**. Ces zones permettent l'**échange** dans les 2 sens entre le **noyau** et le **cytoplasme**.

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



✳ Sur cette image en ME, 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** (zones foncées).

PAR DÉFINITION :

L'**hétérochromatine** correspond à une forme **extrême de chromatine hyper-condensée** (tout la chromatine **est condensée** mais celle-ci de façon encore **plus importante**), 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** (*afin de protéger l'ADN avant la ségrégation et ainsi éviter des lésions de l'informations génétiques*), pour permettre de **ségréger le matériel génétique** mais il y a certaines portions du chromosome qui sont déjà **hypercondensées** (*on parle d'hétérochromatine constitutionnelle → celle qui composent notamment les télomères et les centromères*) et qui ne se condensent **PAS 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+++



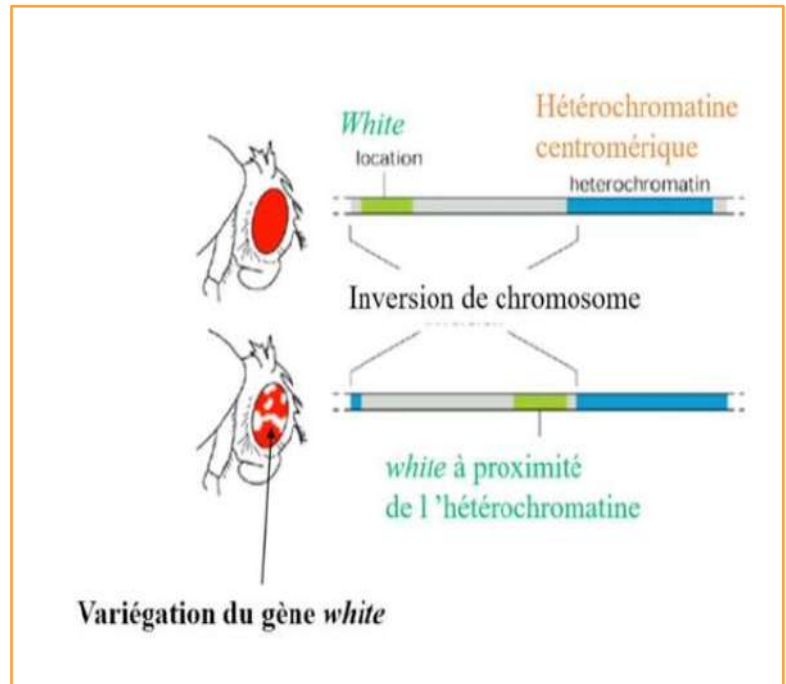
Un Effet de position “Historique” = **PEV** = **P**osition **E**ffect **V**ariation :

On a beaucoup appris en étudiant ces **effets de position** pour le **contexte chromosomique**, ce sont des expériences qui datent de la première moitié du 20ème siècle. Un outil de choix était les **mouches**, notamment la **drosophile**. Les généticiens génèrent des mutants par **irradiation**.

Parmi les mutants obtenus, il y a en un particulier avec les yeux **variégués**, c'est à dire, aux yeux rouges mais possédant des **zones blanches**. Si vous voyez une tête avec un **œil normal**, c'est la drosophile **sauvage** qui a les yeux **rouges**.

✳ Les **généticiens** de la drosophile ont donc 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** +++.

✳ Le **gène White** est localisé à l'extrémité du **chromosome 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 son contexte chromosomique a été modifié par une **inversion de tout un bras du chromosome** (par irradiation), et s'est retrouvé à proximité du **centromère** qui est une **grande région d'hétérochromatine constitutionnelle**.



✳ Ils ont l'habitude d'appeler les **gènes** comme le **phénotype muté**. Quand vous n'avez pas le **gène** qui code pour la **couleur rouge**, vous avez des **yeux blancs**, et ce gène s'appelle donc **White**. EN GROS, le gène **White** code pour une **protéine** qui va déterminer la **couleur rouge des yeux de drosophile** +++ (à bien comprendre). 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**.

MAIS COMMENT SE FAIT-IL QUE LE GÈNE NE SOIT PAS RÉPRIMÉ DANS TOUTES LES CELLULES, ALORS QUE CELLES-CI POSSÈDENT TOUTES L'INVERSION ??

→ Parce qu'il y a une **variégation des effets de position** = **PEV ++**

On peut la considérer comme une sorte de **balance entre les cellules ON et les cellules OFF** pour un gène donné qui est localisé de la même façon. Ici de manière “*pathologique*”, à côté de l'**hétérochromatine centromérique** (*après inversion du bras du chromosome X et donc après irradiation*). C'est une **observation capitale**, c'est tout simplement **le goat de PEV**

Pour comprendre... ce qui se passe c'est la **chose suivante** :

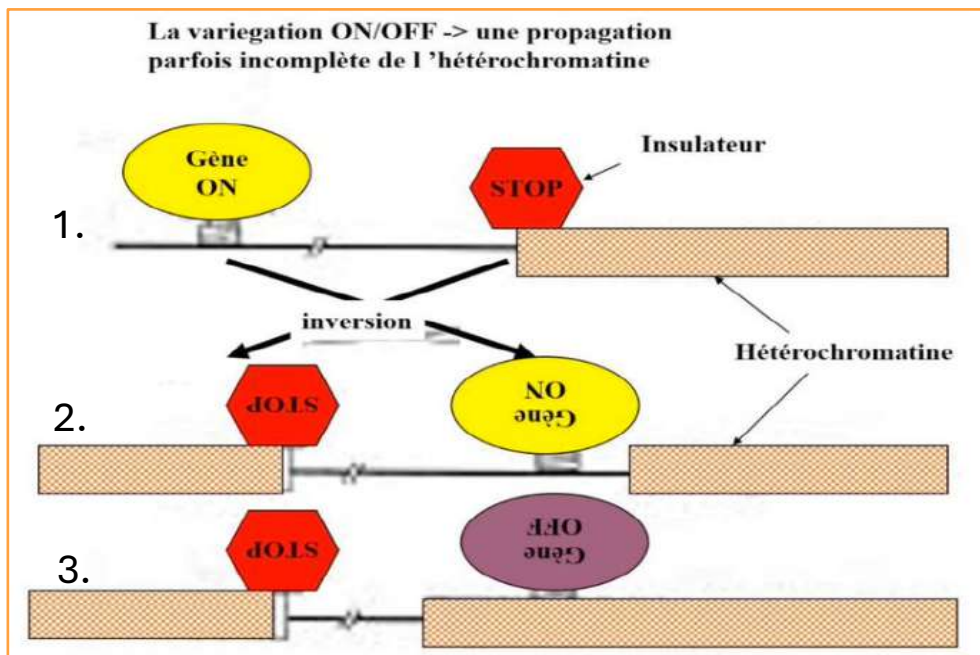
1. En haut la situation **normale**, le **gène White ON**, et les **yeux rouges**. Il y a l'**hétérochromatine** avec l'**insulateur (STOP)** qui empêche cette **hétérochromatine** de se propager et donc de **réprimer l'expression des gènes ++**

Quand vous **inversez le chromosome**, vous avez le **gène White** qui va se retrouver à **proximité** d'**hétérochromatine**. **2 situations** sont alors possibles :



2. 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**, il n'a pas **condensé** le **gène White** c'est une décision qui a été prise au cours du **développement** de certaines cellules des yeux.
3. Dans d'autres cellules, comme **l'insulateur n'est pas là**, **l'hétérochromatine va se propager** et **réprimer l'expression du gène White**.

Les cellules dans lesquelles le **gène White** est réprimé vont être blanches MAIS il ne l'est pas dans toutes comme on l'a vu précédemment dans **les 2 situations** ci-dessus et donc cela explique l'effet "**variégué**", de certaines cellules qui sont **blanches** ou **rouges**

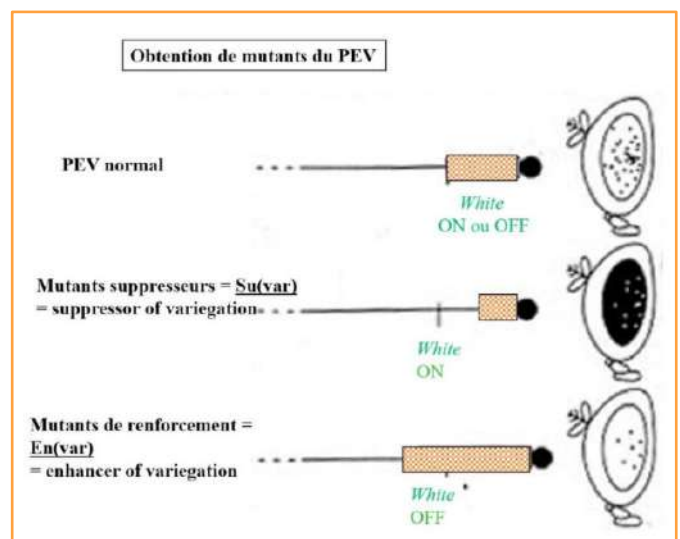


→ Sans rentrer dans les détails, on peut faire des **mutations secondaires** :

✳ En haut vous avez un **œil de drosophile**, le **noir** sur le schéma c'est **rouge** dans la réalité et le **blanc** c'est le **blanc**. Vous partez des yeux "**variégués**"

✳ Alors vous allez soit **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**.

✳ Ou vous allez chercher des drosophiles encore **plus "variégués"**, encore **plus blanches** ce sont les mutations **enhancer de variégation En(var)** qui vont définir des **gènes** qui vont favoriser l'**effet de l'hétérochromatine** et par conséquent la **répression génique**.



Alors là petite précision avant de continuer si je vais vous perdre, donc petit récap tranquille juste pour vous les gars !

TUT'RECAP

-Rôle des gènes à l'état physiologique

-> **Les gènes Su(Var)** sont des gènes codant pour des protéines favorisant la propagation de l'hétérochromatine donc qui sont responsables d'une augmentation de la variégation lorsqu'ils ne sont pas mutés

-> **Les gènes En(Var)** sont des gènes codant pour des protéines favorisant la mise en place de l'euchromatine (conformation ouverte) donc qui sont responsables d'une diminution de la variégation lorsqu'ils ne sont pas mutés

Légende :

rouge : désactivation du gène

vert : activation du gène

-Rôle des gènes à l'état de mutations

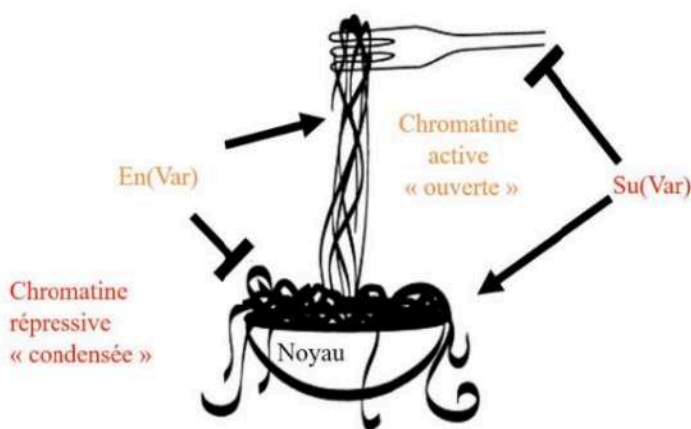
-> **Les gènes Su(Var) mutés** vont être responsables de la **suppression de la variégation** par **mutations gains de fonctions** et **désactivation** des protéines nécessaires à l'établissement de l'**hétérochromatine**.

-> **Les gènes En(Var) mutés** vont être responsables de l'augmentation de la variégation par mutations **enhancer** et **désactivation** des protéines nécessaires à l'établissement de l'**euchromatine**.

Pour rappel : les généticiens appellent les gènes par le nom du phénotype muté d'où **Su(Var)** et **En(Var)**

Antagonisme Su(var)/En(var)

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



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

☀ Imaginez que vos **Chromosomes** soient un plat de **spaghettis** et que votre noyau soit votre **assiette**.

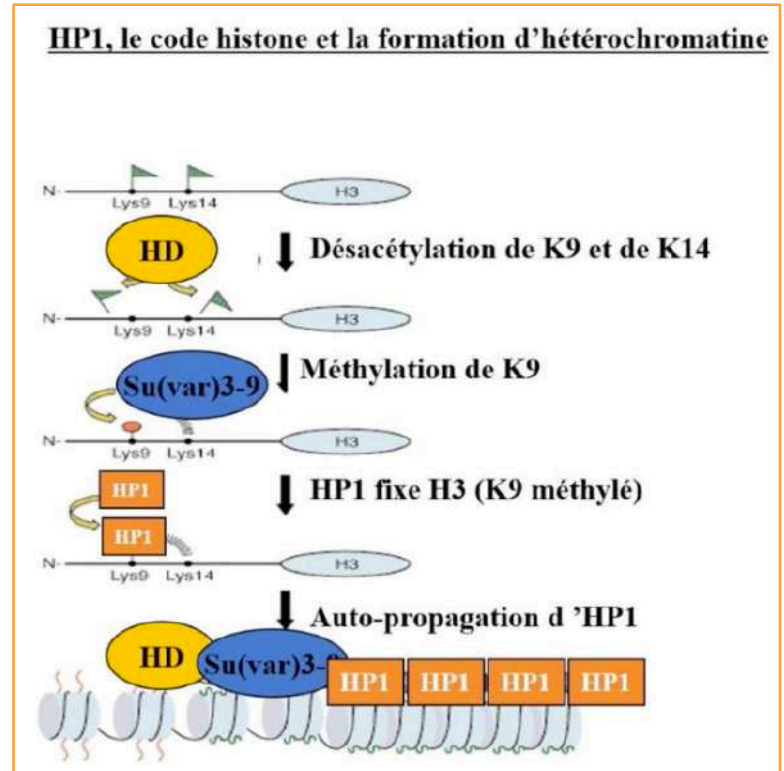
☀ Les spaghettis, au sein du noyau, sont complètement **entremêlés** (**hypercondensés** = **hétérochromatine**) c'est un peu compliqué à manger comme ça, il vous faut donc une **fourchette** pour démêler ce plat de **spaghettis**, et l'**ouvrir** et c'est exactement ce que font les **gènes En(var)** (**ouverture chromatine**) tandis que les **gènes Su(var)** (**fermeture chromatine**) vont contribuer à rendre les spaghettis **compacts** et **indigestes**. Évidemment à l'état physiologique (donc sans mutations)...

Les protéines En(Var) et Su(var) vont **contrôler++** l'état de **condensation** d'une structure hypercondensées = l'**hétérochromatine**

Protéines En(var)	Protéines Su(var)
Ce sont des protéines de l'euchromatine , actives pour la transcription = facteurs de transcription , HAT , des histones acétyltransférases	Ce sont des protéines de l'hétérochromatine = HP1 , Su(var)3-9 → HMT , des histones désacétylases (HDAC)

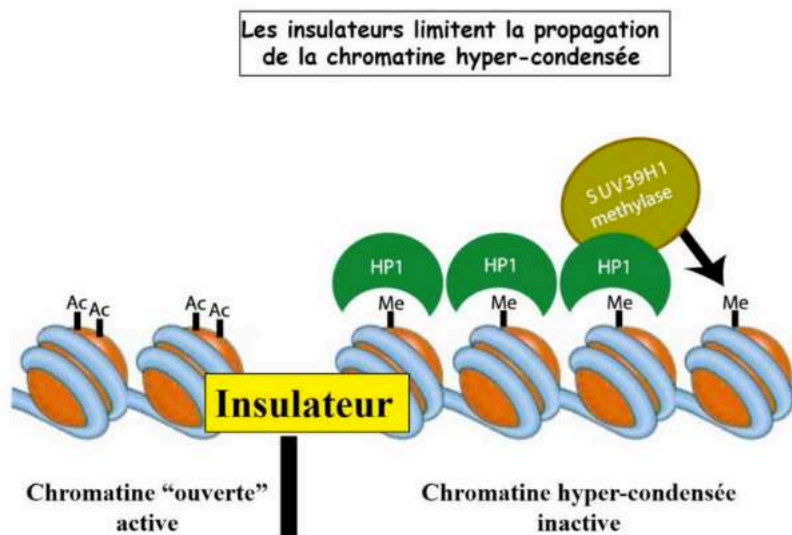
COMMENT L'HÉTÉROCHROMATINE SE PROPAGE-T-ELLE ?

- ✳ Au niveau de l'**histone H3** (initialement acétylée), il y a tout d'abord une **série de réactions**.
 - ✳ D'abord on a des **désacétylations** (par une **HDAC**) de **K9** et **K14** permettant ensuite la **méthylation** de **K9** de l'**histone H3** par une **protéine Su(var) 3-9 (=Méthylase)**.
 - ✳ Une fois que cette **lysine H3** est **méthylée** elle va servir de **site de fixation** pour les **protéines à chromodomaine**, notamment la protéine **HP1**, qui va donc s'y fixer et lire cette méthylation.
 - ✳ **HP1** par elle-même va enfin attirer d'autres protéines **HP1** qui vont **s'auto-propager** en bas, de gauche à droite, par l'action combinée de l'**histone désacétylase HDAC** et de **Su(var) 3-9**
- **Propagation de l'hétérochromatine**



Dans le cas de l'effet de position, il n'y a **PLUS d'insulateurs**, donc le gène White va être, pour certaines cellules, envahi par l'**hétérochromatine** qui va **bloquer** sa **transcription**.

Dans la vraie vie, on a une structure dans notre **génome** que l'on peut schématiser ainsi (sans PEV), avec un **insulateur** qui **isole** la chromatine ouverte de celle hyper-condensée :



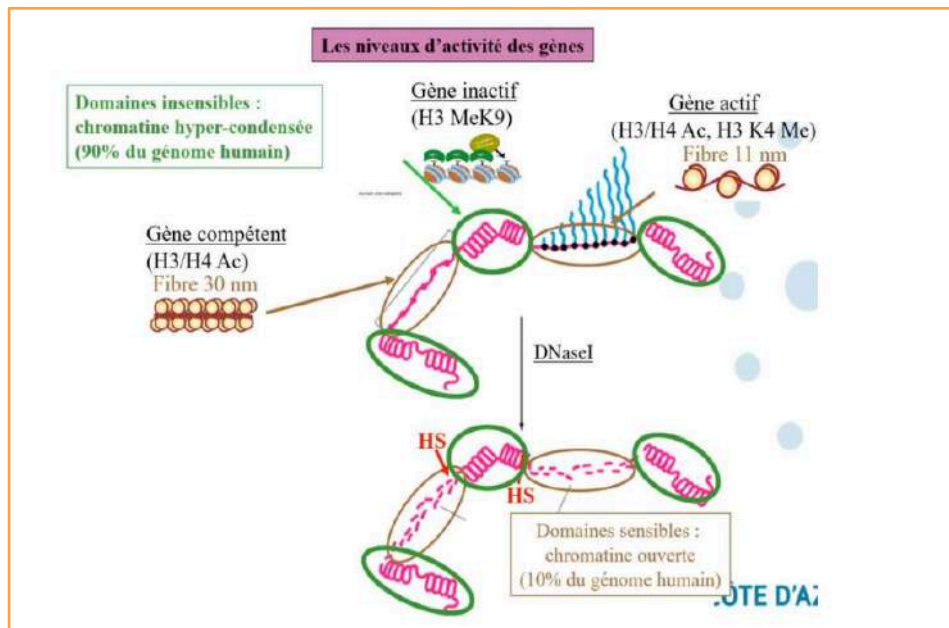
✳ Nous pouvons donc revenir à nos moutons et faire désormais le **lien** avec les **différents niveaux d'activités géniques possibles** ! Notre génome est donc composé d'une **série** de différents **domaines** expliquant l'**état de transcription**

- Des **Zones Inactives**, aux gènes **OFF**, qui sont **résistantes/insensibles à la DNase1** et caractérisée par **K9 triméthylée** qui va être donc **hypercondensées**. Cela représente **90 %** du génome humain.



- Des **Zones Compétentes**, aux gènes **compétents**, associées à la fibre **30nm** (=solénoïde) avec des **histones H3/H4 acétylées**. On n'a **PAS encore transcrit le gène +++**. **K4** n'est pas encore **méthylée**...
- Des **Zones Actives**, aux gènes **ON**, dont la **K4 de l'H3 est méthylée** en plus de posséder des **H3/H4 Acétylées +++**.

☀ Les zones **compétentes** et **actives** sont, comme dit auparavant, **sensibles** à la DNase1 car la chromatine est ouverte ! On a donc pu **superposer** les **différents niveaux d'organisation de la chromatine (=compaction)** avec les **différents niveaux de compétence** et **d'activation transcriptionnelle** des gènes correspondants.

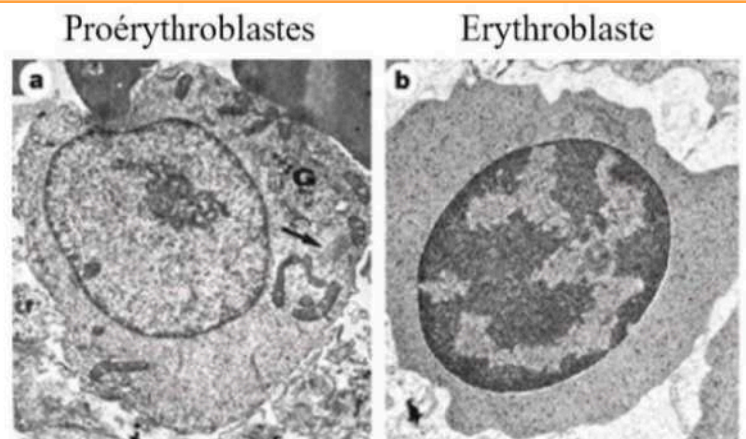


ÉTAT DE COMPACTION ET DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE :

→ Tout cela joue un rôle très important dans la **différenciation cellulaire**. Au cours de la différenciation ces **profils chromatinien de condensation** vont se **modifier** :

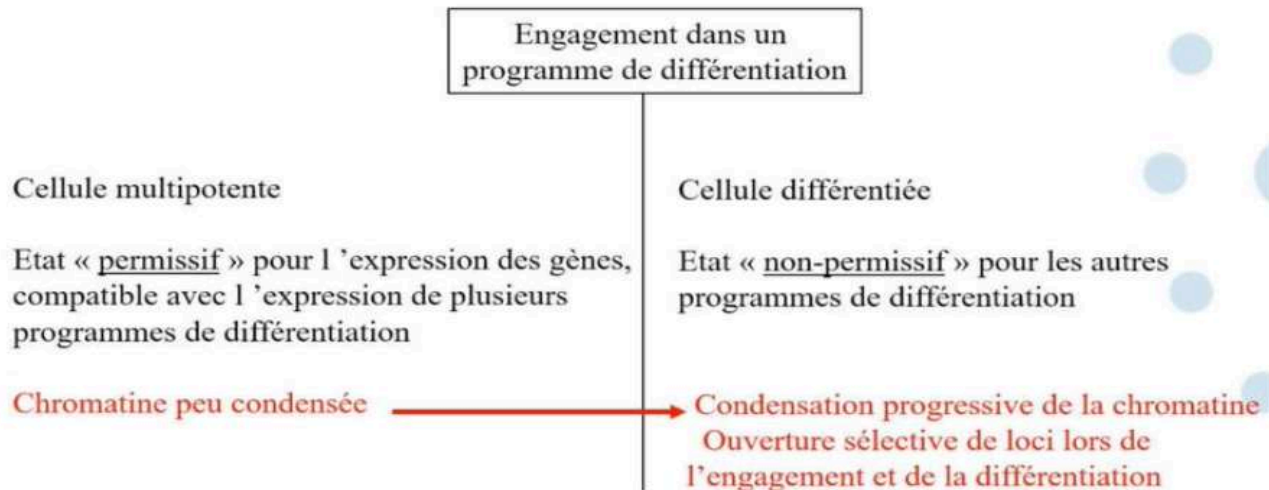
☀ Nous nous intéressons au profil de condensation de la chromatine dans les **cellules hématopoïétiques** responsable de la synthèse des cellules sanguines.

☀ Sur le **proérythroblaste** à gauche vous voyez que le **noyau (en ME)** est essentiellement **ouvert** alors que dans l'**érythroblaste**, à droite, il s'est largement **condensé**.



On part donc initialement d'un **programme transcriptionnel relativement ouvert** → permissif (cellules souches, progénitrices) qui va **progressivement**, au cours de la **différenciation**, se restreindre, pour finalement exprimer **des gènes uniquement essentiels à la fonction cellulaire +++**

Condensation de la chromatine et différenciation



✳ 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** 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** et on considère qu'une cellule **différenciée** dans le corps humain a à peu près **90% de sa chromatine** qui est **hypercondensées** laissant libres de s'exprimer les **bons gènes ouverts sur 10% dans une cellule** qui est **différenciée de manière terminale** .

On rend donc **silencieux** tous les gènes qui **servent à rien** pour un **type** cellulaire. *Ils seront donc inactifs et hypercondensés de sorte à ce que la machinerie transcriptionnelle ne puisse pas agir sur ceux-ci.*

E) Corps nucléaires et Territoires Chromosomiques :

Un autre niveau d'organisation est constitué par les corps nucléaires et les territoires chromosomiques au sein du noyau.

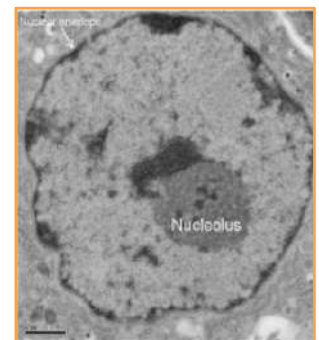
1. Les Corps nucléaires :

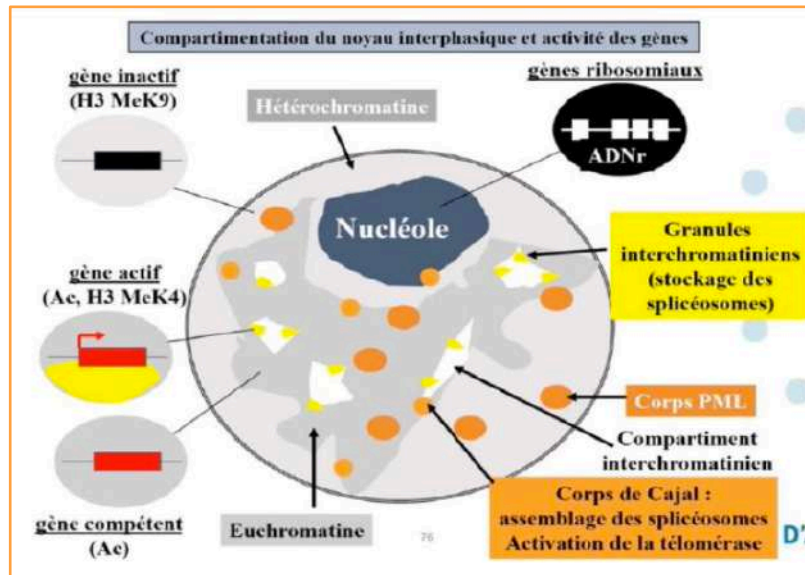
✳ Commençons par le **nucléole** : c'est une structure nucléaire **proéminente** qu'on voit facilement en microscopie conventionnelle ou à **contraste de phase** (ici ME), ce qui lui a valu son nom d' **organe** bien qu'il soit entouré d' **aucune membrane ++**

Tout cela pose des **questions fonctionnelles** :

La localisation nucléaire d'un gène (actif, compétent ou inactif) est-elle importante pour son programme transcriptionnel ?

Pour répondre à cette question il faut comprendre que le noyau n'est pas un **"sac"** où tout est mélangé de **manière indifférente** mais en réalité tout y est **extrêmement bien structuré** , où on retrouve :



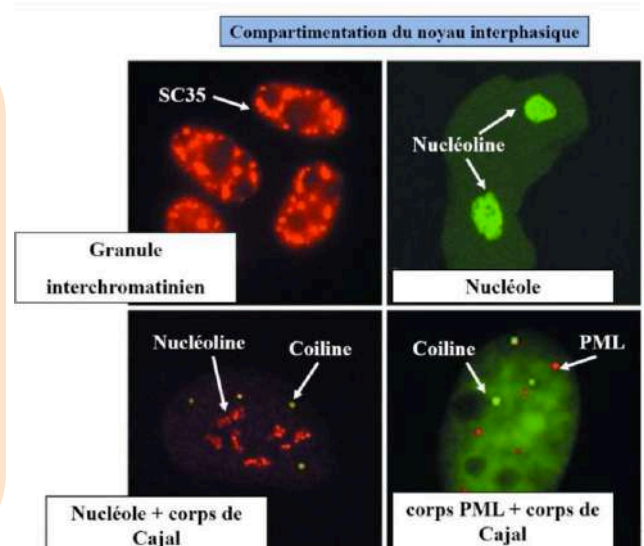


- Le **nucléole** qui est le **centre de synthèse des pré-ribosomes**, c'est un **domaine nucléaire dynamique**, son activité reflète un **équilibre** entre le niveau de **synthèse des ARNs ribosomiques** directement lié à la **croissance** et à la **prolifération cellulaire**. La **petite** et la **grande sous-unité** du ribosome seront ensuite exportés vers le **cytosol** pour la traduction (*par les pores nucléaires notamment*)
- L'**hétérochromatine** qui tapisse la partie **périphérique** du noyau
- Les corps nucléaires** :

- Les **corps PML**
- Les **granules inter-chromatiniens** qui constituent des zones de **stockage de facteurs d'épissage** (les splicéosomes) (*à côté d'eux se trouvent les gènes actifs et compétents -> chromatine ouverte*)
- Les **corps de Cajal** permettent l'assemblage des **splicéosomes** et l'activation **d'enzymes utilisant l'ARN** (comme la **téломérase**)

✳ Les **gènes actifs** et **compétents** sont localisés à **proximité des granules inter-chromatiniens**, à la surface des zones **plus condensées d'hétérochromatine**. Pour chacun de ces **corps nucléaires**, on a des **marqueurs** que l'on connaît. Voici quelques exemples en **microscopie** :

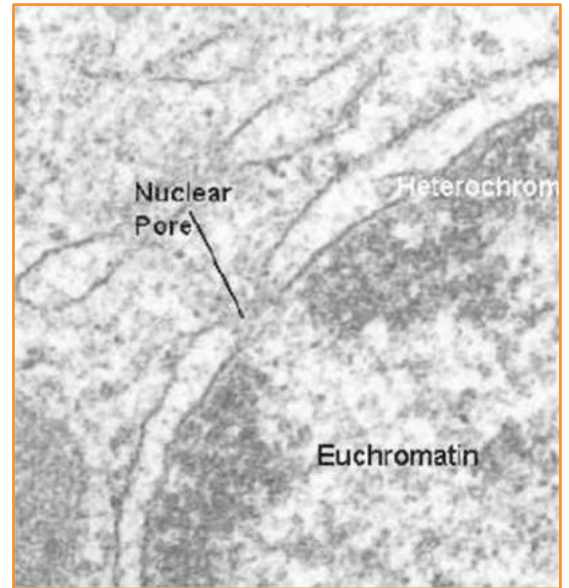
- On voit des **granules inter-chromatiniens** marqués par la protéine **riche en sérine et en arginine : SC35**
- Le **nucléole** qu'on peut caractériser en immunofluorescence grâce à la **nucléoline**
- Les **corps de Cajal** par la **coiline**
- Les corps de Cajal et les nucléoles/corps PML qu'on peut **co-visualiser** en fonction de anticorps qu'on utilise
- Les corps **PML** par la **protéine PML**



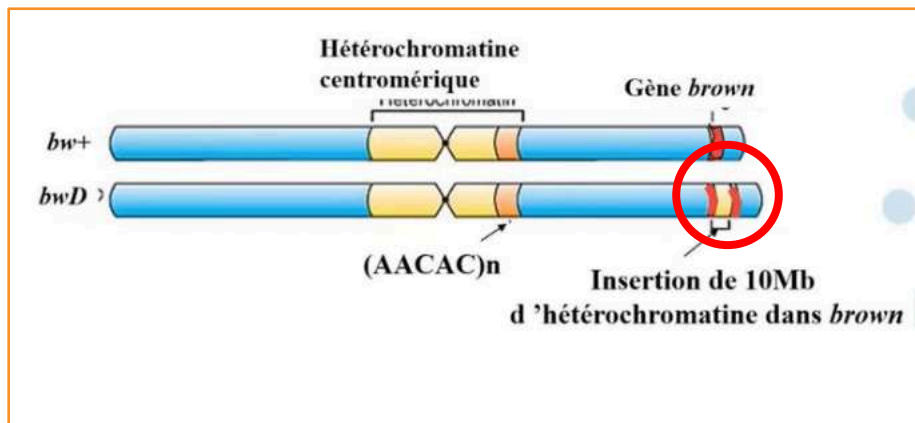
OÙ SE SITUENT LES GÈNES INACTIFS = L'HÉTÉROCHROMATINE ?

→ Vous avez un agrandissement en ME, dans lequel on retrouve plusieurs éléments :

- La **Double enveloppe nucléaire**
- Le **Pore nucléaire**
- L'**Euchromatine**
- L'**Hétérochromatine** → Celle-ci s'interrompt au niveau du **pore nucléaire** la plupart des gènes inactifs sont localisés dans **l'hétérochromatine et plutôt en périphérie du noyau**



✳ Plus tard, des expériences réalisées chez la **drosophile** ont permis de déterminer que la **position d'un gène dans le noyau, indépendamment de son contexte chromosomique**, est **essentielle pour son expression**. Ce concept est né de l'étude d'un **mutant répressif** particulier d'effet de position chez la drosophile, d'un autre gène = gène **Brown** (= la couleur de la drosophile).

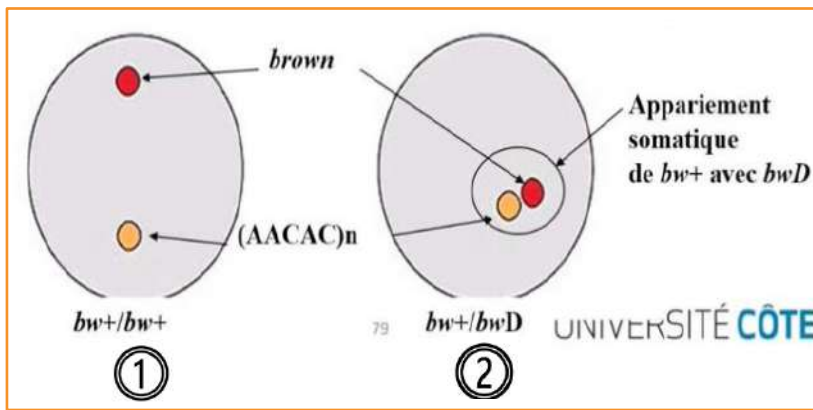


✳ On a un gène qui est soumis à un **effet de position**, qui est donc **variégué**, mais qui est **dominant**. Il s'agit dans ce cas là d'une **insertion** d'environ **10Mb d'hétérochromatine** provenant du **centromère**, qui du fait des **radiations**, a été insérée **en plein milieu du gène brown**. On se trouve dans une **situation d'hétérozygotie** comme le gène **Brown** de l'autre allèle est **parfaitement sauvage** (bw+), mais le phénotype est **mutant** (cf dominance)

• Petit point compréhension :

- le gène **brown** + est sauvage (bw+)
- le gène **brown D** est celui dans lequel on retrouve la séquence d'hétérochromatine centromérique (bwD)

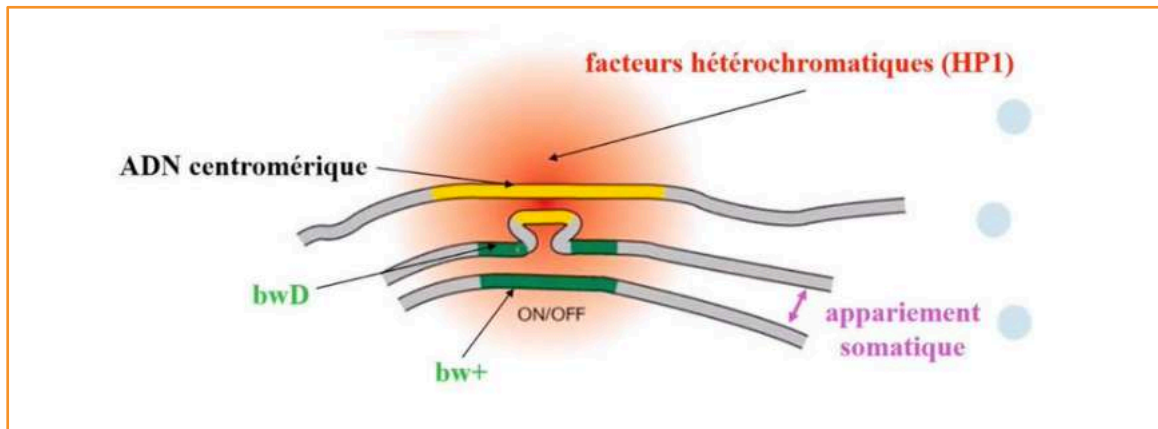
✳ Les chercheurs ont effectué par microscopie des **marquages de cellules de drosophile sauvage parentale (bw+/bw+)** et avec **mutation dominante (bw+/bwD)**. Ils ont utilisé des **marqueurs** qui correspondent respectivement à la séquence **centromérique** et au gène **brown**.



Description du schéma ci-contre :

- ① Dans une cellule normale, les deux gènes **brown+** sont localisés à **distance du centromère en interphase** (le rond gris correspond au noyau et les petits ronds aux gènes appariés)
- ② Alors que dans le mutant **BrownD**, même le **gène normal va se trouver associé à l'hétérochromatine**.

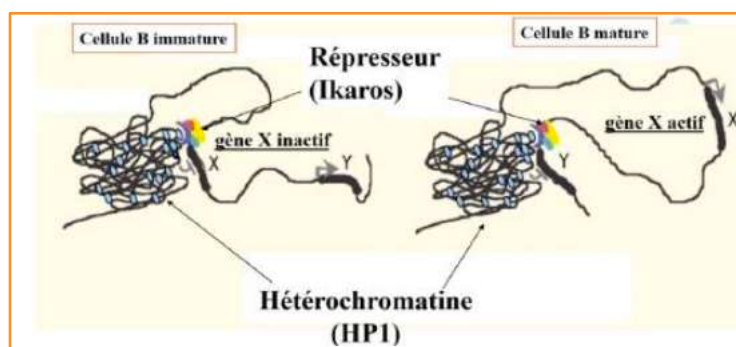
EXPLICATION : → Cela est dû à l'appariement somatique des séquences identiques au sein de notre paire de chromosomes lors de l'interphase



- ✳ En effet à cause de **l'appariement somatique** des **deux chromosomes homologues**, l'allèle **normal** va être **entraîné** par l'insertion de ces **10Mb** sur l'autre allèle vers l'**hétérochromatine du centromère**, donc ça veut dire que **même le gène normal ne s'exprime pas**, simplement parce que sa **localisation nucléaire** est modifiée du fait de l'**allèle mutant** qui l'a entraîné vers l'**hétérochromatine**.
→ il se retrouve donc à proximité de **facteurs hétérochromatiques** (HP1...) entraînant sa **compaction** et donc sa **répression**.

Le positionnement spatial d'un gène est une information de régulation essentielle+++
La régulation de l'expression des gènes ne s'effectue donc PAS de manière identique quel que soit leurs localisations dans le nucléoplasme 🧑🧑🧑

- ✳ Ce concept né de la drosophile est **généralisable**. Par exemple, il a été montré depuis que le même phénomène de **répression** survenait pour des facteurs intervenant dans la **différenciation des lymphocytes** chez la souris 🐭 et chez l'homme 🧑 aussi = les **facteurs de la famille Ikaros** :

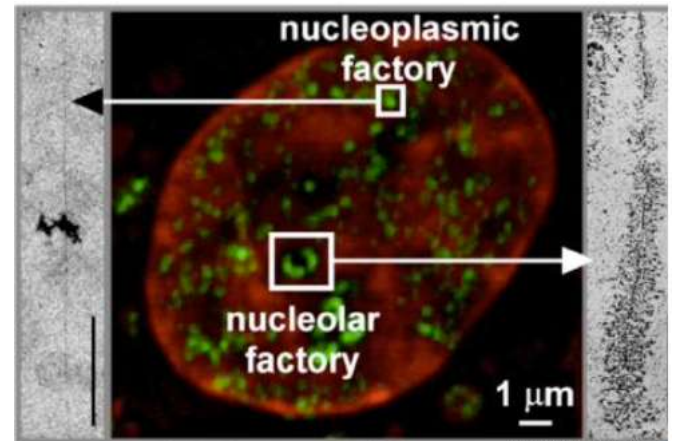


★ Au cours de la **maturation**, de la **différenciation** des **cellules B**, ces gènes **Ikaros** (que l'on voit avec plusieurs couleurs) vont entraîner, de façon naturelle, les gènes **inactifs** vers l'**hétérochromatine** pour stabiliser cet état de **différenciation** et de **programme transcriptionnel** (on voit que le gène X inactif au départ laisse sa place au gène Y qui est attiré par le complexe répresseur Ikaros)

OÙ SE SITUENT LES GÈNES ACTIFS = L'EUCHROMATINE ?

★ À l'inverse, on peut visualiser les gènes actifs en **microscopie** en faisant des marquages avec des **précurseurs de la transcription** comme le ribonucléotide UTP marqué : Br-UTP.

★ On les visualise en **vert**, vous voyez les **zones de transcription actives du génome**, ils sont plutôt localisés à **l'intérieur du noyau**, vers le **centre du noyau** ≠ **périphérie** → en **périphérie** d'une autre structure : les **territoires chromosomiques** (au niveau des **boucles**)



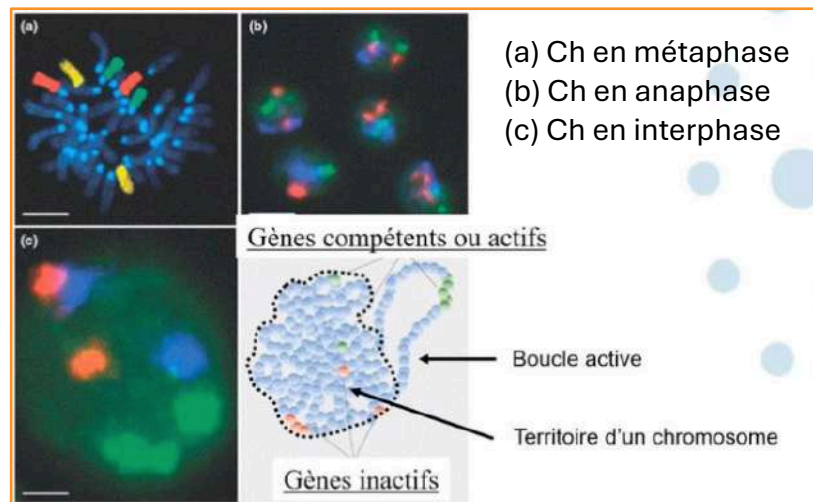
L'**hétérochromatine** des gènes **inactifs** prédomine en **périphérie++** du noyau tandis que l'**euchromatine** des gènes **actifs** prédomine au **milieu/centre++** du noyau (cf Biomol)

→ Intéressons-nous maintenant aux :

TERRITOIRES CHROMOSOMIQUES : (c'est la dernière partie je vous jureeeee)

★ On a encore un **niveau supérieur** d'organisation des chromosomes que sont les **territoires chromosomiques**. On peut les mettre en évidence par **immunolocalisation** (FISH) (que vous avez dû voir avec Clémendocyte dans méthodes d'études de la cellule) dans le noyau.

★ En effet, c'est ainsi qu'on peut repérer les **chromosomes** avec des **sondes fluorescentes spécifiques** et des **colorations** pour chacun des chromosomes → **Chromosome Painting**



★ On peut les visualiser en **métaphase**, mais en **interphase** aussi car les chromosomes ne se **mélagent pas beaucoup**, et définissent autant de **territoires chromosomiques**. Chaque chromosome occupe un **espace défini même en interphase +++ = territoire chromosomique (ou Kique)**. On est dans une cellule **diploïde** donc les taches sont en **double** (= une tâche par chromosome).

★ Si on regarde en termes d'**organisation fonctionnelle**, on s'aperçoit que les **gènes inactifs** (**hétérochromatine**) sont plutôt localisés à **l'intérieur du territoire du chromosome** 🧑🧑 en question. 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** : on va avoir une **boucle active**. Le gène va revenir à l'intérieur quand il sera **réprimé**.



! TUT'WARNING !

Faites bien la différence entre territoire chromosomique et noyau dans les items. Je m'explique :

- **Les gènes actifs** (euchromatine) se trouvent au **centre du nucléoplasme** mais à **l'extérieur des territoires chromosomiques**
- Tandis que **les gènes inactifs** (hétérochromatine) se trouvent à la **périphérie du noyau** contre la double enveloppe et autour du nucléole mais aussi à **l'intérieur des territoires chromosomiques**.

! ATTENTION ROMAN/POÉSIE ptdrrr

C'est avec beaucoup d'émotions que je vous écris actuellement (dans le TER de 19h43 Marseille→Nice qui s'est vu d'ailleurs être couronné le pire train de France). En effet, en ce beau soir de pleine lune (je ne vois pas le ciel de ma cabine en vrai), il est désormais temps pour moi de vous dire adieu par le biais de cette ultime confession. Il m'est décidément impossible de trouver les mots adéquats pour décrire ce que mon âme endure en cette soirée spéciale. C'est donc avec un grand désarroi, procuré par cette ineffable sensation, que j'aborde la fin de cette fiche en sanglotant. En d'autres termes, ce fût pour moi un grand plaisir d'avoir été votre tuteur pour ce premier semestre (bon j'ai encore le temps c'est pas fini mais bon dernière fiche tu connais).

Plus sérieusement (j'arrête mon récit dramatique), j'aimerais réellement vous transmettre tout mon courage pour la suite de cette année rigoureuse que représente la P1 et puis surtout vous remercier pour votre implication et votre écoute (pour ceux présent aux soirées discord et à la TTR bien sûr).

Bon avant de vous laisser sur mes dernières dédis, j'avais une petite citation d'Aristote à vous partager : « La surprise est l'épreuve du vrai courage » en d'autres mots, ce que je veux vous dire par là c'est que si vous vous efforcez, que vous éloignez l'abandon et que vous travaillez régulièrement, vous serez récompensé c'est une certitude. Ne soyez pas surpris de votre réussite, elle est amplement méritée. Chaque pas vers l'avant est une victoire alors soyez fier de vous !!! Au final même vos déceptions sont des occasions de vous perfectionner et de mieux réussir. Croyez en cet essentialisme. Bref c'est donc l'heure des dédis...

DÉDIS DES PAPIS ET MAMIES !!!

- Dédis au goatesque Roi Soleil, qui est sans doute l'un des hommes les plus classe que je connaisse (que vestimentairement parlant par contre 🧟🧟)
- Dédis à la souriante Louann'astomose et très grande amoureuse de Kaamelott (incroyable par ailleurs)
- Dédis à notre incroyable Meyose avec ses : « mais qu'il est con ce con »
- Dédis à la très grande folle Yallux qui demeurera toujours un mystère pour moi
- Dédis à bêta-harCG votre Cheffe tut' qui s'est vraiment fait chier pour le fofo (qui lui a pas toujours bien rendu quel ingrat lahuiss)
- Dédis à Manocytosine votre autre Cheffe tut' qui peut paraître terrifiante (c'est ce que je pensais j'avoue) mais qui est vraiment une crème au fond (faut aller assez loin c'est vrai)
- Dédis à Échalotte, je vais me passer de commentaires
- Dédis à Iristamine. idem je vais pas m'attarder...
- Dédis à Ellycase mon fils qui visiblement à trop de taff (chef tut' askip) pour SG mes dédis
- Dédis à Mathys (Salle Gosse wtf) avec qui je partage la lourde tâche de représenter le MATHYISSVERSE (chelou le mot)
- Dédis à Yabouchou dont je suis le digne successeur du flop tutoresque
- Et puis dédis à AnaLCR parce qu'elle ne veut pas que je lui en fasse (vous pensez qu'elle m'apprécie la team ???)

**DÉDIS BONUS !!!**

- Dédis à Camille votre tutrice d'embryo qui me laisse souvent flop mais bon je peux pas trop lui en vouloir j'abuse aussi...
- Dédis à Mina qui se saigne pour les P2 et qui en vrai même si j'aime la tailler fait un taff incroyable
- Dédis à JP, Houcine et Hugo qui sont prêt à m'aider dès que j'en ai besoin (des anges gardiens au final)
- Dédis à mes co-tuts avec qui je me sens bien de oufff
- Dédis à la musique qui me fait oublier certaines de mes craintes
- Dédis à Ilyan qui est un triple monstre au foot

ET POUR FINIR DÉDIS AU TUTORAT QUI REND MON ANNÉE SI SPÉCIALE !!!

FIN ?? (POV : tombée du rideau et fort applaudissement)