

COURS 06 – LE NOYAU

INTRODUCTION

- I. Notions générales**
- II. Le nucléoplasme**
- III. Au cours de la mitose**

CHAPITRE 1. LA MEMBRANE NUCLÉAIRE

- I. L'enveloppe nucléaire**
- II. Les techniques d'isolements**
 - 1. Isolement des noyaux
 - 2. Isolement de la membrane
 - 3. Isolement du contenu
 - 4. Manipulation du noyau
- III. Composition générale**
- IV. Composition des membranes interne et externe**
 - 1. Les lipides
 - 2. Les protéines
- V. Les pores nucléaires**
- VI. La Lamine nucléaire**
- VII. La membrane et la division cellulaire**

CHAPITRE 2. LE NUCLÉOLE

- I. Observation au MET**
- II. Organisation moléculaire**
- III. Organisation structurale et fonctionnelle du nucléole**
- IV. Organismes nucléolaires chromosomique et mitose.**
- V. Maturation et transport des préARNr**
- VI. L'ARN 5S**

CHAPITRE 3. LA CHROMATINE

- I. Observation du contenu du noyau**
- II. Les histones**
- III. Le complexe ADN-Histone**
 - 1. Structure répétitive
 - 2. Le nucléosome
 - 3. La fibre chromatinienne
 - 4. Rôle des topoisomérase

CHAPITRE 4. LA CHROMATINE ACTIVE

- I. Les gènes transcrits présentent des niveaux différents d'empaquetage de la fibre chromatinienne.**
- II. Les domaines décompactés sont sensibles aux DNases (contenant les gènes transcrits)**
- III. Site hypersensibles**
 - 1. Il existe des sites dépourvus de nucléosomes
 - 2. Modulation des sites hypersensibles lors de l'induction/arret de la transcription
- IV. Mécanismes agissant sur la structures nucléosomique et la fibre chromatinienne**
- V. Rôle des régions localisées de contrôle de la transcription (LCR) à distance**
- VI. Chromatine active en réplication**

COURS 06 – LE NOYAU

I. Notions générales

Ce qui détermine l'existence d'un noyau c'est la membrane nucléaire qui va isoler le nucléoplasme, le nucléole, la chromatine du cytoplasme. Dans les cellules eucaryotes, le noyau est délimité par une enveloppe caractérisé par la localisation d'un pourcentage important d'ADN.

Le noyau est délimité par une enveloppe plus ou moins sphérique constitué de lipides et de protéines, dans laquelle il y aura des mouvements d'entrées et de sorties. Au contact on aura une structure chargée négativement (ribosomes), qui est plus ou moins granulaire fibreuse, variant selon l'état de la cellule. Cette enveloppe est au voisinage du RE, le golgi se trouve à distance normalement. L'essentiel du patrimoine génétique se trouve dans le noyau.

Le noyau est visible en microscopie optique en contraste de phase est délimité par une enveloppe nucléaire qui peut être assimilée une citerne du RE. Cette enveloppe comporte des ribosomes sur sa face cytoplasmique et est percée de pores nucléaires qui est un espace protéique permettant les transferts de protéines et acides nucléiques.

La séparation des espaces contenant le matériel génétique et le cytoplasme est une des caractéristiques des cellules eucaryotes.

Continuité de l'enveloppe nucléaire et l'enveloppe du RE, cette enveloppe a une place définie dans une cellule (et en fonction du type cellulaire) du à un accrochage protéique principalement composé de tubules qui permettent aussi sa rotation et ses mouvements.

De plus, par rapport à la structure des microtubules émanant du centrosome: certains microtubules forment une corbeille qui englobent ou délimite la position du noyau.

II. Le nucléoplasme

Le nucléoplasme renferme la quasi totalité de l'information génétique, soit 2m d'ADN double brin enroulé dans une structure chromatinienne présentant dans le temps différents niveaux de condensation. C'est un empaquetage dynamique et structuration évoluant suivant l'activité et la différenciation de la cellule.

Le noyau est le siège de la réplication et de la transcription, des corrections au cours de la phase S et des mécanismes de réparations au cours de G1 et G2. En phase G1, le noyau est normal ou caractéristique. En phase S: il gonfle, son contenu va se multiplier pour aboutir à 4n chromosomes, jusqu'à la phase G2 et la métaphase.

Les mécanismes biologiques de la cellule imposent des échanges constants entre le cytoplasme et le nucléoplasme.

III. Au cours de la mitose

Le noyau n'est plus visible au cours de la mitose:

- Disparition de l'enveloppe, désorganisation et disparition du nucléole, formation des chromosomes mitotiques. Les structures granulaires et fibreuses disparaissent
- En fin de mitose, il y a décondensation des chromosomes, réapparition de l'enveloppe nucléaire et du ou des nucléoles.

La morphologie du noyau fait l'objet d'études morphologiques dans les différents types cellulaires et dans les cancers.

Chapitre 1. La membrane nucléaire

I. L'enveloppe nucléaire

Constitution visible au MeT

- On distingue la double membrane, qui est composé de 2 bicouches associées l'une avec l'autre. La couche cytoplasmique est en continuité avec la couche lipidique nucléoplasmique. Composition chimique identique de la membrane des deux cotés.
- Continuité des deux membranes avec le REG. La face externe de l'enveloppe nucléaire est en continuité avec la face externe du REG, de même pour la bicouche lipidique interne.
- Le noyau n'est pas libre de se déplacer dans le cytoplasme, il est localisé dans une corbeille de microtubules et de filaments intermédiaires. Contact direct avec des microfilaments (intermédiaire) qui tapissent la face externe.

II. Les techniques d'isolements

1. Isolement des noyaux

- Un **broyage** ou l'action de **détergents faibles** en milieu **isotonique** et en présence de **cations divalents** permet de lyser la cellule. Une centrifugation à basse vitesse (1000g), permet de culotter les plus grosses structures: les noyaux qui peuvent être ensuite purifiées. Il ne faut pas changer la force ionique si on veut maintenir son intégrité.

2. Isolement de la membrane

La membrane et la matrice nucléaire sont isolées après actions de **haute force ionique** et **DNAses** pour se débarrasser du contenu du noyau.

3. Isolement du contenu

Si on veut isoler le contenu, on utilise des **détergents**. Les nucléoprotéines sont isolées par l'action de détergents qui solubilisent la membrane.

4. Manipulation du noyau

Les noyaux sont directement atteignables par micromanipulation: à l'aide d'une micro-aiguille en verre, on peut traverser la membrane cellulaire sans la détruire. Il est possible d'injecter de petits volumes dans le cytoplasme ou dans le noyau en conservant la compartimentation

Il est possible:

- D'extraire un noyau ou ses composants et de l'injecter dans une autre cellule
- Fusionner deux noyaux dans une même cellule.

Lors de synthèse d'ARNm associée à une protéine (gène de classe II), l'ARNm va traverser l'enveloppe nucléaire et va se retrouver dans le cytoplasme et va interagir avec des protéines. Les protéines qui seront à destination du noyau vont devoir passer la membrane nucléaire.

Le REG est une poche de membrane qui entoure le noyau. Les deux membranes proches topographiquement peuvent fusionner: il y aura fusion du patrimoine génétique et des nucléoles.

III. Composition générale

C'est une double membrane formée de lipides et de protéines

- **Membrane externe et interne en continuité avec le REG** et fusionnant au niveau des pores nucléaires. **La membrane externe est garnie de ribosomes.**
- La **face interne** est tapissée d'un réseau de protéines: **la lamina** est formée de protéine fibrillaire interagissant avec la membrane nucléaire interne, la chromatine et les pores nucléaires. **Absence de ribosome sur la face interne de la membrane nucléaire.**

Les pores nucléaires sont de grand complexes protéiques à la fusion des membranes nucléaires externes et internes.

IV. Composition des membranes interne et externe

Comme et en continuité avec le REG, elles ont la même composition que lui:

1. Les lipides

- 10% de **cholestérol**
- 55% de **phosphatidyl choline**
- 20% de **phosphatidyl éthanolamine**

Forment une bicouche de lipide fluide insaturé (rotation et translation)

- La fluidité dépend de la **température**
- Le facteur le plus important est le **degré d'insaturation** des chaînes d'acides gras des phospholipides.
- La fluidité est **diminuée** par l'incorporation de **stéroïdes**.

La fluidité génère une structure mobile ordonnée qui autorise des interactions à l'intérieur de la membrane

Conséquences de la composition LIPIDIQUE:

- **Difusion** des protéines membranaires après fusion
- Existence de **domaines membranaires** et **polarité cellulaire**
- **Passage** de **substances** au travers de la membrane
- **Orientation** des **complexes protéiques**

2. Les protéines

Rapport protéines/lipides = 2

Essentiellement les protéines constituant les pores nucléaires, les protéines sont orientées, et peuvent diffuser latéralement

La continuité de l'enveloppe nucléaire est assurée par deux membranes concentrique séparées par un espace intermédiaire réel de **10 à 50 nm**.

V. Les pores nucléaires

Ce sont les structures protéiques permettant le passage entre le cytoplasme et le noyau.

Structures de grand volume et diamètre de **1000 Å**. Ce complexe correspond à une fusion des membranes externes et internes délimitant un canal aqueux où des molécules solubles passent.

Leur nombre varie de 3 000 à 4 000 par noyau (2 à 60 / μm^2) Ce nombre varie en fonction de l'activité de la cellule.

COURS 06 – LE NOYAU

A coloration spécifique de protéine, on voit plusieurs sous structures:

- **Deux anneaux**: un sur la face cytoplasmique et un sur la face nucléoplasmique, ils sont reliés par des protéines et en continuité avec des **fibrilles protéiques** des deux cotés.
- **Les doigts protéiques** interviennent dans la reconnaissance et le transport dans un sens ou l'autre.

On distingue une **centaine** (100 – 200) de **chaines peptidiques** par pore nucléaire. Ils ont une symétrie **d'ordre 8** facilement reconnaissable sur les deux faces

Ces structures permettant le **transport** cytoplasme/noyau qui est une **diffusion passive et lente** de **petites molécules**: une molécule de 17 000 daltons passe en 2 minutes mais lorsque la taille augmente, la vitesse diminue: une protéine de 44 000 daltons passe en 30 mn.

Une **petite protéine isolée peut traverser**, mais dès qu'elle fait partie d'un complexe, il faudra un système actif.

On distingue les pores nucléaires en haute résolution à l'aide de billes de métal.

On distingue du cytoplasme vers le nucléoplasme:

- Un **anneau cytoplasmique (32 Mda)** et un **anneau nucléaire (21 Mda)**:
 - L'anneau cytoplasmique est attachée à 8 fibrilles courtes.
 - L'anneau nucléoplasmique est rattaché à un panier formé de 8 filaments se rassemblant en anneau
- La **structure protéique centrale (55Mda)** de la taille d'un ribosome et formé de huit domaines répétés (16 domaine protéique)

La structure est retrouvée aussi bien chez les levures que chez les vertébrés.

Le pore nucléaire est ainsi formé d'une centaine de protéines différentes (8-16 copies) appelées les **nucléoporines** (Nups) dont la plupart comportent un motif répété FG. Elles ont un domaine intramembranaire et un extramembranaire et des doigts protéiques vont permettre l'attachement à la membrane nucléaire.

Certains de ces nucléoporines interagissent avec des facteurs de transport: **les importines**, elles ont un rôle de reconnaissance et d'acheminement de constituant présent dans le cytoplasme vers le noyau mais également de complexe provenant du nucléoplasme (RNP) qui sont transférés dans le cytoplasme.

Les importines sont présentes des deux cotés et chemine à travers le pore nucléaire.

Les **lamines** présentes sur la face nucléoplasmique de l'enveloppe nucléaire interagissent avec le pore nucléaire: interaction protéine-protéine qui va **associer ce pore nucléaire** à la structure rigidifiante de la membrane nucléaire.

Cette enveloppe nucléaire peut aussi avoir des transport actifs.

Mécanisme de reconnaissance des protéines (signal d'adressage), consommation d'ATP en traversant la membrane.

*Expérience: microinjection dans le cytoplasme d'oocytes de *Xenopus laevis*.*

On peut lier les protéines à des particules d'or colloïdale à des fragments de protéine nucléaires, il y aura identification de séquence de 4 à 8 acides aminés, Riche en Lysine ou Arginine, reconnaissance, acheminement à travers le pore nucléaire et intégration dans le noyau.

Donc il y a reconnaissance de séquence signal. Cette expérience permet de visualiser les lieux d'acheminement du cytoplasme vers le noyau et on peut visualiser que les billes d'or passent par le pore nucléaire.

Le transport actif est très efficace: **10⁷ histones par minute** traversent l'enveloppe nucléaire d'une cellule. Chaque pore nucléaire se déclenche et transporte une **centaine d'histone par minute**.

COURS 06 – LE NOYAU

Il y a transport de protéines cytoplasmiques à l'aide de **facteurs cytoplasmique**: interaction, reconnaissance à l'aide des filaments des pores, recyclage.

Transport aussi d'ARN vers le cytoplasme:

- **ARNm**: formation d'interaction nucléoprotéique (association avec une protéine) et maturation.
- **ARNr**: maturation et préassemblage

L'assemblage dans le noyau n'est que transitoire.

Exemple:

Maintien de la Ran-GTP et de Ran-GDP dans des compartiments différents. La structure de cette protéine est modifiée par son interaction avec le GTP ou GDP. L'acheminement se fait selon la structure de la protéine.

ARNm associé à des protéines se déroule lors de son passage dans le pore nucléaire pour aboutir dans le cytoplasme. Une fois dans le cytoplasme il va pouvoir interagir avec les SU ribosomales.

Le mécanisme est relativement complexe:

- Les **protéines** constituant la ribonucleoprotéines sont **importé** du cytoplasme,
- Dans le noyau, les protéines vont **interagir** avec les **acides ribonucléique: assemblage**
- **Déroulement** de la **structure** lors du passage dans le pore nucléaire
- Stade **terminal** dans le **cytoplasme**.

Acheminement du noyau vers cytoplasme: ARNm + protéine ainsi que les ARNr.

VI. La Lamine nucléaire

Forme un maillage fibrillaire dense présent sur la face nucléoplasmique stabilisant les pores.

Les protéines sont constituées de filaments intermédiaires d'environ 70 000 daltons. On différencie les lamines A,B,C formant un tamis de fibres ou squelette à la surface de la membrane interne:

- Portion tubulaire ou hélicale centrale
- **Contiennent** une **séquence d'adressage** au noyau forment un réseau bidimensionnel dynamique: il peut y avoir des dissociation (dépolymérisation) par phosphorylation (**cdc2 kinase, cyclineB**) lors du cycle cellulaire. Cette dépendance du cycle cellulaire est due par des enzyme kinase dont l'activité est modulé par rapport au cycle cellulaire.
- **Adjonction** de groupement **isoprènes** et **carboxyliques hydrophobes** facilitant l'interaction de la lamine avec la membrane.
- **Recepteurs lamine B ancrée** dans la membrane interne.

Le maillage est formé par la polymérisation des lamines. Forment un tapis protéique présente sur la surface interne de l'enveloppe nucléaire.

VII. La membrane et la division cellulaire

- **Phosphorylation** des lamines par les cdc2 kinase: dépolymérisation de la lamina
- **Fragmentation** de la membrane nucléaire en petites vésicules associées aux pores nucléaires dissociés et protéines membranaires
- **Déphosphorylation, polymérisation**
- **Fusion** des **microvésicules** reformant l'enveloppe nucléaire.
- **Transport actif** des **protéines nucléaire** à l'intérieur du noyau.
La séquence d'adressage n'est pas existé lors de son transport.

Des micronoyaux peuvent être formés par microinjection d'ADN purifié de chromatine ou de la protéine Ran-GTP dans des noyaux d'oocyte de *Xenopus laevis*. Des pores nucléaires fonctionnels sont présent dans ces membranes reconstituées.

Chapitre 2 Le nucléole

On peut observer le nucléole au microscope optique à contraste de phase. Le nucléole se reconstitue spontanément lors de fusion nucléaires.

Il existe une structure de quelques micromètres de diamètre dans le noyau qui peut-être isolé et caractérisé. Elle contient de l'ADN (chromatine condensé et non condensé), des protéines et des ARN.

Il est le siège de transcription des gènes ribosomique et gene de transcriptions.

Dans une cellule donnée, la taille des nucléoles et l'emplacement de ses constituants varient en fonction de l'activité de synthèse protéique et du type de cellule: le volume augmente quand l'activité augmente.

Dans des cellules cancéreuses il y a des anomalies de taille, tout comme dans des cellules infectées par un virus (HIV, hépatite...), ou les cellules d'une personne âgées.

Il est possible d'extraire le nucléole par méthode de cisaillement du noyau et une centrifugation.

I. Observation au MET

- **Composante granulaire** (stockage): contient des particules pré-ribosomique (ribonucleoprotéines) à aspect granulaire de 15-20 nm de diamètre.
- **Centre fibrillaire**: leur bordure est le siège de l'allongement des ARN pré-ribosomique.
- **Composante fibrillaire dense**: entourant les centres fibrillaires, c'est une chromatine compact et neo-transcrit.

Il y a des mottes de chromatine condensé en périphérie.

II. Organisation moléculaire

- Répétition 200x de séquences pré-ARN ribosomique d'un motif d'environ 18 000 pb codant pour les 3ARNr (gène 45S): 18S 5,8S et 28S (dans l'ordre)
- Un seul transcrit final
- Maturation et assemblage nucléoprotéique sont réalisés d'un seul tenant
- Attachement à des protéines venant du cytoplasme.
- Existence de 5 organisateurs moléculaires sur les Chr 13, 14, 15, 21 et 22

Dans le génome, les gènes moléculaires sont séparés par des séquences non transcrites. Leur transcription nécessite des protéines nucléaires solubles **UBF** ainsi que des matrices nucléaires présentes dans le nucléole.

Séquence d'initiation et terminaison sur le gène 45S.

III. Organisation structurale et fonctionnelle du nucléole

- Rassemblement des domaines chromatiniens ribosomiques (répétés une centaine de fois sur 5 Chr)
- Localisation des structures chromatiniennes actives et inactives. Le centre fibrillaire contient des fibrilles correspondant aux séquences non transcrites des ARNr.
- Initiation de la transcription: à la jonction entre la composante fibrillaire et le centre fibrillaire dense.
- Maturation dans les composantes granulaires: stockage de particules pré-ribosomiques formées après association avec les protéines ribosomales importées du cytosol

Si il y a blocage de la transcription les composantes granulaires vont disparaître progressivement.

COURS 06 – LE NOYAU

On peut disperser les noyaux fibrillaires des oocytes en mettant en évidence les boucles de transcription ressemblant à des sapins de Noël, les boules représentant les transcrit. Les granules à la base contiennent de l'ADN polymérase I, le promoteur se trouve en amont, il existe des régions non transcrites.

L'ensemble de ces structures est répété avec la même orientation.

Résumé: Il existe une séquence non transcrite sur le 45S ; 45S est transcrit d'un seul tenant et en totalité; le transcrit est associé à des protéines permettant sa maturation.

L'ARNpol I se déplace sur toute la longueur de l'ARN 45S sans se décrocher. Plusieurs ARN Pol sont en contact: il y a un cycle de transcription très serré et efficace. Les ARN synthétisés sont immédiatement compactés dans une structure, les boules en extrémité représentent l'empaquetage de l'ARN préribosomique. L'ARN ribosomique est traité dans ces mêmes structures.

Le diamètre apparent du nucléole est d'environ 5µm, le volume est très variable en fonction de l'activité et du stade du cycle cellulaire. Dans un hépatocyte par exemple, l'essentiel du nucléole est constitué par la composante granulaire, mais lors de sénescence et mort cellulaire, le nucléole est fragmenté.

IV. Les facteurs de transcriptions

UBF (Upstream binding factor) et SL1 participent au complexe d'initiation de la transcription du 45S et sont essentiellement localisés sur le promoteur actif présent à la jonction entre la Composante Fibrillaire Dense et les centres fibrillaires.

Inhibition de la synthèse de l'ARN pré ribosomique par **Actinomycine B**, on verra une disparition de la jonction entre le CFD et la GF. Donc la synthèse aura lieu à ce niveau.

La maturation du précurseur 45S en 28S 18S et 5,8S. Cette maturation du préARNr s'accompagne de **méthylations** (>100 notamment sur le ribose), cette particularité permet de suivre par marquage à la méthionine ¹⁴C:

- Marquage du 45S apparaît après 10 minutes
- Suivi progressivement après 40-150 minutes par les espèces plus courtes

La composante granulaire n'a pas de gène pré-ribosomique, mais des structures d'interaction, comme des systèmes de clivage et de modification post-transcriptionnelle.

Le nucléole est le lieu d'assemblage de particule préribosomique.

V. Organismes nucléolaires chromosomique et mitose: région des chromosomes renfermant les ARN ribosomique, absence de synthèse d'ARNr pendant la mitose

Lors de mitose, il y aura compaction de chromosomes, donc les gènes chromosomiques seront séparés et seront localisés à l'extrémité de ces 5 chromosomes.

Dans l'ordre chronologique d'événements:

- Disparition de la **composante fibrillaire dense**
- Disparition de la **composante granulaire**
- Les **centres fibrillaires persistent** et se séparent associés aux 5 chromosomes. Persistance de **UBF, SL1, ARN pol I** (héparine) et **Topo I**. Le complexe **SL1 et UBF sont inactivés par phosphorylation par cdc2-cyclineB lors de la mitose**.
- A la **télophase**: réapparition de la **structure fibrillaire dense** entourant les centres fibrillaires, **puis de la composante granulaire**: redémarrage de la transcription des gènes ribosomiques.

Lorsqu'il y a compaction des gènes pré-ribosomique, la cellule garde en mémoire les structures qui seront responsables de la synthèse d'ARN préribosomique. Les protéines sont présentes mais inactivées.

VI. Maturation et transport des préARNr

- Transcription d'un **ARN 45S, associé à des protéines** dans le nucléole.
- Formation de **deux particules préribosomiques** qui sont non-fonctionnelle (grandes et petites sous unités déjà dans le noyau).
- **Association** avec des **protéines** recyclées ou nouvellement importées dans le noyau
- Les deux sous-unités passent dans le cytoplasme où elles sont activées

La maturation a lieu grâce à l'interaction ARN-protéine, dans la composante granulaire. Les protéines sont synthétisées dans le cytoplasme et seront importées dans le noyau.

VII. L'ARN 5S

Est synthétisé dans le nucléoplasme par l'ARNpol III, s'associe sous forme de ribonucléoprotéine dans le nucléole à la grande sous-unité non encore mature.

Les deux sous-unités sont modifiées et associées dans le cytosol après fixation d'un ARNm sur la petite sous-unité.

Chapitre 3. La Chromatine

A l'intérieur de l'enveloppe nucléaire, en dehors du nucléole, après coloration des nucléoprotéines on distingue un ensemble de fibres formant des régions condensées ou dispersées très variables apparemment qui correspondent à l'**empaquetage** du matériel génétique par des **protéines**, ces complexes étant structurés par la matrice nucléaire et ancrés sur celle-ci.

C'est ainsi que les 2m d'ADN double brin se trouvent rassemblés dans une sphère de diamètre inférieure à 10µm.

Il y a deux grands types de structure:

- **Chromatine dispersée**: volume important dans laquelle la coloration est peu dense et sans éléments structurant visible.
- **Hétérochromatine**: Structure dense fortement coloré

I. Observation du contenu du noyau

- Le matériel nucléaire extranucléolaire peut être isolé par centrifugation, après solubilisation de l'enveloppe nucléaire en présence d'une force ionique physiologique et de cations divalents nécessaire à la préservation de la condensation du matériel nucléoprotéique.
- On retrouve environ deux fois plus de protéines que d'ADN (il n'y a pas de Lipide) parmi lesquelles on considère la machinerie de la transcription, de la réplication, de la réparation.
- Environ la moitié des protéines nucléaires est formé par les histones.

Donc il y a autant d'ADN que de protéine matricielle. L'autre moitié sont non matriciel et ont des activités enzymatique.

I. Les histones

- Masse **10 kDa** pour **H2A, H2B, H3 et H4** riches en **lysine et arginine**.
- Les extrémités **N-Terminale** sont chargées **positivement** et peu structurées.
- Les histone **H1** de masse plus élevée **20 kDa**
- H3 et H4 sont les histones les plus conservées
- Forte conservation des séquences chez les eucaryotes
- Les gènes histones sont répétés et transcrits de façon coordonnée en liaison avec le cycle cellulaire lors de la **phase S**

Les histones sont modifiées après leur synthèse:

- **Acétylation de H1, H2A et H4** induite lors d'une **stimulation de la transcription** (lysine). Cette modification localisée est fortement associée à l'expression de gènes: 13 lysines des extrémités N-Terminales peuvent être acétylées de façon réversible
- **Phosphorylation** de trois **sérines** des histones **H3 et H4**, et **phosphorylation de H1** corrélée notamment avec la **division cellulaire**.
- Trois **arginines** des histones **H3 et H4** peuvent être **méthylées** (**inhibition de transcription**)
- Deux résidus des extrémités C-Terminales des histones **H2A et H2B** peuvent être **ubiquitynilés**.
- Charge basique lysine et Arginine qui permet l'interaction avec l'ADN. La **phosphorylation** et **acétylation cache** le groupement **basique** et **empêche l'interaction**

Les histones sont transcrits indépendamment les uns des autres, il y a des promoteurs pour chaque SU, contrairement au 45S.

Chaque promoteur fonctionne de façon coordonnée au moment de la phase S.

Chez l'homme la famille des gènes histones comprend plus de **60 copies** dont deux ensembles majoritaires sur le bras court du **Chromosome 6**.

COURS 06 – LE NOYAU

Les quatre histones H3, H4, H2A et H2B forment **spontanément** un double hétérotétramère en solution comme démontré par:

- Fractionnement et pontage: **Octamère (H3H4)₂ – H2A₂ – H2B₂**
- Purification à partir de noyaux ou de nucléoprotéines
- Expérience de pontage (liaison covalente entre les protéines)
- Isolation par gradient en présence de force ionique élevée.

L'ensemble des cellules eucaryotes contient des octamères d'histone des unicellulaires aux hommes ou plantes.

- **L'octamère** est toujours **basique** et est lié avec l'ADN par des liaisons ioniques fortes (1,2 – 2 M de NaCl), c'est-à-dire les histones H3, H2a, H2b et H4.
- L'ADN double brin **s'enroule** autour du cœur histone.
- **L'histone H1 est particulière** et interagit avec l'ADN et le complexe Octamère-ADN par des liaisons ioniques. (0,6M NaCl)
- Les histones sont présentes dans le noyau interphasique et les chromosomes.
- Chez l'homme, les histones sont **présentes dans toute cellule l'exception du spermatozoïde** dans lequel les histones ont été remplacées par de petites protéines basiques, structurées par leur interaction avec l'ADN: les protamines (ex: spermine). Après fertilisation il y a remplacement des protamines par des histones néosynthétisées.

II. Le complexe ADN-Histone

Les interactions entre ADN-Histone sont de type ionique et donc dissociées par une élévation de la force ionique. Au-delà de 2M de NaCl on n'isole plus que l'ADN déprotéinisé.

Les histones sont dissociées de l'ADN progressivement: de 0,4 à 1,5 M NaCl à pH neutre.

L'ADN est protégé par l'action des DNase par les histones: cette protection permet de voir une structure répétée

1. Structure répétitive

Celle-ci est formée par les interactions histones-ADN comme le montrent les expériences d'isolement et de reconstitution.

La digestion par une **DNase** génère des fragments multiples d'une longueur unitaire de **200pb**. Elle n'a pas dissocié les complexes: **ADN-Histones**.

On le voit sur un gel d'agarose: les structures séparées sont des multiples de **200pb** et sont donc le reflet de la structure nucléoprotéique générée par l'interaction histone-ADN.

Ceci est généré par l'action de DNase sur des noyaux, mais ce phénomène existe in vivo lors de mort cellulaire: production et activation de DNase qui produisent des multiples de 200pb, générés par les coupures double brins entre ces structures formées par ADN-Histone

2. Le nucléosome

Structure présente dans le noyau et isolable après digestion aux DNases et fractionnement sur gradient. Retrouvée dans tous les organismes eucaryotes.
Dimension disque de 12nm de diamètre et 7 nm d'épaisseur

Structure native reconstituée à partir d'ADN et d'histone purifiée: l'octamère d'histone s'associe à l'ADN (environ 200pb d'ADN soit 64 nm sont associées à l'octamère en solution).

Les protéines basiques vont interagir fortement de manière ionique avec l'ADN

COURS 06 – LE NOYAU

- Présence d'une structure répétée dans le noyau ou la chromatine: la même structure existe dans le noyau de la cellule intacte
- Digestion ménagée aux DNases: obtention de multiples d'environ 200pb (nx200pb)
- Environ 200pb associée aux histones correspond au monomère de la structure répétée ou nucléosomes.

L'ADN est à l'extérieur de l'octamère, enroulé autour du cœur d'histone contrainte équivalent à un supertour négatif.

L'interaction Histone-ADN se fait sur les bases AT, ce sont les régions protégées des DNases. Il y aura des régions d'ADN accessibles GC riches. Une digestion poussée donnera des coupures de 10pb. Une digestion poussée aux DNases produit une structure nucléoprotéique résistante: le cœur du nucléosome (nucléosomal core), H1 non présente

ADN nucléosomique est accessible à la Dnase I qui génère des coupures simple brin espacées de 10 nucléotides.

Structure nucléosomique reconstituée in vitro:

- Association H2A H2B H3 H4 avec ADN en solution: diminution de la force ionique: interaction ionique (1-1,5 NaCl)
- Raccourcissement apparent de l'ADN un nucléosome contient environ 200pb ou 68nm
- Formation de structure 11nm x 7nm
- En présence d'un ADN fermé covalent: formation de nucléosome induit une contrainte de torsion: il y aura une gestion des contraintes de façon à ne pas gêner la transcription cellulaire et la division cellulaire

Localisation et rôle de l'histone H1: 1 exemplaire H1 pour 2 H4 H3 H2a H2b

- Localisée au point d'entrée et de sortie du nucléosome
- Interaction entre les histones H1 des différents nucléosomes
- Stabilise la structure nucléosomique (DNases) et stabilise les interactions entre nucléosomes.
- Participe à la compaction de la fibre chromatinienne (effet de la force ionique et cations divalents avec notamment l'extrémité N-terminale de l'histone H4)
- Stabilise les interactions inter-nucléosomiques
- Seule histone facilement échangeable (force ionique entre 0,4 et 0,6 NaCl)

Modification de l'interaction

- Phosphorylation de H1 au cours du cycle cellulaire qui entraîne un changement des interactions: compaction de la fibre chromatinienne.

Essentiellement toute séquence génomique est trouvée dans une structure nucléosomique (sauf dans le spz qui a des protamines): Toute la séquence nucléosomique ne présente pas la même sensibilité aux DNase (chromatine active)

3. La fibre chromatinienne

- Repliement du chapelet de perles de 11nm
- Formation d'un filament de 30nm de diamètre moyen structure dynamique et flexible
- L'histone suit le modèle du solénoïde en hélice droite, six nucléosomes par tour
- L'histone H1 permet une compaction supplémentaire
- due aux interactions nucléosome/nucléosomes (octamère/octamère) ET au rôle des histones H1 et
- L'ADN est toujours accessible sur les nucléosomes entre ceux-ci par les ADNpol, ARN polymérase.
- Certaines séquences vont être en rapport plus facilement

COURS 06 – LE NOYAU

Différents niveaux d'empaquetage de l'ADN nucléaire

- Double brin
- Formation d'histone en chapelet de perle
- Formation de solénoïde
- Formation des boucles de fibre chromatinienne: 20 000 - 70 000 pb par boucle
- Les boucles sont repliées sur elles-mêmes
- Les boucles forment le chromosome.

Ancrage des boucles de fibre chromatinienne sur la matrice nucléaire qui est associée à la lamina.

La matrice est isolée comme structure nucléaire non solubilisée par les détergents, DNase et haute force ionique. Elle contient les lamines, des microfilaments d'actine

Isolement après digestion DNase poussée et purification en présence de force ionique élevée des séquences SAR ou MAR (au niveau des chr ou noyau interphasique) riche en AT qui sont des séquences d'attachement de l'ADN sur la matrice. Il va y avoir une localisation spécifique de différentes zones localisées dans la fibre chromatinienne. Régions voisines des séquences de régulation de l'expression génétique et d'origines de réplication, présence de Topoisomérase II notamment.

Les séquences MAR dépendent du type cellulaire (différentiation) et du niveau d'activité (tous les MAR ne sont pas utilisés)

- Sont ainsi définis les domaines chromatiniens de 30 à 80 000 pb: domaines structuraux et fonctionnels présents dans le noyau interphasique ET dans les chromosomes (squelette du chromosome)
- Il est possible d'enlever les histones et maintenir la fixation des boucles d'ADN: visualisation des boucles d'ADN

Organisation des domaines chromatiniens dans les chromosomes en écouvillon d'amphibien. La compaction/décompaction de l'ADN chromatiniens reflète le degré d'activité de certaines zones de l'ADN.

L'ADN total est une juxtaposition d'ADN chromatiniens. Dans la structure unitaire et les fibres, il y a des contraintes de torsion que la cellule doit gérer pour l'accessibilité

III. Rôle des topoisomérases

Les domaines chromatiniens forment donc des boucles de fibres chromatinienne équivalentes à des domaines fermés (ADN circulaire fermé covalent)

Les contraintes topologiques au cours de la transcription et de la réplication sont gérées à l'intérieur du domaine

- Présence de Topoisomérase II au niveau des points d'ancrage: double brin transitoire
- Présence de Topoisomérase I dans le nucléoplasme: simple brin transitoire

Une structure plus compacte freine les mécanismes de réplication et transcriptions.

La Topoisomérase I est nécessaire à la transcription G1/G2, la Topoisomérase II est utile en S et division cellulaire M. Ces mêmes enzymes peuvent ensuite lier les brins qui ont été séparés.

Les contraintes peuvent évoluer: en cercle relâché, supertour négatif ou redistribution
Une molécule qui s'intercale dans la structure formera en amont des supertours négatifs et en aval des supertours positifs: la topoisomérase enlève les contraintes induites par les supertours.

La topoisomérase de type II: il existe des contraintes qui ne peuvent être résolues que par la coupure simultanée des deux brins. La réplication d'une boucle d'ADN double brin donnera une structure enchevêtrée qui ne pourra être résolue que par la topoisomérase II: si elle n'existe pas, il ne peut pas y avoir de séparation des brins répliqués.

Chapitre 4. La Chromatine active

L'essentiel du génome (plus de 80%) est empaqueté dans une structure nucléosomique et de fibre chromatinienne. Tous les nucléosomes ou régions des fibres de chromatine ne présentent pas une même accessibilité aux DNAses.

Il y a modification des structures et de leurs interactions lors de la transcription et de la synthèse d'ADN.

La structure compacté est inactive.

I. Les gènes transcrits présentent des niveaux différents d'empaquetage

Inhibition de la transcription par les histones

a) les ARN polymérases peuvent transcrire un ADN empaqueté dans une structure chromatinienne, présence de ralentissements.

b) L'inhibition est reproduite in vitro par la présence d'octamères d'histones.

Dans les **chromosome polytènes** on peut localiser la transcription actives dans les *puff* (structure polyplœide). Ce sont des cellules dans lesquelles il y a réplication sans divisions cellulaire.

Séquence et structures amplifiées mille fois (10 cycles sans séparation des chromosomes). chromosomes interphasique de glandes salivaires d'insecte où les séquences sont présentes en plus de mille copies sans être séparées: **polytenization**.

On peut diviser la structure chromatinienne en structure de bande/interbande à nombre de gène identique.

Présence de bandes plus sombres formant une succession caractéristique d'une espèce. Ces bandes contiennent un petit nombre de gènes identiques (démonstration par hybridation)

L'exposition d'une cellule à une hormone stimulatrice de transcription modifie l'organisation chromatinienne de manière caractéristique en fonction de l'hormone: il y a apparition des puffs.

Les gènes transcrits sont localisés dans les domaines chromatiniens décompactés (puff ou région de chromosomes polytènes en cours d'activation). Développement dans le temps des puffs par exemple après exposition à l'**ecdysone**. **La structure activée est réversible.**

II. Les domaines décompactés sont sensibles aux DNAses (contenant les gènes transcrits)

- Digestion comparée d'un gène réprimé et d'un gène transcrit
- Domaine chromatiniens modifiés ?

Ex: Gène de la globine est plus rapidement digéré dans l'erythroblaste de l'embryon de poulet de 14 jours que dans l'erythrocyte, bien que présent dans les deux cas dans une structure chromatinienne. Il y a plusieurs types de globine.

Un gène devient sensible aux DNases spécifiquement dans les tissus où il s'exprime.

Modification structurale est non la conséquence de la transcription ou de la réplication, mais est préalable et nécessaire à l'expression de gène puis persiste.

Modification des histones durant la phase S: coeur histone Acétylé et H1 1-2x grpt P avant la mitose: désacétylation.

Il existe un ensemble de régulation enzymatiques organisant les mécanismes (séquence spécifique).

COURS 06 – LE NOYAU

Les extrémités N-Terminales des quatre histones sont exposées à l'extérieur du nucléosome où elles sont l'objet de modification comme l'**acétylation de lysines**, l'extrémité N-terminale de **H4** qui participe directement aux **interactions** entre **nucléosomes**.

L'acétylation est corrélée à la sensibilité aux DNases et à la transcription

La décondensation de la structure chromatinienne permet l'accessibilité de l'ADN aux mécanismes transcriptionnels.

III. Site hypersensibles

1. Il existe des sites dépourvus de nucléosomes

Certains nucléosomes occupent des sites séquence-spécifique. Ils sont généralement positionnés de part et d'autre de séquence préférentiellement sensibles aux DNases (site hypersensibles).

Exemple: origine de la réplication du SV40 contient des sites d'initiation des gènes précocément ou tardivement transcrit, contient des zones hypersensibles.

2. Modulation des sites hypersensibles lors de l'induction/arret de la transcription

Ex: expression de gènes induits par une hormone comme la conalbumine ou l'ovalbumine dans les cellules d'oviducte de poule. Certains sites hypersensibles sont induits, d'autres modifiés.

Il y a généralement persistance de sites hypersensibles en amont ou au voisinage des sites d'initiation de la transcription.

IV. Mécanismes agissant sur la structure nucléosomique et la fibre chromatinienne

Inhibition de la transcription par les histones (modulée):

- Les ARN polymérase peuvent transcrire un ADN **empaqueté** par les octamères d'histones (**présence de ralentissements**).
 - Inhibition de la transcription in vitro est inhibée par la présence d'octamères d'histones (existence de facteurs de transcription spécifique).
 - **Déplacement** des histones **par** les **activateurs** (activation de la transcription des gènes de la phosphatase acide)
 - Structure **inactive**:
 - Présence de **quatre nucléosomes** positionnés spécifiquement par rapport à la séquence
 - **Un de ces nucléosomes contient deux séquences reconnues** par les facteurs de transcription
 - **Une troisième séquence** reconnue par **Pho4** est contenue dans la séquence **reliant deux nucléosomes**.
 - **Activation du gène de la phosphatase acide**
 - **Fixation de Pho4** entre les deux nucléosomes (2 et 3) ce qui **diminue la stabilité** des interactions ADN-Protéine du nucléosome voisins
 - **Interaction** des **transactivateurs** Pho3 et Pho4 sur leur séquence ce qui entraîne le **déplacement** du **nucléosome** (2)
 - **Fixation de Pho4 sur le site libéré**
 - **Mécanismes d'activation de la transcription**
 - Les activateurs de la transcription **envahissent les nucléosomes**
 - **Compétition dynamique**: Les sites de fixation des activateurs de la transcription sont localisés entre les nucléosomes et aux points d'entrées/sorties des nucléosomes.
 - **Fixation préventive des transactivateurs.**
- Changement de la structure chromatinienne durant la réplication**
Obtention d'une **programmation cellulaire: stabilisation** d'une structure active ou inactive

COURS 06 – LE NOYAU

- **Rôle de modification des histones:** fixation de résidus **acetyls** notamment sur les **lysines** des doigts, les **acteyl-transferase** et **déacetylase** font partie des complexes enzymatique régulant l'expression des gènes.

V. Rôle des régions localisées de contrôle de la transcription (LCR) à distance

- Régions de contrôle agissant en **cis**
- Sites **hypersensibles**
- Situé à proximité ou à distance des gènes: beta globine entre 10-20Kpb ou quelques centaines de paire de base.
- **Site de fixation** de complexes activateurs
- **Peuvent être déplacés.**

VI. Chromatine active en réplication

Rappel sur le cycle cellulaire:

- Phase M comprend a mitose au cours de la quelle les chromosomes dupliqués se séparent et la cytokinèse cad division physique en deux cellules fille.
- Au cours de la phase M (30min) il n'y a généralement ni transcription ni réplication
- C'est au cours de l'interphase que se déroulent les mécanismes actifs de la réplication expériences de marquages

Les sites d'initiations de réplication se déplacent sur tout l'ADN.