

# SV-F-3 LE CONTRÔLE DE L'EXPRESSION DU GÉNOME



# EXTRAIT DU B.O.

## Savoirs visés

Le **contrôle de l'initiation de la transcription** est la principale voie de contrôle de l'expression génétique. Le contrôle de la transcription repose sur des interactions entre des séquences régulatrices et des **facteurs de transcription** ou de **remodelage de la chromatine**. Les facteurs de transcription interagissent spécifiquement avec des séquences d'ADN et des protéines. Le niveau de transcription est influencé par **l'état de méthylation des bases de l'ADN** et les modifications de la chromatine. La probabilité d'initiation de la transcription dépend de la combinaison de tous les acteurs précités. Les **modifications de la chromatine** constituent une information **transmissible** et sont à la base du contrôle **épigénétique**. Ces modifications transmissibles constituent **l'épigénome**.

**L'interférence ARN** est un mécanisme de contrôle post-transcriptionnel majeur.

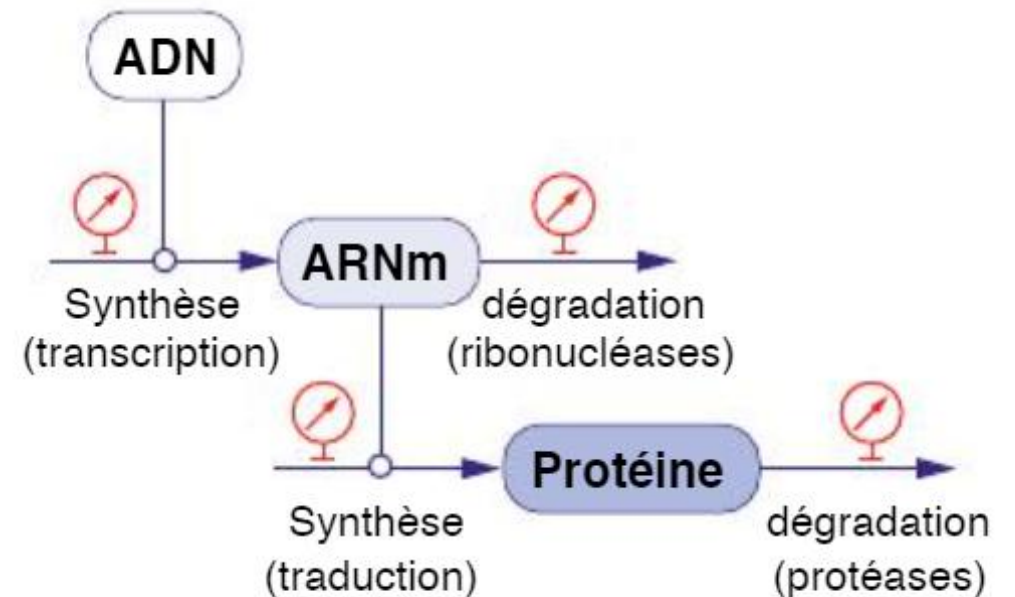
## Capacités exigibles

- Relier le contrôle de l'expression génétique à la différenciation et la spécialisation cellulaire.
- Illustrer, à partir de l'exemple du **gène FLC**, le lien entre conditions climatiques, état de condensation de la chromatine et expression génétique.

## INTRODUCTION

“Once information has gotten into a protein, it can't get out again.”  
Francis Crick, 1956

- L'ADN contient l'information génétique permettant de synthétiser toutes les protéines d'un organisme.
- L'ensemble de ces informations n'est pas exprimé de manière simultanée dans toutes les cellules : il existe une régulation de leur expression.
- Cette régulation peut être provoquée par un élément du milieu extérieur ou non.
- La régulation de la synthèse protéique s'effectue à différents niveaux :
  - Taux de transcription
  - Stabilité des ARNm
  - Taux de traduction
  - Stabilité de la protéine



*Lieux de régulation de l'expression génétique*

**Quels sont les mécanismes permettant de réguler le taux de transcription des gènes ?**

# PLAN DU COURS

## I. Mise en évidence d'un contrôle de l'expression de l'information génétique

- A. Diversité du transcriptome chez les pluricellulaires
- B. L'expression du génome peut être étudiée grâce à différentes techniques de biologie moléculaire
- C. La variation du transcriptome peut être contrôlée par les facteurs environnementaux
- D. L'expression de gènes est contrôlée par des facteurs internes

## II. Le contrôle épigénétique pré-transcriptionnel agit au niveau de la compaction de la chromatine

- A. Mise en évidence
- B. Les modifications covalentes des histones
- C. Application dans le cas de la vernalisation

## III. Le contrôle épigénétique pré-transcriptionnel agit au niveau de l'ADN

- A. Modification de l'ADN par méthylation
- B. Modification à l'échelle d'un chromosome

## IV. Le contrôle de l'initiation de la transcription par les séquences CIS et facteurs TRANS

- A. Définitions
- B. Séquences enhancers et silencers
- C. Facteurs TRANS: protéines régulatrices

## V. Les petites ARN régulateurs

- A. Mise en évidence fortuite des ARNi
- B. Elucidation du mode d'action des ARNi
- C. Intérêt évolutif des ARNi

## VI. Réflexion autour de l'épigénétique

- A. Définitions
- B. Transmission des modifications épigénétiques

# PLAN DU COURS

## I. Mise en évidence d'un contrôle de l'expression de l'information génétique

- A. Diversité du transcriptome chez les pluricellulaires
- B. L'expression du génome peut être étudiée grâce à différentes techniques de biologie moléculaire
- C. La variation du transcriptome peut être contrôlée par les facteurs environnementaux
- D. L'expression de gènes est contrôlée par des facteurs internes

## II. Le contrôle épigénétique pré-transcriptionnel agit au niveau de la compaction de la chromatine

- A. Mise en évidence
- B. Les modifications covalentes des histones
- C. Application dans le cas de la vernalisation

## III. Le contrôle épigénétique pré-transcriptionnel agit au niveau de l'ADN

- A. Modification de l'ADN par méthylation
- B. Modification à l'échelle d'un chromosome

## IV. Le contrôle de l'initiation de la transcription par les séquences CIS et facteurs TRANS

- A. Définitions
- B. Séquences enhancers et silencers
- C. Facteurs TRANS: protéines régulatrices

## V. Les petites ARN régulateurs

- A. Mise en évidence fortuite des ARNi
- B. Elucidation du mode d'action des ARNi
- C. Intérêt évolutif des ARNi

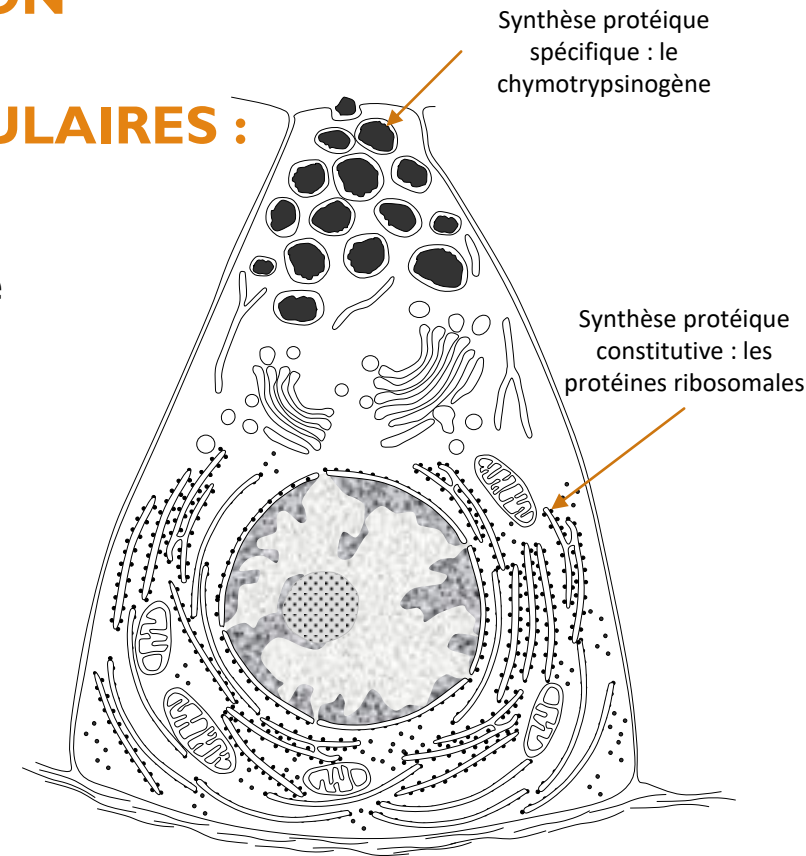
## VI. Réflexion autour de l'épigénétique

- A. Définitions
- B. Transmission des modifications épigénétiques

# I. MISE EN EVIDENCE D'UN CONTROLE DE L'INFORMATION GENETIQUE

## A. DIVERSITE DU TRANSCRIPTOME CHEZ LES PLURICELLULAIRES : PLURICELLULARITE ET SPECIALISATION CELLULAIRE

- Eucaryotes souvent **pluricellulaires**, organisés en tissus **spécialisés**, qui malgré un même génome, produisent :
  - Des protéines constitutives (ex : les protéines ribosomales)
  - Des protéines spécifiques d'un tissu donné (ex : le chymotrypsinogène de la CAP)
- Evolution progressive de l'ARN transcrit durant le développement
- Un même génome à **l'origine de transcriptomes** (= ensemble de l'ARN) différents, eux-mêmes à l'origine de protéomes différents (= phénotype moléculaire) → **spécialisation** associée à une **différenciation cellulaire**
- Il doit exister des **mécanismes de contrôle** de l'expression génétique (dont la transcription) propres au Eucaryotes.



*La cellule acineuse pancréatique, une cellule spécialisée Eucaryote*

# PLAN DU COURS

## I. Mise en évidence d'un contrôle de l'expression de l'information génétique

- A. Diversité du transcriptome chez les pluricellulaires
- B. L'expression du génome peut être étudiée grâce à différentes techniques de biologie moléculaire
- C. La variation du transcriptome peut être contrôlée par les facteurs environnementaux
- D. L'expression de gènes est contrôlée par des facteurs internes

## II. Le contrôle épigénétique pré-transcriptionnel agit au niveau de la compaction de la chromatine

- A. Mise en évidence
- B. Les modifications covalentes des histones
- C. Application dans le cas de la vernalisation

## III. Le contrôle épigénétique pré-transcriptionnel agit au niveau de l'ADN

- A. Modification de l'ADN par méthylation
- B. Modification à l'échelle d'un chromosome

## IV. Le contrôle de l'initiation de la transcription par les séquences CIS et facteurs TRANS

- A. Définitions
- B. Séquences enhancers et silencers
- C. Facteurs TRANS: protéines régulatrices

## V. Les petites ARN régulateurs

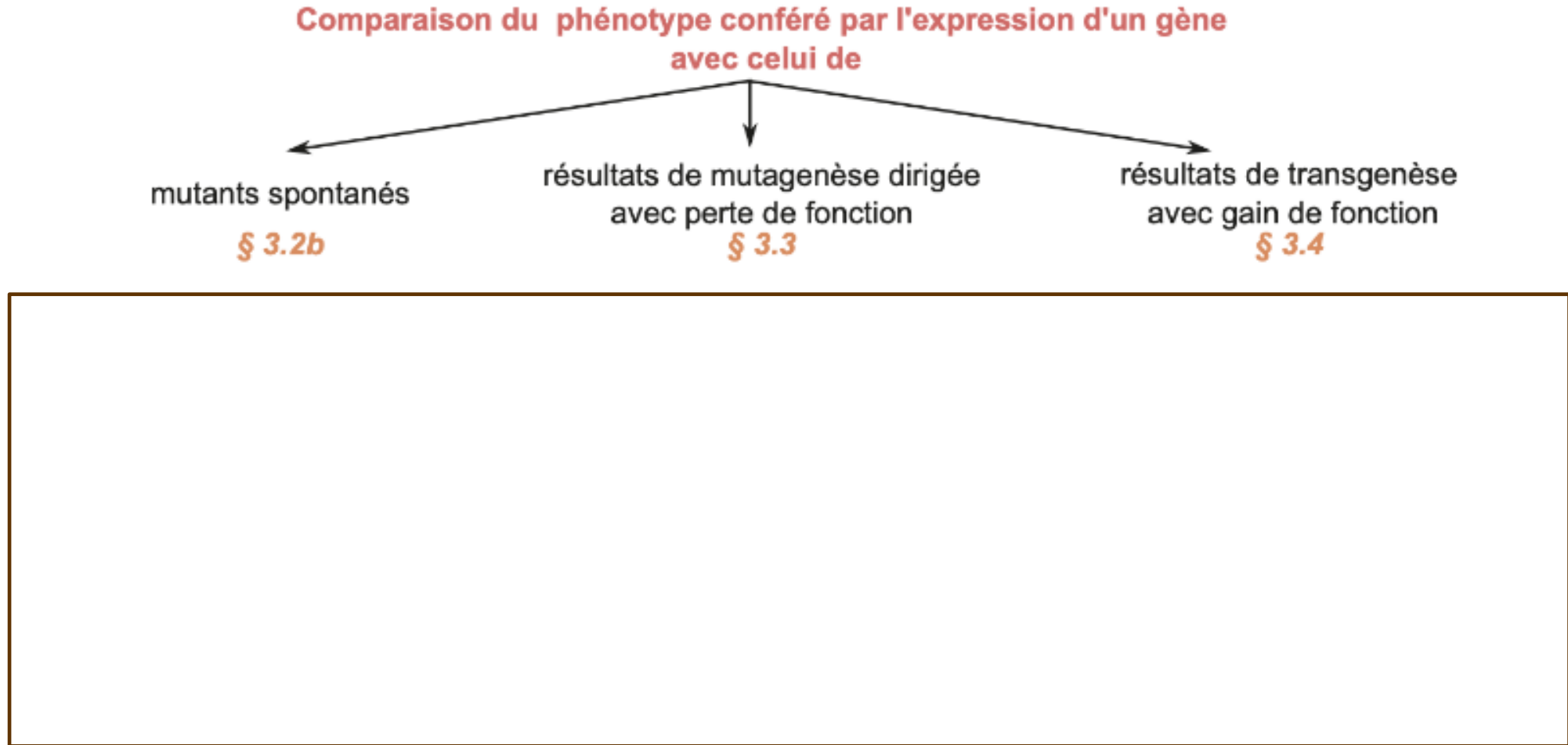
- A. Mise en évidence fortuite des ARNi
- B. Elucidation du mode d'action des ARNi
- C. Intérêt évolutif des ARNi

## VI. Réflexion autour de l'épigénétique

- A. Définitions
- B. Transmission des modifications épigénétiques

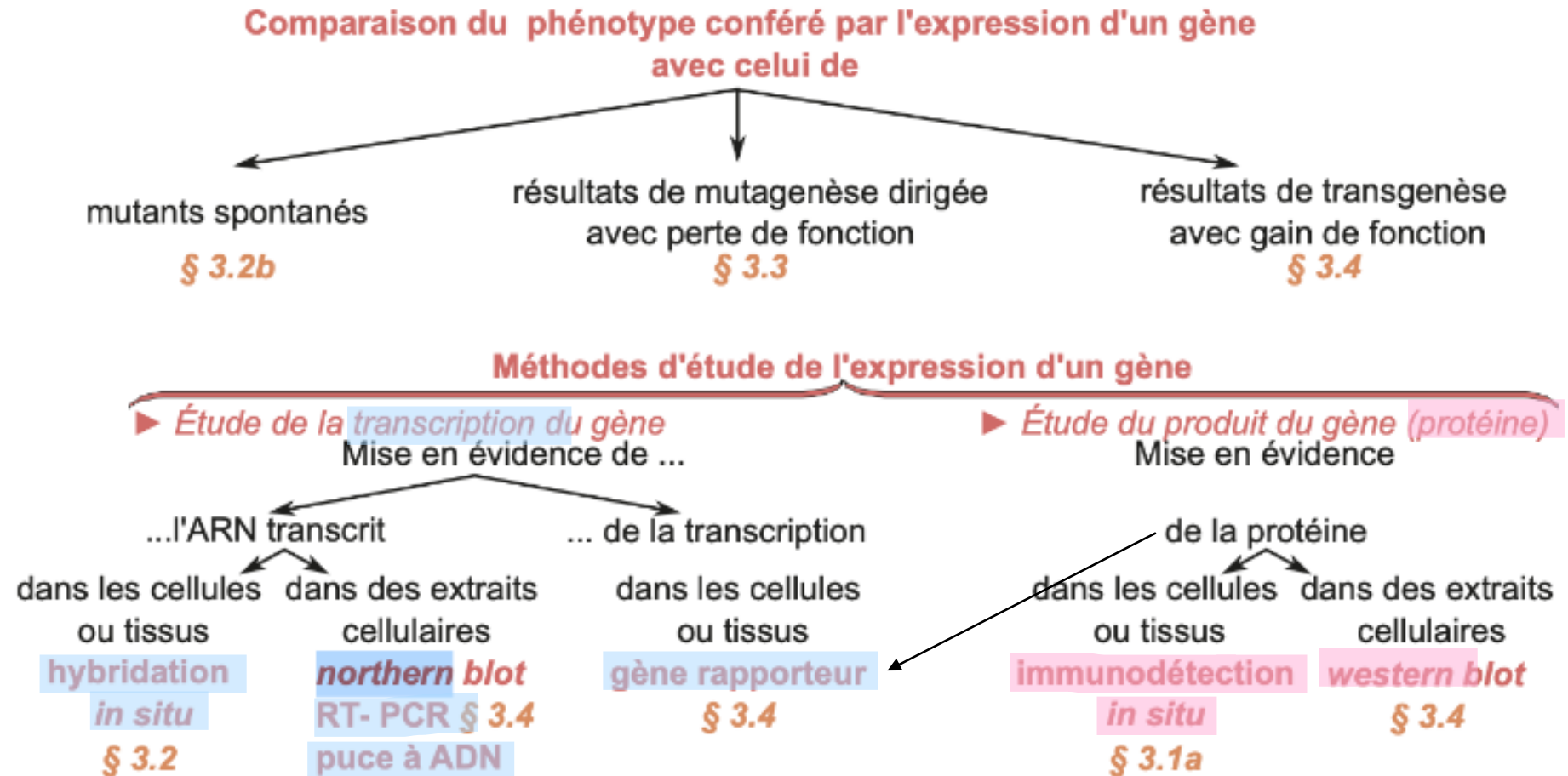
# I. MISE EN EVIDENCE D'UN CONTROLE DE L'INFORMATION GENETIQUE

## B. L'EXPRESSION DU GENOME PEUT ETRE ETUDIEE GRÂCE À DIFFÉRENTES TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE



# I. MISE EN EVIDENCE D'UN CONTROLE DE L'INFORMATION GENETIQUE

## B. L'EXPRESSION DU GENOME PEUT ETRE ETUDIEE GRÂCE À DIFFÉRENTES TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE



# I. MISE EN EVIDENCE D'UN CONTROLE DE L'INFORMATION GENETIQUE

## B. L'EXPRESSION DU GENOME PEUT ETRE ETUDIEE GRACE A DIFFERENTES TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

### I. Etude de la fonction d'un gène

- Comparaison de différents phénotypes ⇒ comprendre les conséquences de l'expression de gènes d'intérêt et envisager d'éventuelles applications thérapeutiques ou agronomiques.
- Techniques de biologie moléculaire:
  - **mutagenèse aléatoire**
  - **mutagenèse ciblée**
    - ✓ **inactivation des gènes par Knock-Out (KO)**
    - ✓ **Transgenèse**

# I. MISE EN EVIDENCE D'UN CONTROLE DE L'INFORMATION GENETIQUE

## B. L'EXPRESSION DU GENOME PEUT ETRE ETUDIEE GRACE A DIFFERENTES TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE



### I. Etude de la fonction d'un gène

#### ▪ mutagenèse aléatoire

- **agents chimiques** (acide nitrique, 5-bromo-uracile, colchicine, etc.) ou **physiques** (rayonnements ionisants ou UV) = **mutagènes**
  - ⇒ **erreurs d'appariements** (si erreurs non corrigées) ou **lésions** de l'ADN
  - ⇒ **mutations aléatoires**
  - ⇒ **phénotypes mutants (-/-)** sélectionnés (anomalie de l'organisation des fleurs, des membres, disparition de l'aptitude à réaliser une réaction métabolique, etc)
    - ✓ Identification du gène muté et de son rôle
    - ✓ criblage des mutants fastidieux

# I. MISE EN EVIDENCE D'UN CONTROLE DE L'INFORMATION GENETIQUE

## B. L'EXPRESSION DU GENOME PEUT ETRE ETUDIEE GRACE A DIFFERENTES TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE



### I. Etude de la fonction d'un gène

#### ■ mutagenèse ciblée

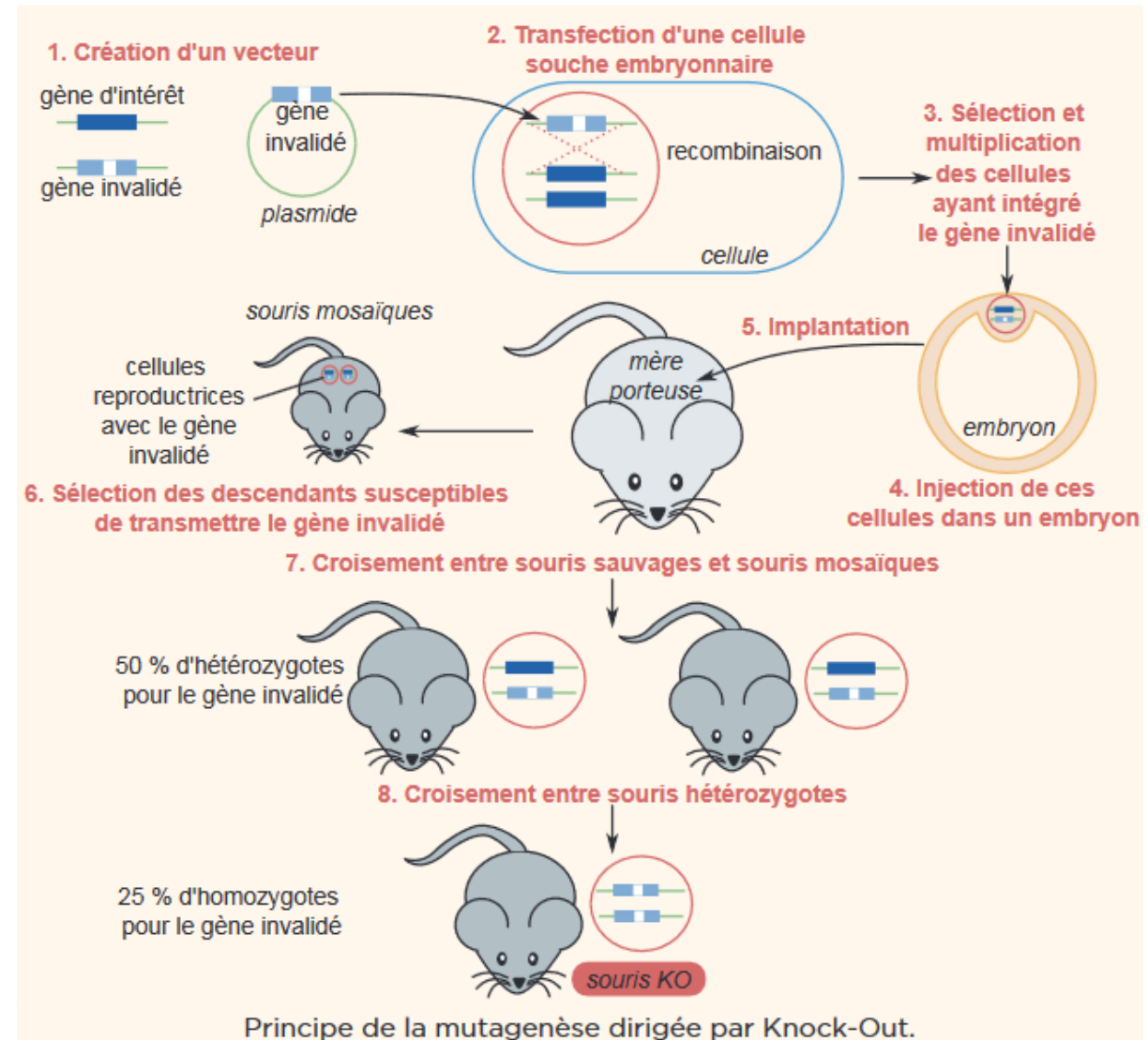
➤ agents biologiques (ARN interférents, CRISPR-Cas9, plasmide dans le cas d'une transgénèse)

⇒ Absence de transcription du gène d'intérêt ou absence de traduction de l'ARNm

⇒ phénotypes mutants (-/-) sélectionnés

⇒ Identification du rôle du gène muté

✓ criblage des mutants facile mais +/- coûteux et long



# I. MISE EN EVIDENCE D'UN CONTROLE DE L'INFORMATION GENETIQUE

## B. L'EXPRESSION DU GENOME PEUT ETRE ETUDIÉE GRÂCE À DIFFÉRENTES TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE



### I. Etude de la fonction d'un gène



#### ▪ mutagenèse ciblée

##### ➤ agents biologiques (CRISPR- Cas9)

- ✓ CRISPR: fragments d'ARN
- ✓ Cas9: enzymes (nucléase)

##### ➤ Soit ajout d'un brin d'ADN du gène d'intérêt

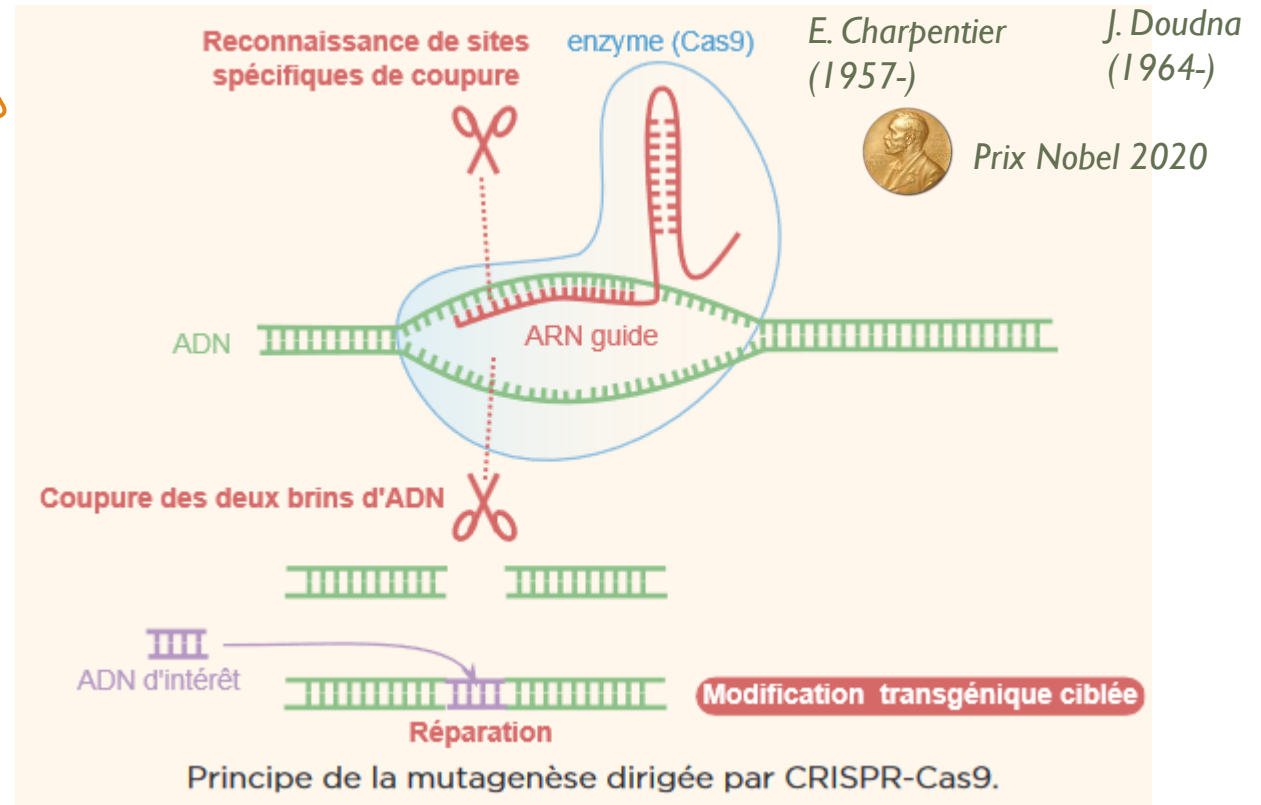
⇒ Phénotypes sauvages (+/+) à la place des mutants

##### ➤ Soit jonction des extrémités non homologues (perte du gène)

⇒ phénotypes mutants (-/-) sélectionnés

⇒ Identification du rôle du gène muté

✓ criblage des mutants facile mais +/- coûteux et long



Le système CRISPR-Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) utilise pour cela un ARN-guide qui, en se liant à un site spécifique de l'ADN, oriente l'enzyme Cas-9 qui coupe alors l'ADN ; on parle de « ciseaux moléculaires ». La transgénèse utilise ces propriétés pour insérer entre ces extrémités libres une séquence d'intérêt (nouvelle séquence ou séquence inactivée) sous le contrôle d'un promoteur choisi ; La séquence d'intérêt fait alors partie du génome modifié.

# I. MISE EN EVIDENCE D'UN CONTROLE DE L'INFORMATION GENETIQUE

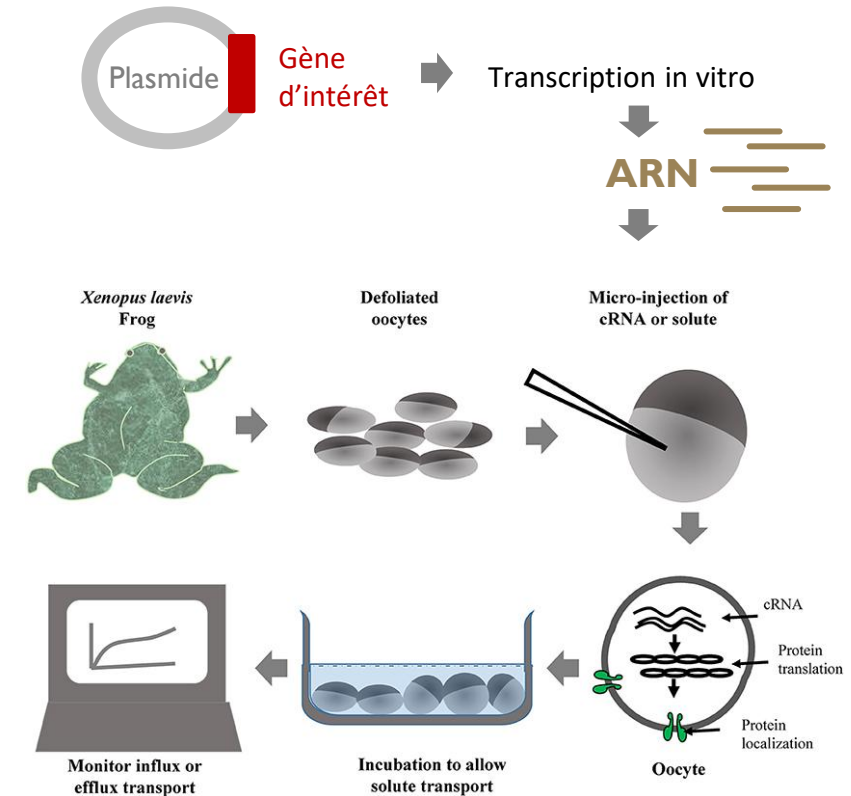
## B. L'EXPRESSION DU GENOME PEUT ETRE ETUDIEE GRACE A DIFFERENTES TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE



### I. Etude de la fonction d'un gène

- **transgénèse : introduction d'un gène étranger (gène d'intérêt) dans le génome d'un organisme hôte receveur**
- **agents biologiques (plasmide bactérien avec gène de résistance aux antibiotiques favorisant l'identification des bactéries transformées)**
  - ⇒ **Expression du gène transfecté**
  - ⇒ **phénotypes mutants sélectionnés (résistance aux antibiotiques)**
  - ⇒ **Identification du rôle du gène muté par comparaison avec le phénotype sauvage**
  - ✓ **Exemple de l'expression des aquaporines dans les ovocytes de Xénope**

Cf SV-C-3 p.34

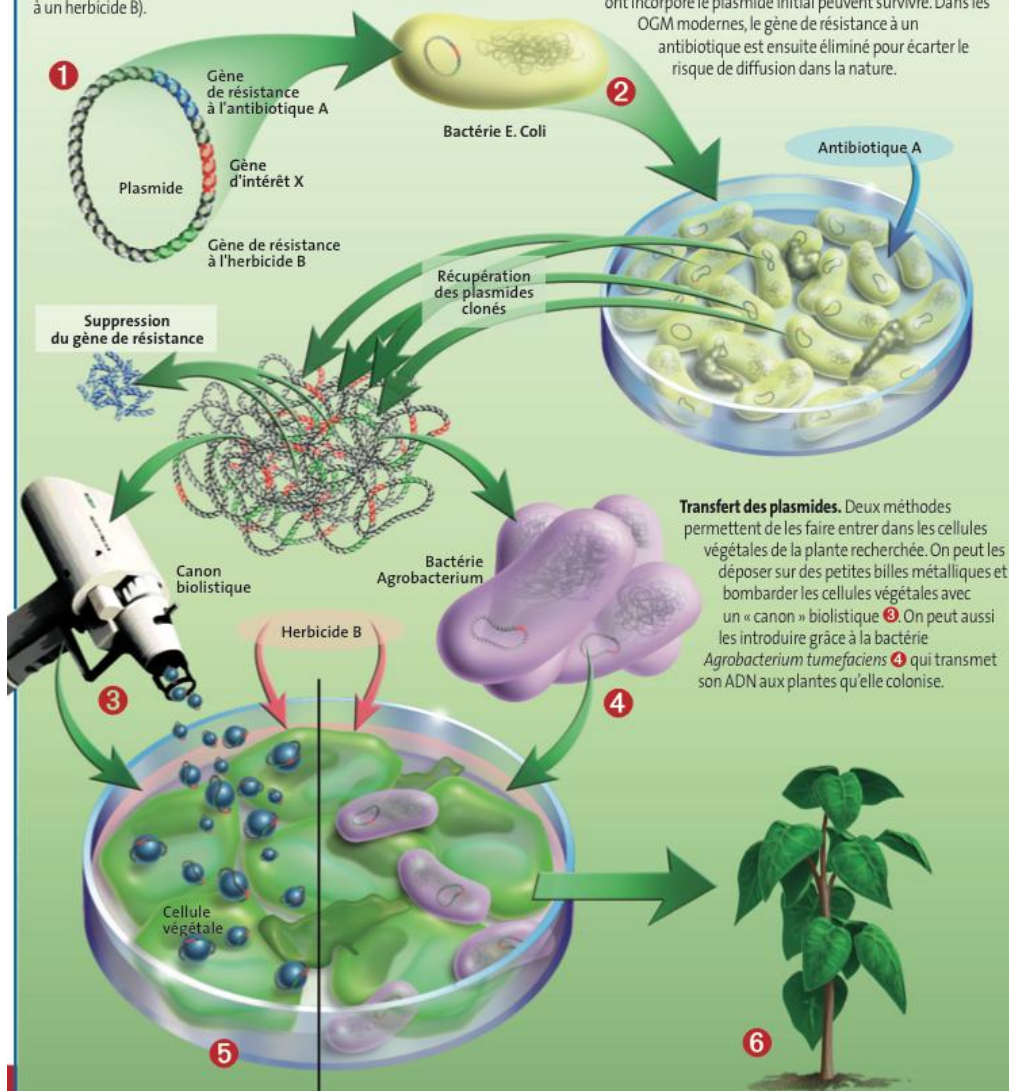


ovocytes de Xénope = peu de canaux endogènes et de grande taille → bon système d'étude pour des transporteurs ou canaux (ex: aquaporine)

# Comment fabrique-t-on un OGM ?

**Préparation d'un plasmide 1.** Un plasmide (morceau d'ADN circulaire) est préparé pour comporter le gène d'intérêt X. Deux autres gènes sont inclus pour contrôler la réussite de la transformation génétique (un gène de résistance à un antibiotique A, et un gène de résistance à un herbicide B).

**Clonage.** L'ADN transformé est introduit dans des bactéries *Escherichia coli* 2 qui vont rapidement se multiplier à l'identique, clonant ainsi le plasmide. Au milieu de culture de ces bactéries a été ajouté l'antibiotique A : seules les bactéries qui ont incorporé le plasmide initial peuvent survivre. Dans les OGM modernes, le gène de résistance à un antibiotique est ensuite éliminé pour écarter le risque de diffusion dans la nature.



**Dernière sélection cellulaire 5.** Les cellules végétales désormais transformées vont être placées dans un milieu de culture contenant l'herbicide B. Seules celles qui ont incorporé la construction génétique de départ pourront y résister et se multiplier.

**Culture de l'OGM 6.** Les cellules végétales donneront des plantules, puis la plante génétiquement modifiée et porteuse du gène d'intérêt X.

Cf SV-A-2 p. 177

1. Identification du **gène d'intérêt** dans une espèce (ex: gène de résistance à un herbicide)
2. **Isolement** du gène et **transfection** dans un **plasmide bactérien** ayant au préalable un **gène de résistance aux antibiotiques** → identification des **plasmides recombinants** par ajout d'antibio
3. Culture de la **bactérie transformée** après destruction du gène de résistance à l'antibiotique → pas de diffusion de résistance dans nature
4. Ultracentrifugation du milieu → récupération du plasmide recombinant
5. Canon biolistique sur *Agrobacterium tumefaciens* → transfection de la bactérie *A. tumefaciens*
6. Culture de cellules de Fabacées totipotentes avec *A. tumefaciens* → transmission du gène d'intérêt
7. Sélection des cellules végétales résistantes au Round up (= herbicide)
8. Culture des cellules génétiquement modifiées en plantules = OGM



# I. MISE EN EVIDENCE D'UN CONTROLE DE L'INFORMATION GENETIQUE

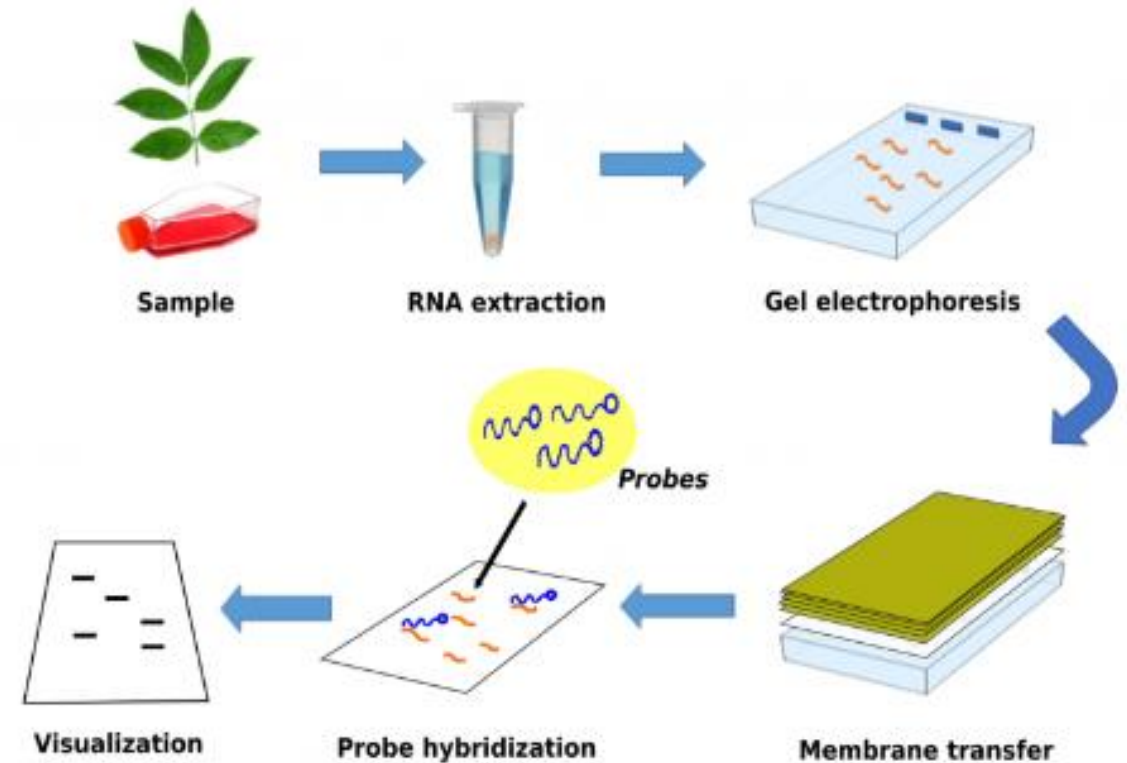
## B. L'EXPRESSION DU GENOME PEUT ETRE ETUDIEE GRACE A DIFFERENTES TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE



### 2. Etude de l'expression d'un gène

**Transcriptome** (n.m.): ensemble des ARN transcrits codants et non-codants présents dans une cellule

- Gène ⇒ il s'agit de vérifier si le gène présente un **patron d'expression** compatible avec la fonction proposée.
  - Variation au cours du temps et selon l'environnement cellulaire
- **détection des ARNm :**
  - Northern blot et RT-PCR (quantitatif) ou hybridation *in situ* (patron d'expression mais moins quantitatif).
  - **Puces à ADN** ⇒ **transcriptome** d'une cellule



*Etude de l'expression des gènes par étude des ARNm  
par Northern Blot ([hVps://tribioscience.com/](http://tribioscience.com/))*

# I. MISE EN EVIDENCE D'UN CONTROLE DE L'INFORMATION GENETIQUE

## B. L'EXPRESSION DU GENOME PEUT ETRE ETUDIEE GRACE A DIFFERENTES TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

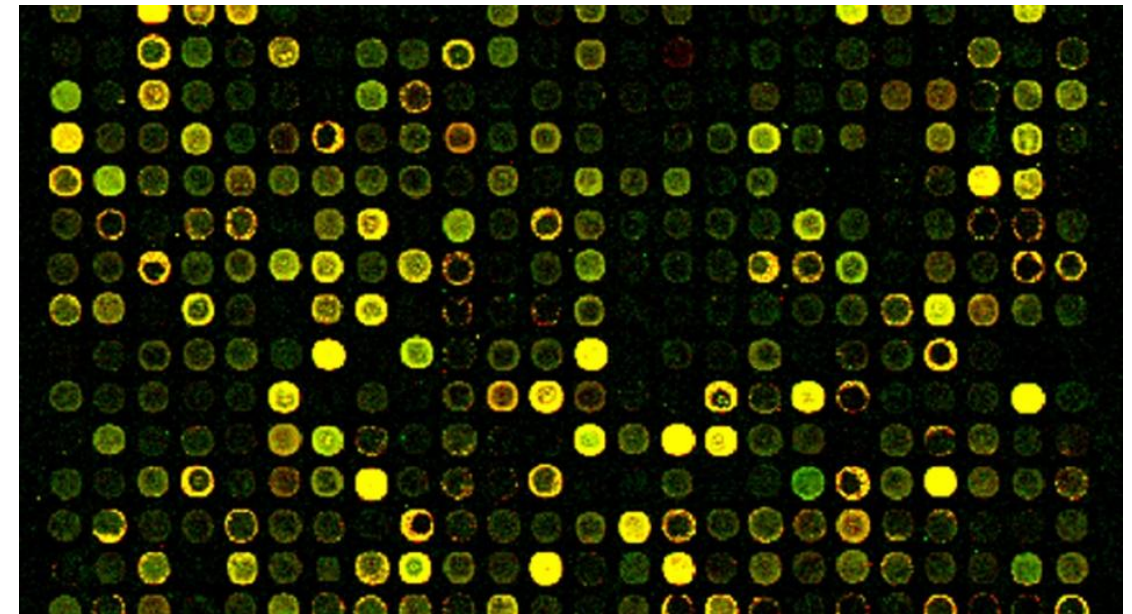


### 2. Etude de l'expression d'un gène

**Transcriptome** (n.m.): ensemble des ARN transcrits codants et non-codants présents dans une cellule

Gène ⇒ **patron d'expression**

- **Puces à ADN** : recherche de la présence d'ARNm de plusieurs gènes connus et séquencés
  - Objectifs variés en médecine :
    - ✓ Amélioration génétique des races (canines, bovines, porcines) et sélection des reproducteurs
    - ✓ Recherche d'agents pathogènes
    - ✓ Efficacité de nouveaux traitements
    - ✓ Influence de l'environnement sur l'expression génétique
    - ✓ ...



*Résultats d'une puce à ADN utilisée pour connaître le transcriptome*

# I. MISE EN EVIDENCE D'UN CONTROLE DE L'INFORMATION GENETIQUE

## B. L'EXPRESSION DU GENOME PEUT ETRE ETUDIEE GRACE A DIFFERENTES TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

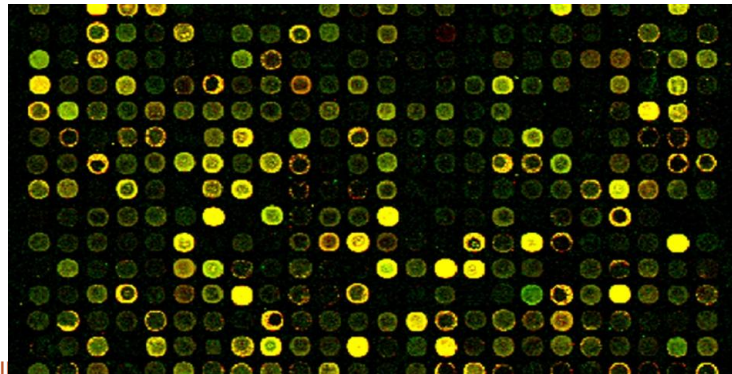
### 2. Etude de l'expression d'un gène

#### Fonctionnement de la puce à ADN :

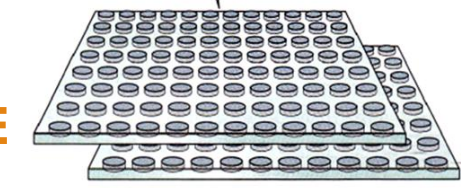
- Puce = plaque où des séquences de certains gènes préalablement identifiés et amplifiés sont déposés (**dépôts d'ARN ou d'ADNc**)

- **Amplification** et marquage des ARNm ou de leur ADNc (= complémentaire), obtenu par rétrotranscription.

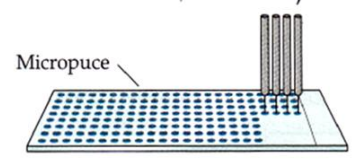
- Analyse de la quantité et du type de marquage obtenu au niveau de chaque zone de dépôt



1 Un ensemble de produits de PCR du génome complet du micro-organisme est généré...

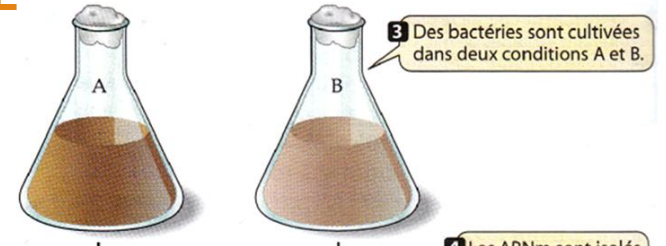


2 ... et une puce à ADN est préparée par un robot spécialisé.

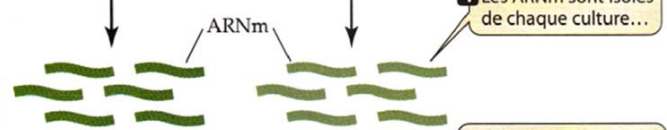


Analyse par micropuces à ADN.  
Étapes de l'analyse par puces à ADN de tous les gènes exprimés dans une bactérie particulière cultivée dans deux conditions différentes de laboratoire, désignées A et B. Ces conditions peuvent varier par leur environnement physique ou leur disponibilité en nutriment. Des cellules sauvages et mutantes peuvent également être comparées.

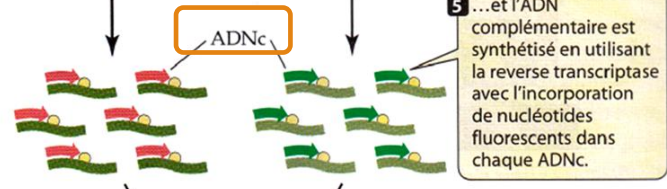
Principe de fonctionnement d'une puce à ADN (ici pour l'étude de micro-organismes)



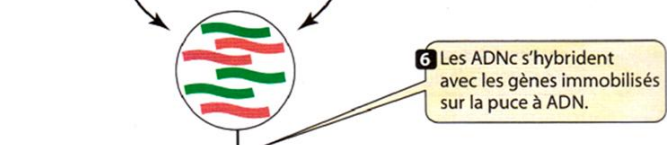
3 Des bactéries sont cultivées dans deux conditions A et B.



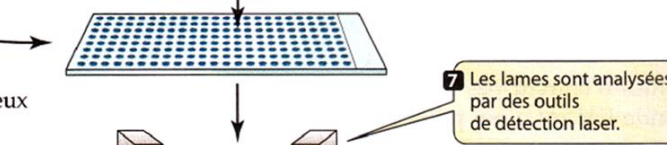
4 Les ARNm sont isolés de chaque culture...



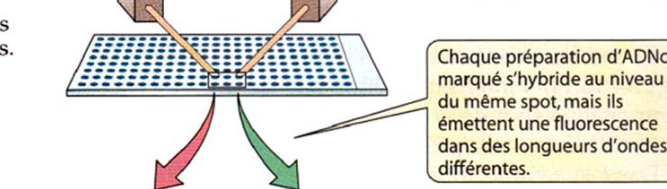
5 ...et l'ADN complémentaire est synthétisé en utilisant la reverse transcriptase avec l'incorporation de nucléotides fluorescents dans chaque ADNc.



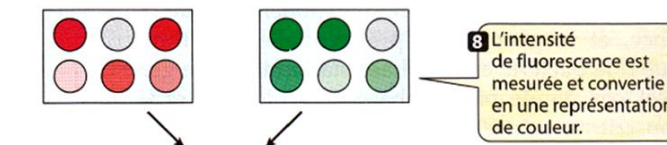
6 Les ADNc s'hybrident avec les gènes immobilisés sur la puce à ADN.



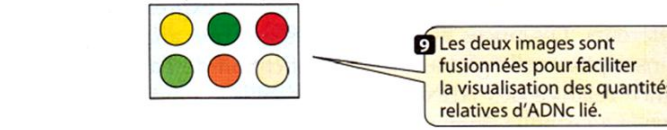
7 Les lames sont analysées par des outils de détection laser.



Chaque préparation d'ADNc marqué s'hybride au niveau du même spot, mais ils émettent une fluorescence dans des longueurs d'ondes différentes.



8 L'intensité de fluorescence est mesurée et convertie en une représentation de couleur.



9 Les deux images sont fusionnées pour faciliter la visualisation des quantités relatives d'ADNc lié.

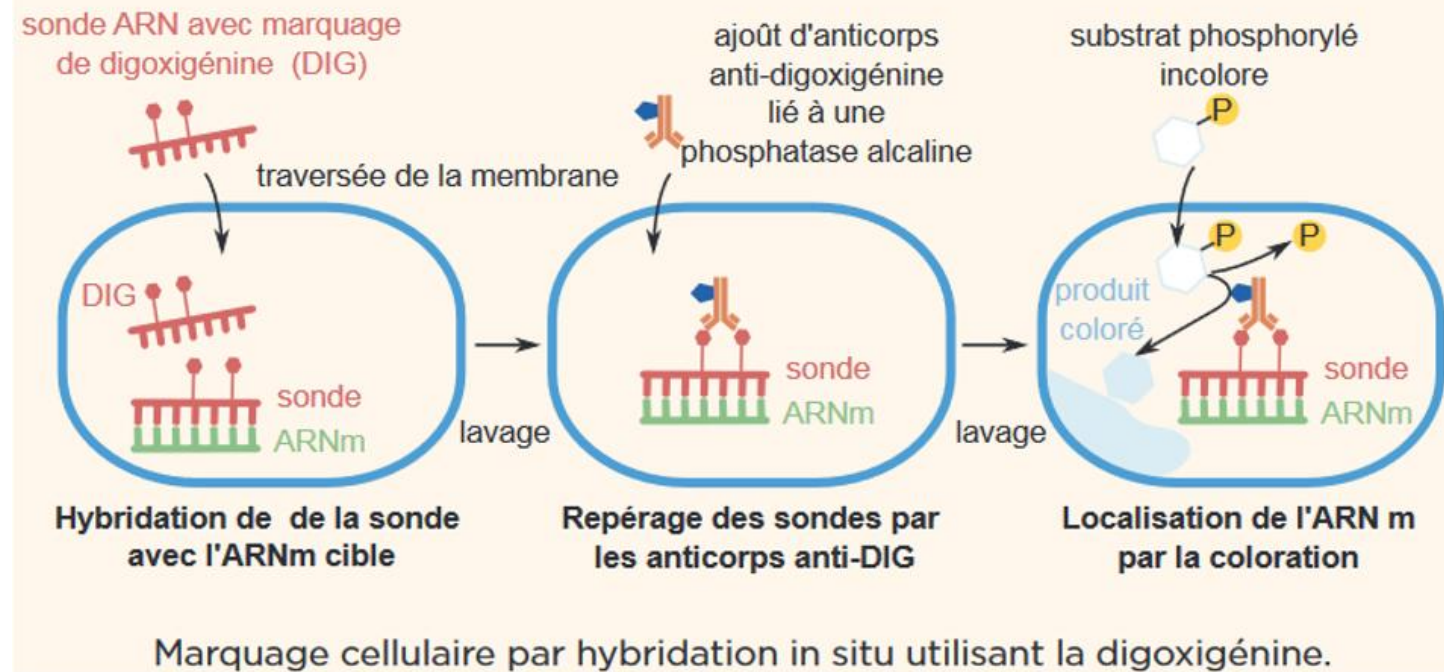
# I. MISE EN EVIDENCE D'UN CONTROLE DE L'INFORMATION GENETIQUE

## B. L'EXPRESSION DU GENOME PEUT ETRE ETUDIEE GRACE A DIFFERENTES TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

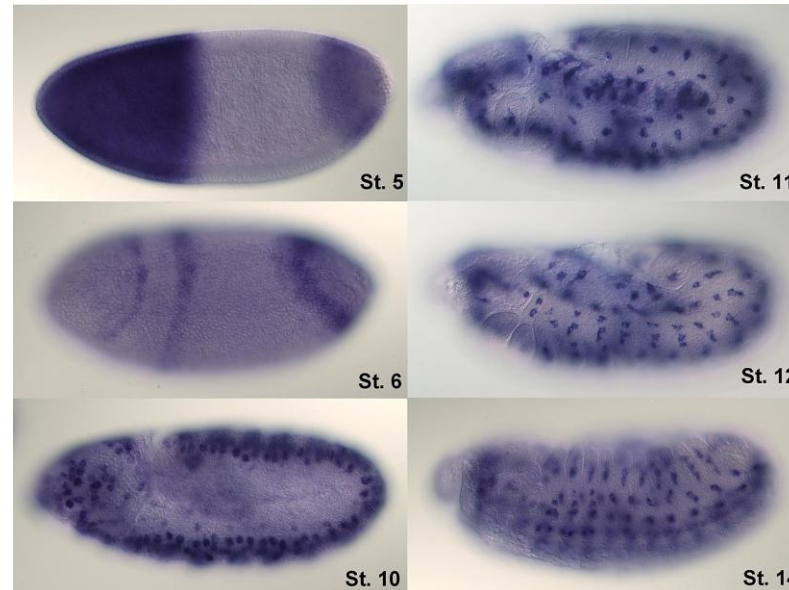
### 2. Etude de l'expression d'un gène

#### Hybridation in situ

- **Sondes** nucléotidiques marquées:
  - ✓ **Isotopes radioactifs** ( $H^3$ ,  $P^{32}$ )
  - ✓ **Fluorophores** (cyanine), dérivés fluorescents (DAPI 4', 6-diamidino-2-phenylindole, FITC Fluorescein isothiocyanate)
  - ✓ **Produits non fluorescents** (digoxigénine = molécule lipophile se liant à des Ac)
- Localisation de l'ARNm par coloration, analyse qualitative et quantitative



Source Dunod



Hybridation in situ sur une drosophile "Wild type" pour l'ARN du gène Hunchback (source Wikipédia)<sub>19</sub>



# I. MISE EN EVIDENCE D'UN CONTROLE DE L'INFORMATION GENETIQUE

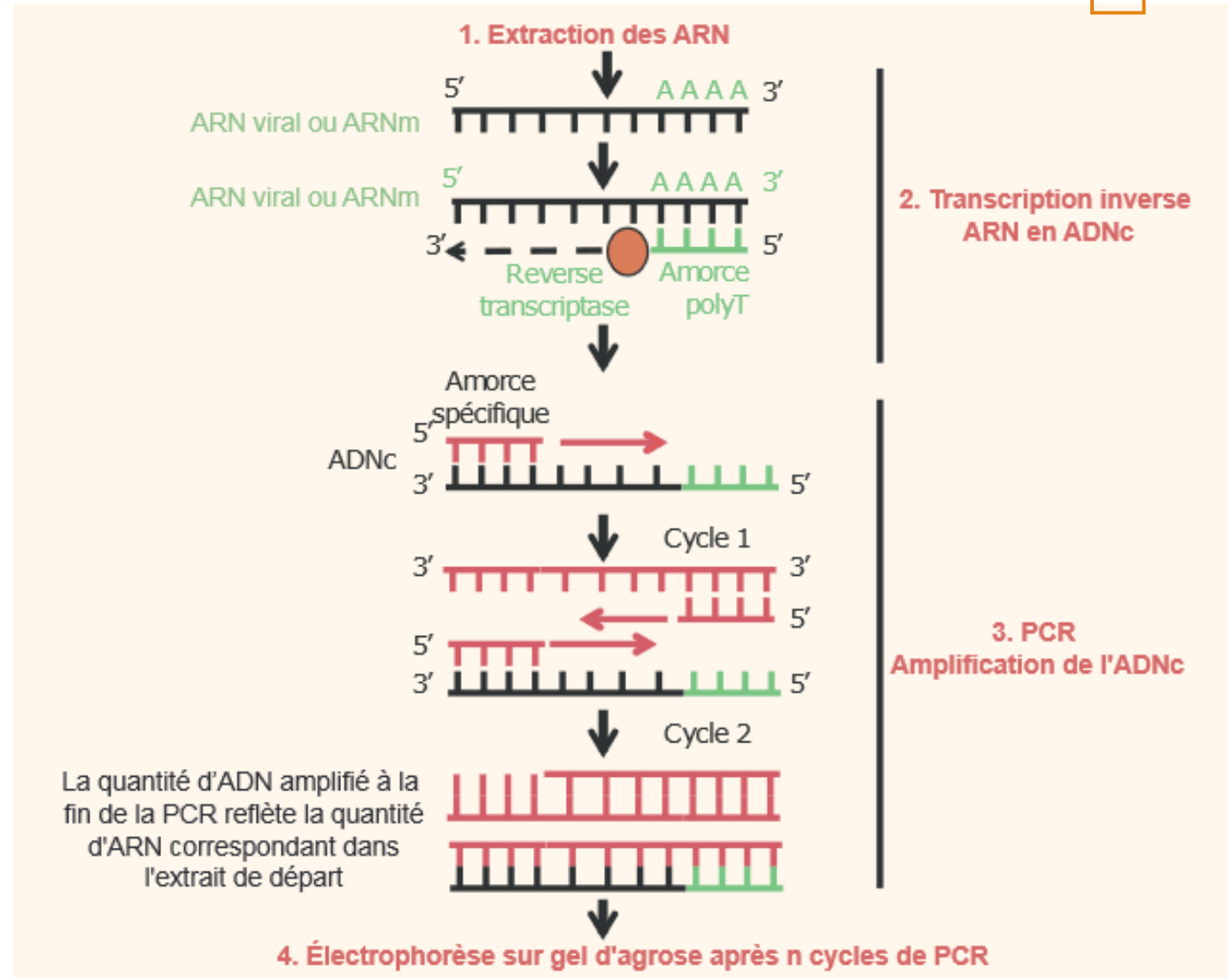
## B. L'EXPRESSION DU GENOME PEUT ETRE ETUDIEE GRACE A DIFFERENTES TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE



### 2. Etude de l'expression d'un gène

#### La q RT-PCR

- **Amplification d'un ARN** afin d'en détecter des présences même minimales:
  - ✓ Extraction des ARN (viraux par exemple)
  - ✓ **Transcription inverse** par une transcriptase inverse via amorces → obtention d'ADNc
  - ✓ Amplification des ADNc par PCR (taqPol, amorces, nucléotides et variations cycliques de T°C)
- Après un nombre de cycles imposé (souvent 40): quantification de l'ARN initial
  - ✓ Utilisation dans la détection de virus (cf SarsCov2)



# I. MISE EN EVIDENCE D'UN CONTROLE DE L'INFORMATION GENETIQUE

## B. L'EXPRESSION DU GENOME PEUT ETRE ETUDIEE GRACE A DIFFERENTES TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

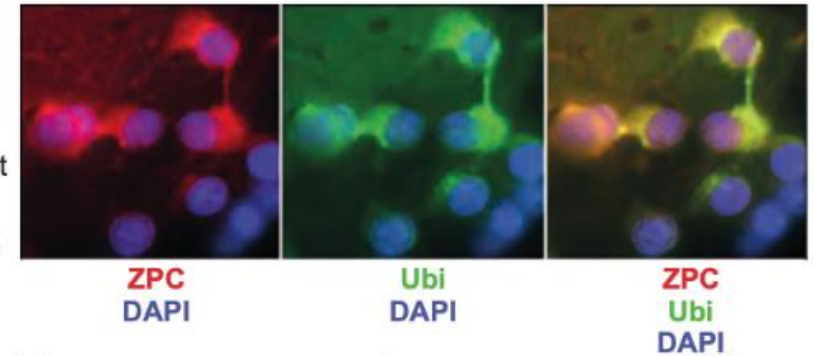
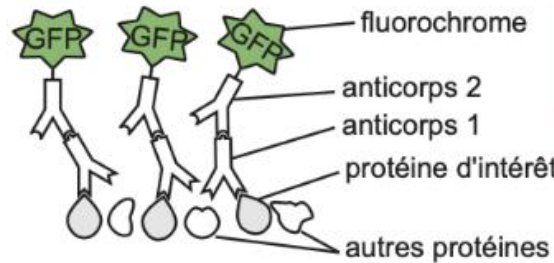
### 2. Etude de l'expression d'un gène

#### Détection des protéines

- Western blot
- Immunolocalisation
- ✓ Patron d'expression qualitatif mais non quantitatif



#### Immunolocalisation



(a) principe de l'immunomarquage.

(b) immunomarquage de ZPC et de l'ubiquitine.

(a) Après fixation des tissus et perméabilisation des membranes, les tissus sont traités par un anticorps primaire qui se fixe spécifiquement à la protéine d'intérêt. Après lavage, les tissus sont traités par un anticorps secondaire spécifiquement dirigé contre l'anticorps primaire. L'anticorps secondaire a été au préalable modifié de façon à être détectable (radioactif, couplé à une enzyme, à une bille métallique, ou comme ici, à un fluorochrome). (b) Exemple d'immunomarquage. Dans des cellules d'ovaire, on a détecté les protéines ZPC (fluorochrome rouge) et ubiquitine (fluorochrome vert), ainsi que les noyaux, par coloration de l'ADN au DAPI (bleu). La 3<sup>e</sup> image présente la superposition des deux fluorescences. La localisation des deux protéines est cytoplasmique, et le marquage jaune (droite) indique que les deux protéines colocalisent, donc sont probablement en interaction. (Modifié d'après Zimmerman et al., 2011., *PLoS ONE* 6(2): e17256).

*Etude de l'expression des gènes par étude des protéines (in Dunod, 2021)*



# I. MISE EN EVIDENCE D'UN CONTROLE DE L'INFORMATION GENETIQUE

## B. L'EXPRESSION DU GENOME PEUT ETRE ETUDIEE GRACE A DIFFERENTES TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

### 2. Etude de l'expression d'un gène

#### Détection des protéines

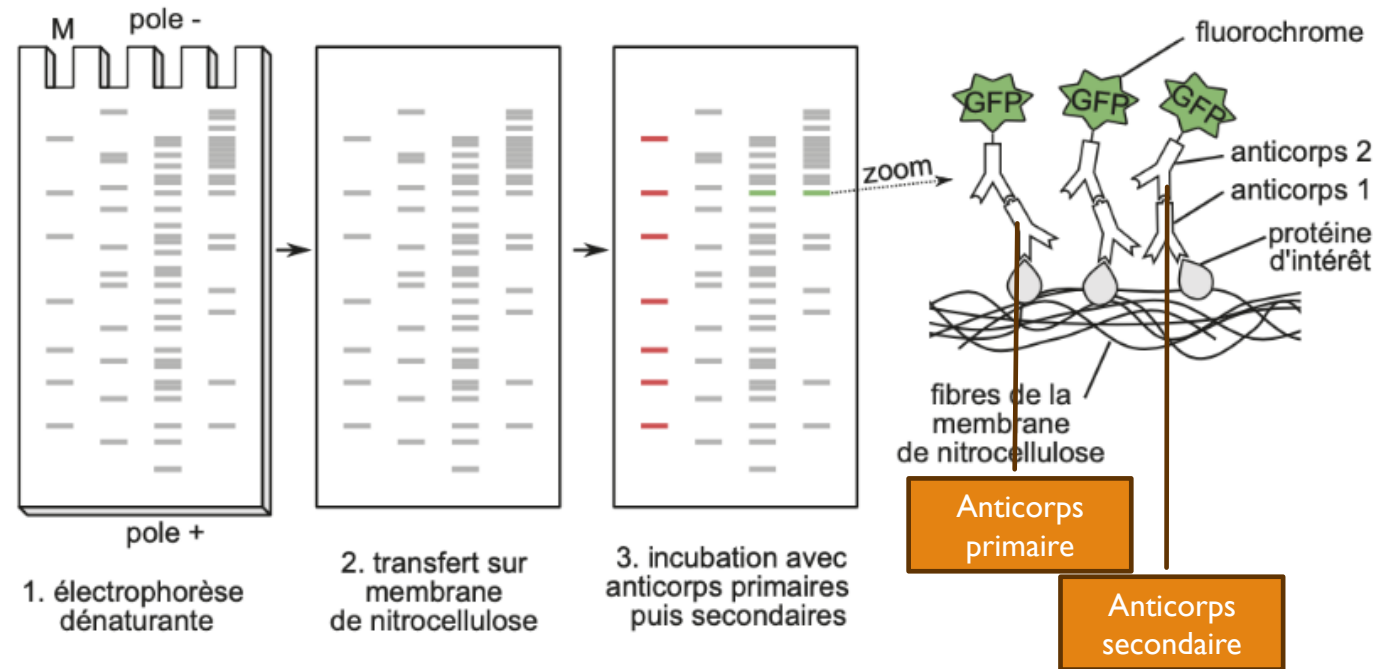
##### ■ Western blot

- Électrophorèse en **conditions dénaturantes**
- Nécessité d'un **témoin de charge** (actine, tubuline..)
- **Transfert sur membrane de nitrocellulose** pour buvardage
- **Utilisation d'Ac spécifiques** de la protéine recherchée

##### ■ Immunolocalisation

- ✓ Patron d'expression qualitatif mais non quantitatif

#### Western blot



TP **Biologie moléculaire**  
Etude de protéines en conditions dénaturantes

en conditions dénaturantes  
Analyse de documents  
Utilisation d'un logiciel de représentation moléculaire PyMol

START

Stéphanie Dalaine

*Etude de l'expression des gènes par étude des protéines (in Dunod, 2021)*

## ENTRAÎNEMENT

Expérimentalement, des fibroblastes d'embryons de souris cultivés en présence de certains agents pharmacologiques se différencient en myoblastes = les cellules précurseurs des muscles. A partir de ce modèle expérimental on a pu étudier les gènes qui contrôlent la myogénèse = la formation de cellules musculaires à partir de cellules indifférenciées.

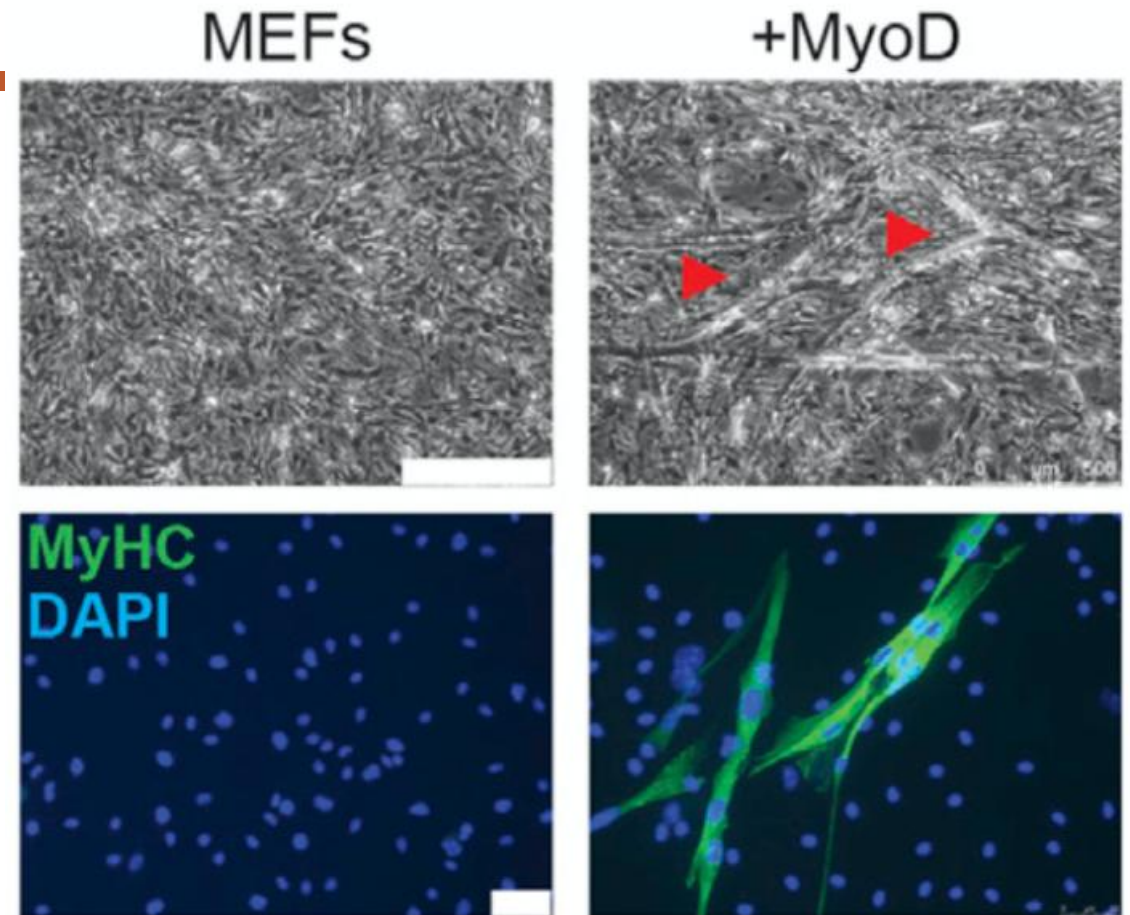
On teste ici l'effet de l'ajout du produit du gène MyoD sur des fibroblastes en culture (MEF : murine embryonic fibroblasts ; barre = 500µm). Les flèches indiquent les myotubes, des cellules en cours de différenciation en myocytes.

Deux immunomarquages ont été réalisés :

- DAPI : colore en bleu les noyaux des cellules
- MyHC : anticorps spécifique des chaînes lourdes de la myosine, protéine spécifique des cellules musculaires, couplé à un fluorochrome vert

Quel est l'intérêt d'utiliser le DAPI? un anticorps anti MyHC?  
Conclure sur le rôle de MyoD

Le DAPI colore les noyaux, ce marquage permet d'identifier les noyaux et donc les cellules sur la coupe. L'anticorps antiMyHC est spécifique des chaînes lourdes de myosine.



*Contrôle de la détermination des cellules musculaires (Bar-Nur et al., 2018, Relaix et al., 2016)*

On constate une fluorescence verte après ajout de MyoD aux fibroblastes murins. On en déduit que la protéine MyoD agit sur les fibroblastes et induit l'expression du gène codant la chaîne lourde de myosine par les fibroblastes: c'est un processus de différenciation. En outre, on observe un continuum cellulaire entre plusieurs fibroblastes grâce au DAPI: 3 noyaux dans une même cellule exprimant la myosine. On en déduit que MyoD induit la différenciation des fibroblastes en cellules musculaires: par une fusion de leur cytoplasme et l'expression de la chaîne lourde de myosine.

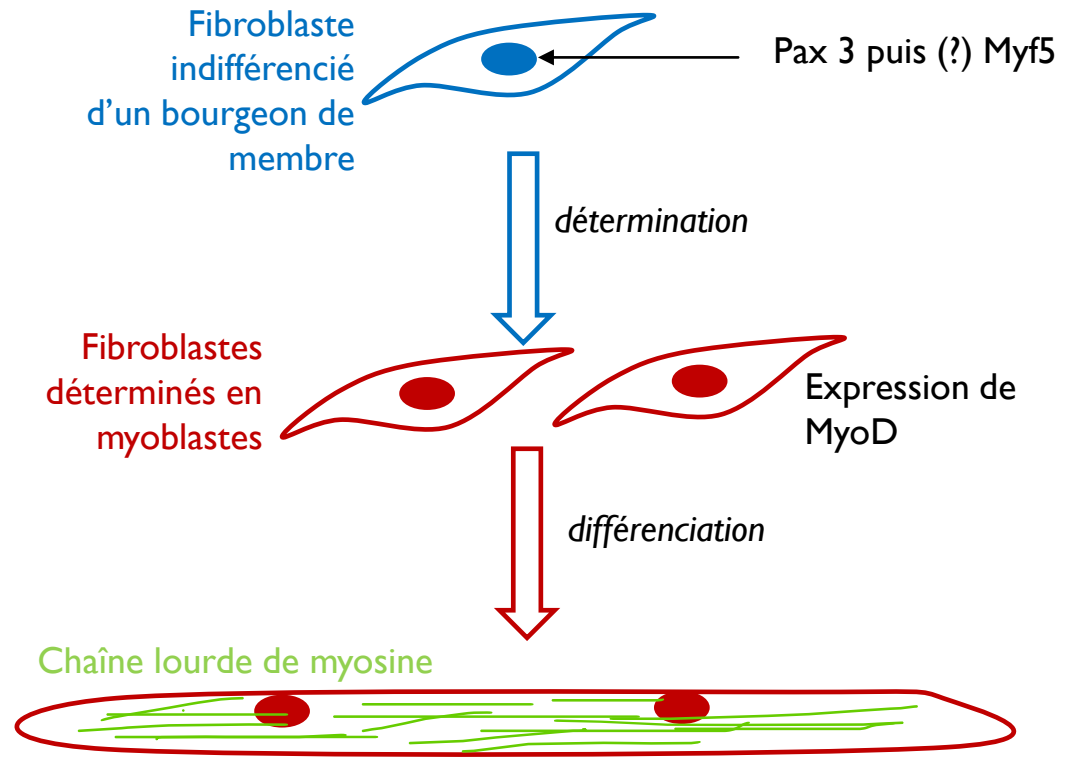
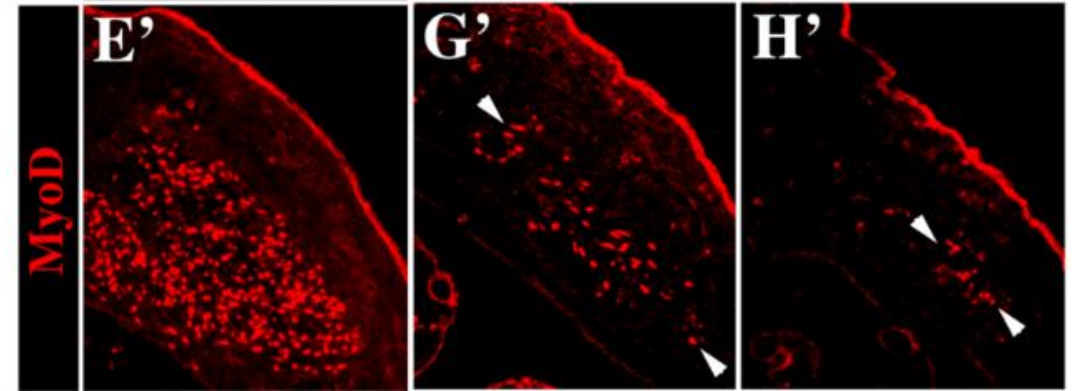
## ENTRAÎNEMENT (SUITE)

Une immunolocalisation a été réalisée avec des AC anti MyoD (en rouge) sur des tissus à l'origine de muscles chez des embryons de souris :

- sauvages : E'
- mutantes pour le gène Myf 5 : G'
- mutantes pour les gènes Myf 5 et Pax 3 : H'

### Interpréter les résultats

Chez le témoin (E'), on constate l'expression de la protéine induisant la différenciation en cellules musculaires MyoD au niveau d'un feuillet embryonnaire interne: les muscles sont en effet issus de la différenciation de fibroblastes situés sous le tégument. Dans le cas de souris Myf5(-/-), on observe une quantité de MyoD plus de 10 fois plus faible que chez les individus sauvages. On en déduit que MyoD s'exprime en présence de Myf5. En H', chez les doubles mutants Myf5 et Pax3, la MyoD ne s'exprime presque plus.



# PLAN DU COURS

## I. Mise en évidence d'un contrôle de l'expression de l'information génétique

- A. Diversité du transcriptome chez les pluricellulaires
- B. L'expression du génome peut être étudiée grâce à différentes techniques de biologie moléculaire
- C. La variation du transcriptome peut être contrôlée par les facteurs environnementaux
- D. L'expression de gènes est contrôlée par des facteurs internes

## II. Le contrôle épigénétique pré-transcriptionnel agit au niveau de la compaction de la chromatine

- A. Mise en évidence
- B. Les modifications covalentes des histones
- C. Application dans le cas de la vernalisation

## III. Le contrôle épigénétique pré-transcriptionnel agit au niveau de l'ADN

- A. Modification de l'ADN par méthylation
- B. Modification à l'échelle d'un chromosome

## IV. Le contrôle de l'initiation de la transcription par les séquences CIS et facteurs TRANS

- A. Définitions
- B. Séquences enhancers et silencers
- C. Facteurs TRANS: protéines régulatrices

## V. Les petites ARN régulateurs

- A. Mise en évidence fortuite des ARNi
- B. Elucidation du mode d'action des ARNi
- C. Intérêt évolutif des ARNi

## VI. Réflexion autour de l'épigénétique

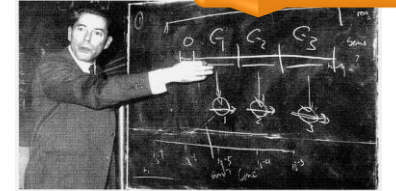
- A. Définitions
- B. Transmission des modifications épigénétiques

# I. MISE EN EVIDENCE D'UN CONTROLE DE L'INFORMATION GENETIQUE

## C. LA VARIATION DU TRANSCRIPTOME POUVANT ETRE CONTROLE PAR DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX

Cf SV-F-1-1

### I. Mise en évidence d'un contrôle par l'environnement chez les procaryotes

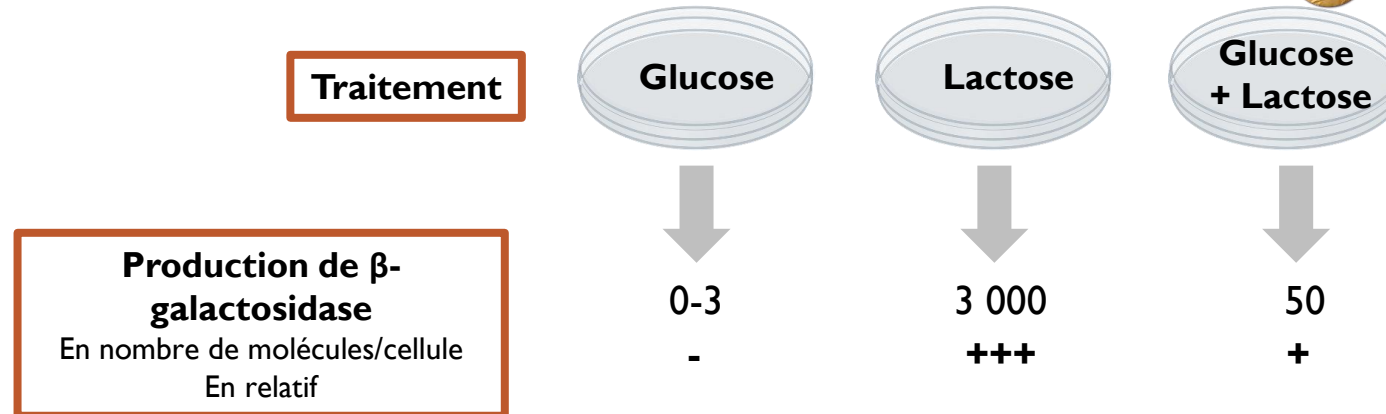


- Mise en culture de bactéries sur des milieux contenant diverses sources de C
- Mesure de la quantité de  $\beta$ -galactosidase produite

Jacques Monod, André Lwoff et François Jacob.  
Prix Nobel 1965 pour la découverte du fonctionnement de l'opéron lactose



#### Résultats



#### Interprétation

- La quantité de  $\beta$ -galactosidase produite traduit le taux de transcription.

Inhibition de la transcription de l'opéron ?

Activation de la transcription de l'opéron ?

???

# I. MISE EN EVIDENCE D'UN CONTROLE DE L'INFORMATION GENETIQUE

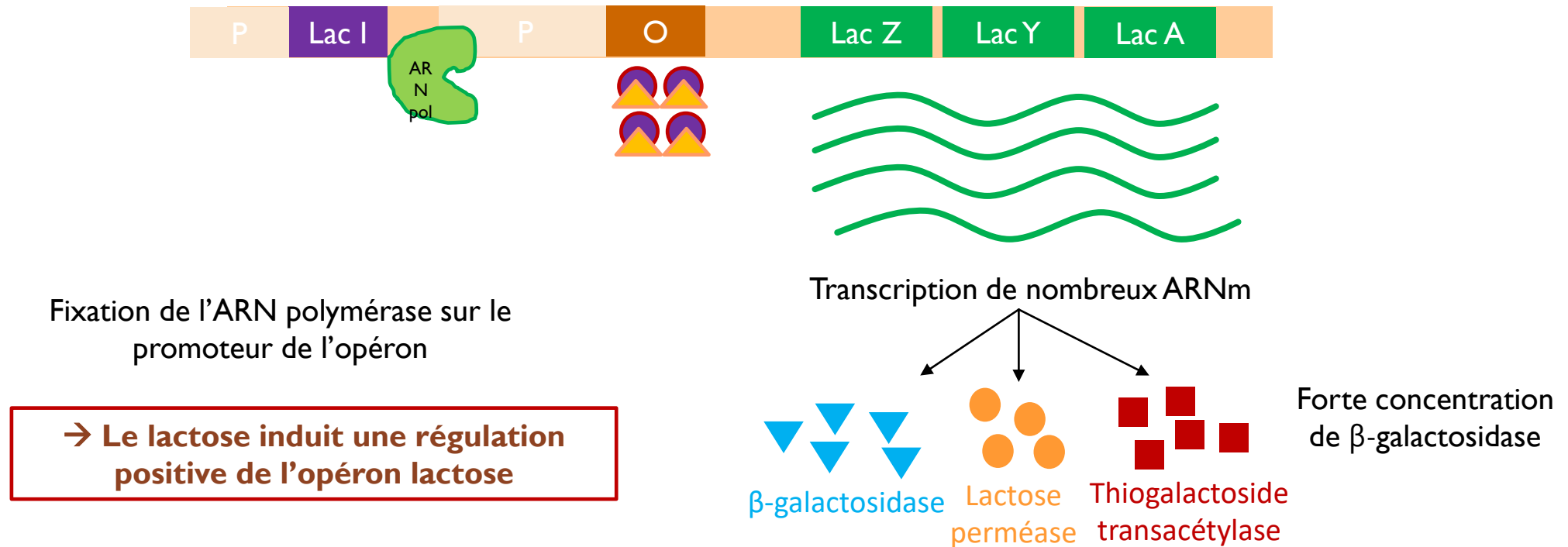
## C. LA VARIATION DU TRANSCRIPTOME POUVANT ETRE CONTROLE PAR DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX

Cf SV-F-1-1

### I. Mise en évidence d'un contrôle par l'environnement chez les procaryotes



- En présence de lactose et absence de glucose :



# I. MISE EN EVIDENCE D'UN CONTROLE DE L'INFORMATION GENETIQUE

## C. LA VARIATION DU TRANSCRIPTOME POUVANT ETRE CONTROLE PAR DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX

### 2. Exemple de la vernalisation chez les plantes

- Facteurs de l'environnement = signaux permettant d'adapter le développement des organismes aux conditions variables du milieu de vie

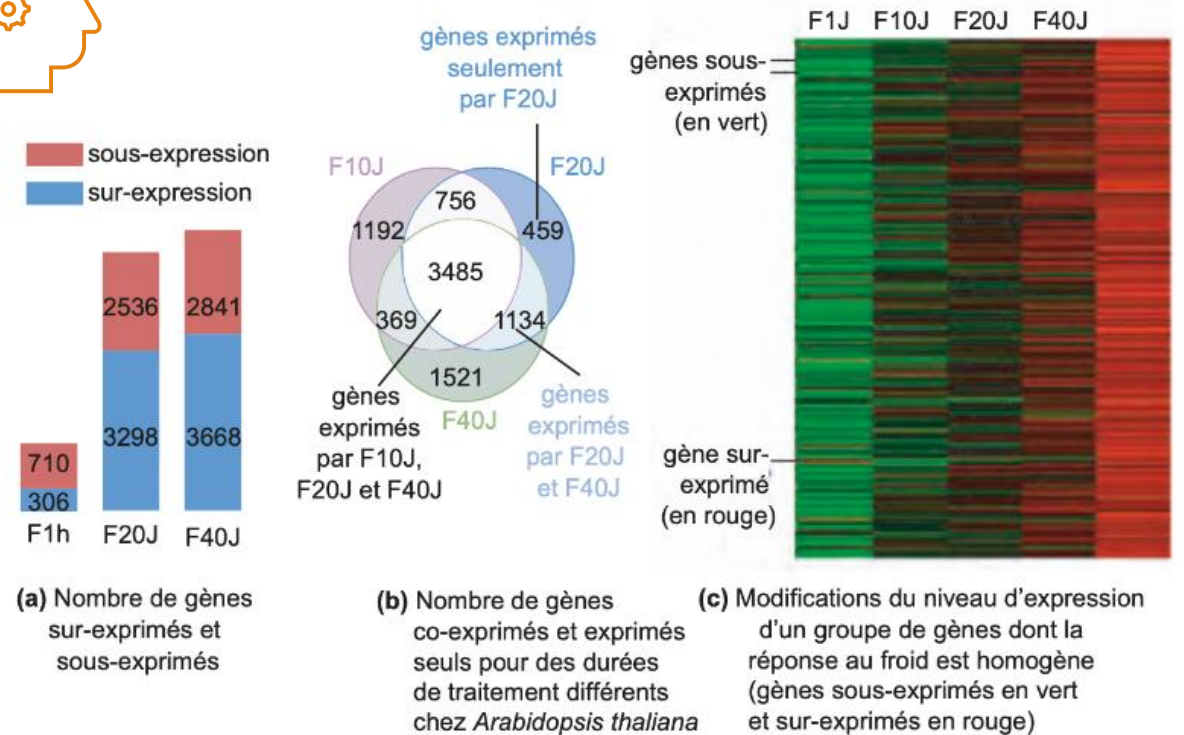
⇒ chez certaines variétés d'*Arabidopsis thaliana*, la **vernalisation** = une période d'exposition prolongée (plusieurs jours à plusieurs semaines) au froid (entre 4 et 7°C) lors de l'hiver

⇒ **transition du méristème végétatif en méristème inflorescentiel**

- Etude du transcriptome total de cette plante:
  - traitement prolongé par le froid (4°C) ⇒ changements d'expression du génome:
    - ✓ certains gènes **surexprimés**
    - ✓ d'autres **sous-exprimés**



**Vernalisation (n.f.) : transformation opérée par le froid, qui confère à certaines plantes l'aptitude à fleurir**



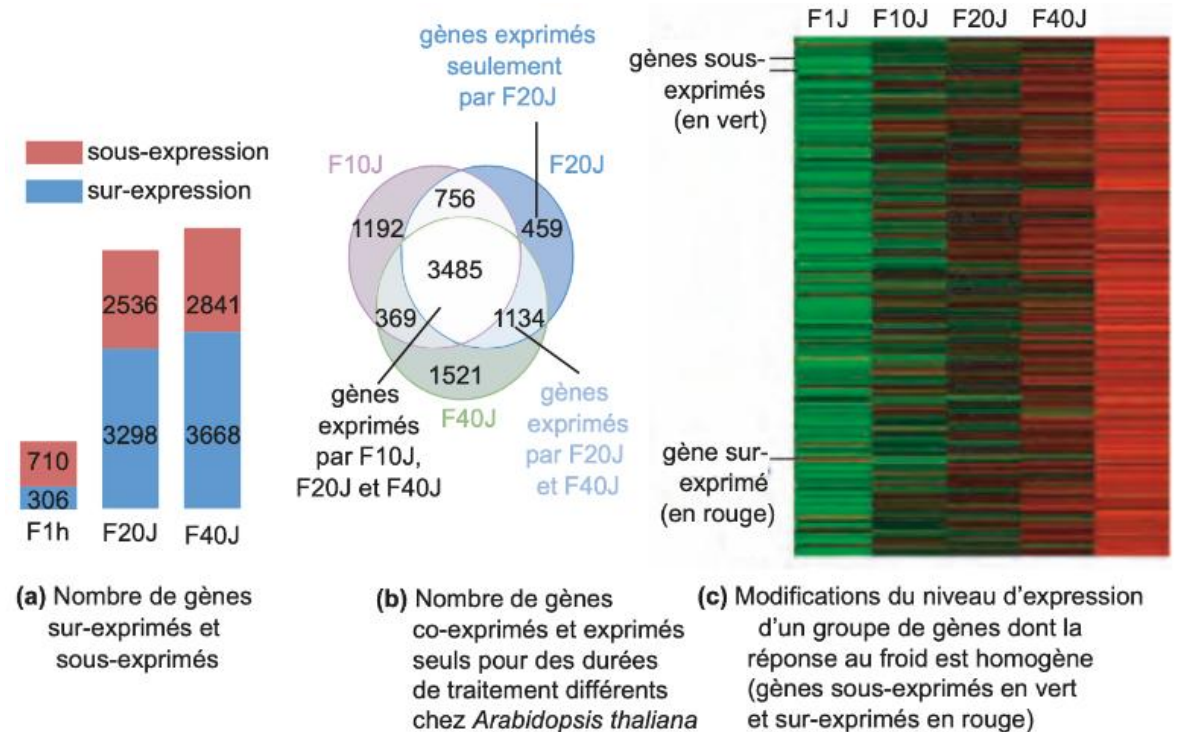
Suivi de l'expression des gènes d'*Arabidopsis thaliana* suite à un traitement par le froid (4 °C). (in Dunod, 2021)  
Durées du traitement : 1 heure (F1h), 1 jour (F1J), 10 jours (F10J), 20 jours (F20J) et 40 jours (F40J).

# I. MISE EN EVIDENCE D'UN CONTROLE DE L'INFORMATION GENETIQUE

## C. LA VARIATION DU TRANSCRIPTOME POUVANT ETRE CONTROLE PAR DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX

### 2. Exemple de la vernalisation chez les plantes

- Analyse des résultats :
  - Nombre de gènes dont le niveau d'expression change suite au traitement par le froid est considérable:
    - ✓ 5 834 après 20 jours
    - ✓ 6 509 après 40 jours (figure 15.4a)
  - Quelles que soient les durées d'exposition au froid, un groupe de 3 485 gènes est toujours exprimé simultanément (co-expression) (figure b).
  - Enfin, d'autres gènes sont **spécifiques** de chaque durée de traitement par le froid (1 192 gènes pour 10 jours de traitement et 1 521 pour 40 jours), ce qui montre que la durée du traitement modifie en continu l'expression du génome (figure b).
- L'étude se focalise ensuite sur un groupe de gènes, en distinguant ceux qui sont sous-exprimés (représentés par les bandes vertes) ou sur-exprimés (représentés par les bandes rouges) (figure c) pour différentes durées de traitement par le froid. L'étude du transcriptome montre que ce groupe se caractérise par une **réponse au froid homogène** : une **sous-expression pour un traitement de faible durée**, suivie d'une augmentation progressive, avec une **surexpression de l'ensemble des gènes au bout de 40 jours**.



Suivi de l'expression des gènes d'*Arabidopsis thaliana* suite à un traitement par le froid (4 °C). (in Dunod, 2021)

Durées du traitement : 1 heure (F1h), 1 jour (F1J), 10 jours (F10J), 20 jours (F20J) et 40 jours (F40J).

**Vernalisation:** période d'exposition prolongée au froid

⇒ **Sous-expression** d'un groupe de gène puis

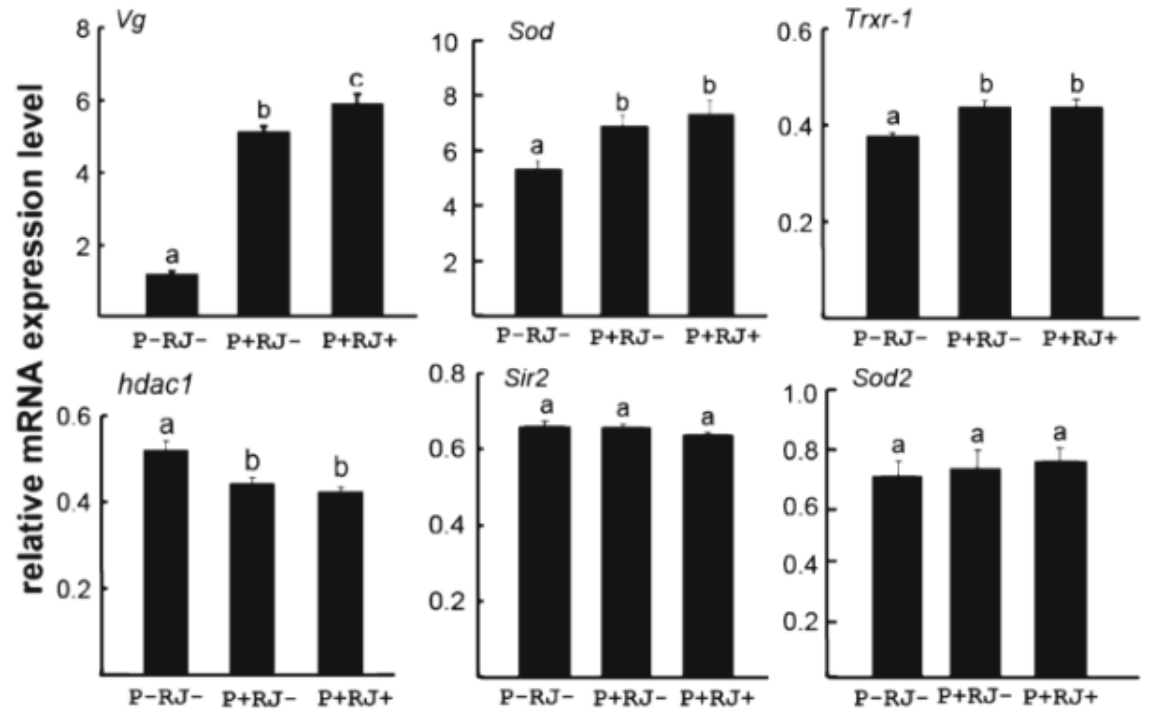
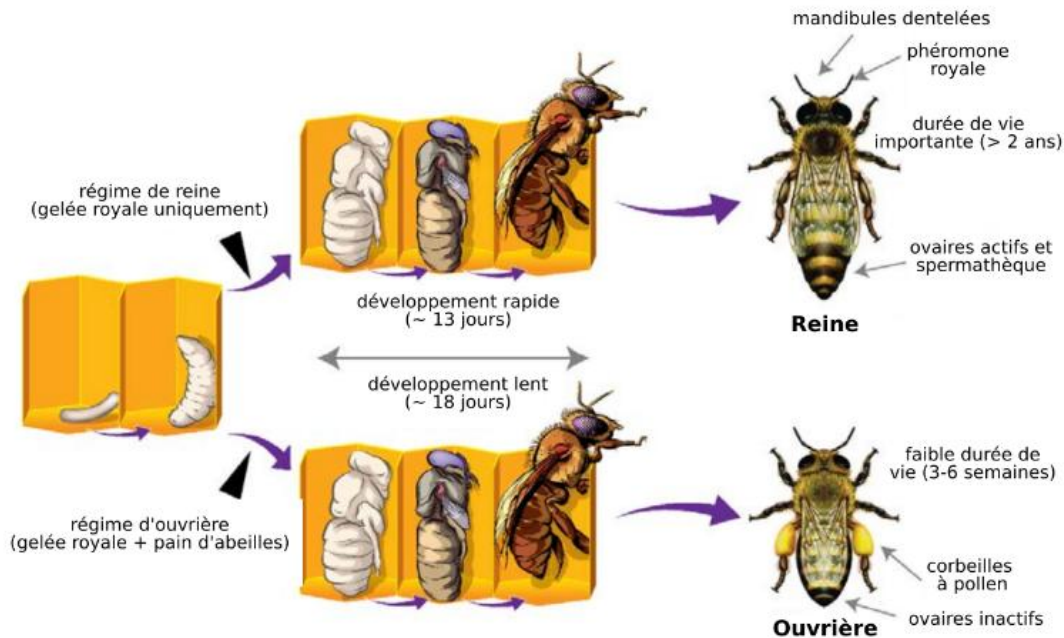
⇒ **Surexpression** d'un autre groupe de gènes si prolongement du froid

## C. LA VARIATION DU TRANSCRIPTOME POUVANT ETRE CONTROLE PAR DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX

CfTP

### 2. Exemple de la vernalisation chez les plantes

- Chez les abeilles, la **consommation de gelée royale par les larves modifie l'expression génétique** et conduit à la formation d'une reine au lieu d'une ouvrière



**Figure 2.** Expression levels of six genes relative to a reference gene *GAPDH-1* in the different nutrition group. Different letters on top of bars indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) between the groups. Relative expression data were transformed by square root transformation and presented hereafter transformation. Genes showing significant differences in expression level were further analyzed by ANOVA, using SPSS 16.0. Each bar corresponds to a single group represented as the mean  $\pm$  S.E of its biological replicates.

Bees were fed with pollen and royal jelly together (P+ RJ+), pollen only (P+ RJ-) and with neither pollen nor RJ (P- RJ-).

*Effet de la gelée royale sur l'expression des gènes chez l'abeille*  
<http://planet-vie.ens.fr/thematiques/developpement/controle-du-developpement/la-differenciation-des-abeilles-en-reines-et> Yan et al., *Apidologie* 2014 4

# PLAN DU COURS

## I. Mise en évidence d'un contrôle de l'expression de l'information génétique

- A. Diversité du transcriptome chez les pluricellulaires
- B. L'expression du génome peut être étudiée grâce à différentes techniques de biologie moléculaire
- C. La variation du transcriptome peut être contrôlée par les facteurs environnementaux
- D. L'expression de gènes est contrôlée par des facteurs internes

## II. Le contrôle épigénétique pré-transcriptionnel agit au niveau de la compaction de la chromatine

- A. Mise en évidence
- B. Les modifications covalentes des histones
- C. Application dans le cas de la vernalisation

## III. Le contrôle épigénétique pré-transcriptionnel agit au niveau de l'ADN

- A. Modification de l'ADN par méthylation
- B. Modification à l'échelle d'un chromosome

## IV. Le contrôle de l'initiation de la transcription par les séquences CIS et facteurs TRANS

- A. Définitions
- B. Séquences enhancers et silencers
- C. Facteurs TRANS: protéines régulatrices

## V. Les petites ARN régulateurs

- A. Mise en évidence fortuite des ARNi
- B. Elucidation du mode d'action des ARNi
- C. Intérêt évolutif des ARNi

## VI. Réflexion autour de l'épigénétique

- A. Définitions
- B. Transmission des modifications épigénétiques



## D. L'EXPRESSION DE GÈNE EST CONTROLÉE PAR DES FACTEURS INTERNES (EXTRA OU INTRACELLULAIRES)

### I. Exemple de l'action de l'oestradiol sur l'ovocyte et la synthèse de vitellogénine

- Œstradiol = Hormone **liposoluble** (stéroïdienne)

⇒ **Diffusion simple** à travers la membrane et **récepteur cytosolique**

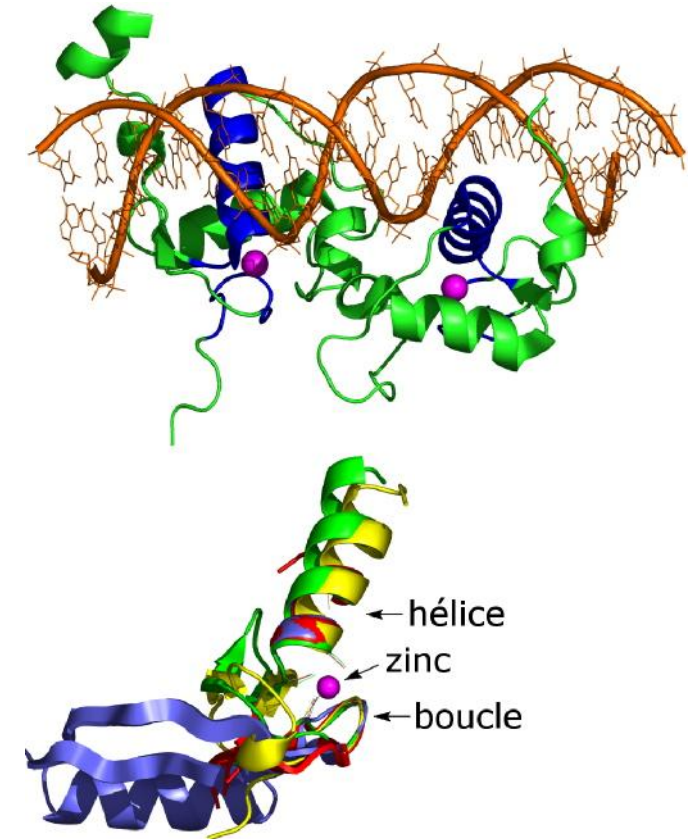
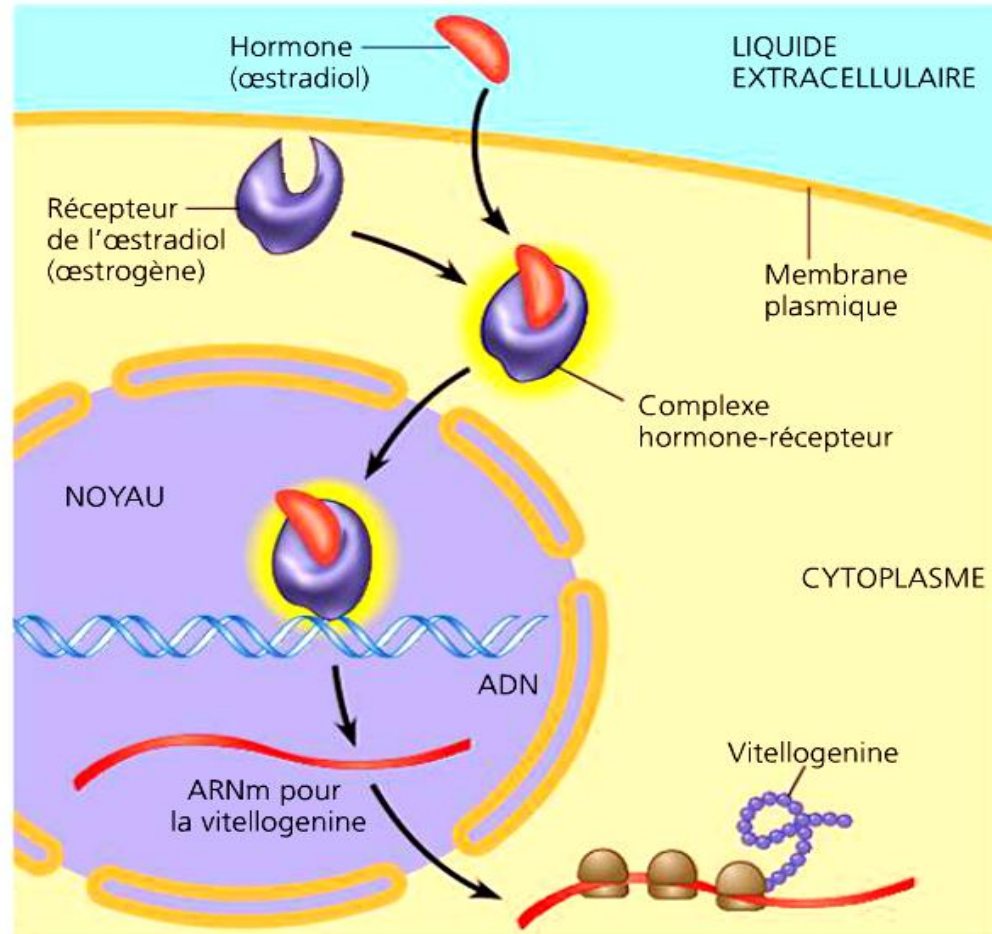
⇒ couple hormone-récepteur entre alors dans le noyau et peut interagir avec l'ADN

⇒ récepteur contient :

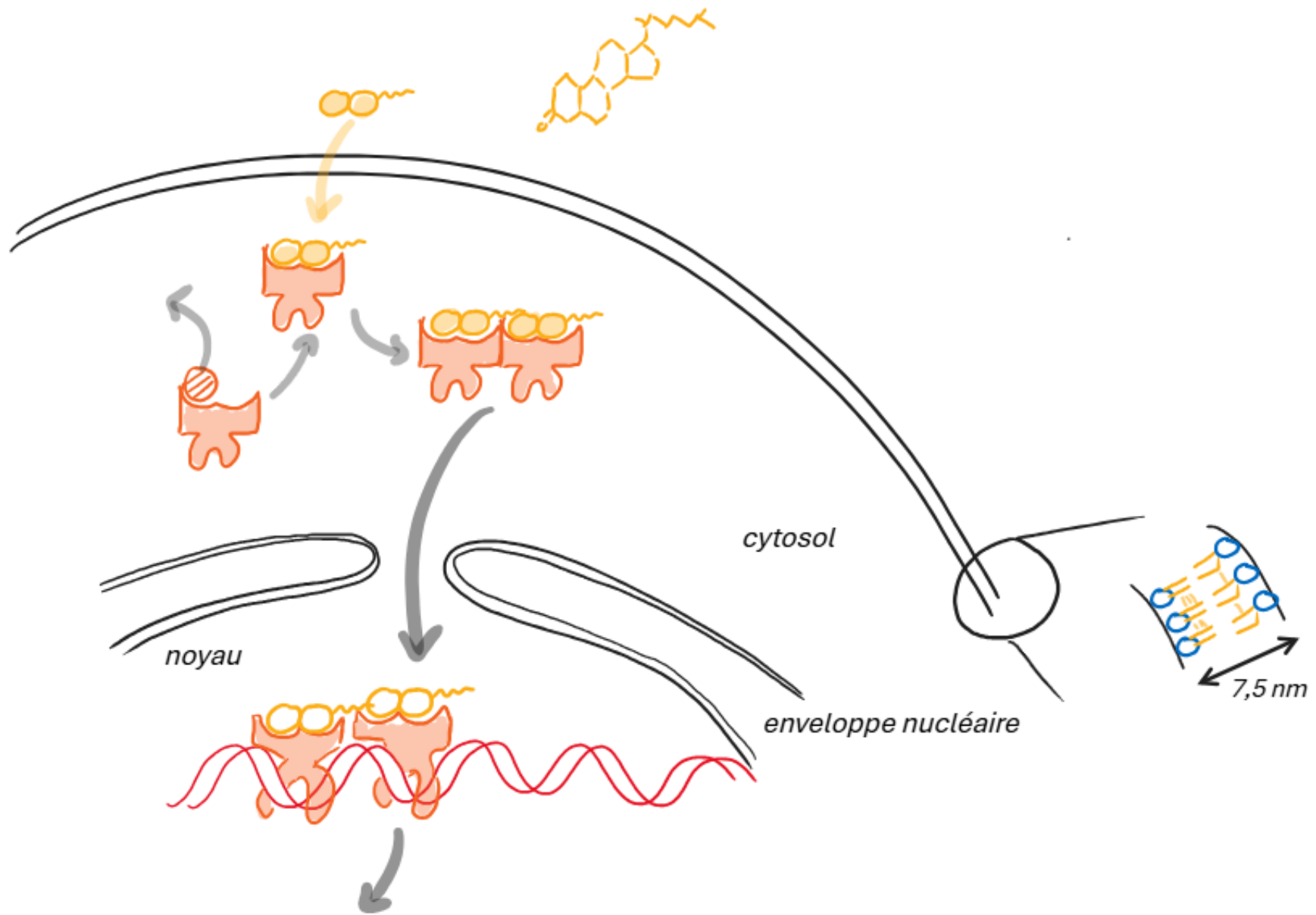
✓ Un domaine de fixation à l'hormone

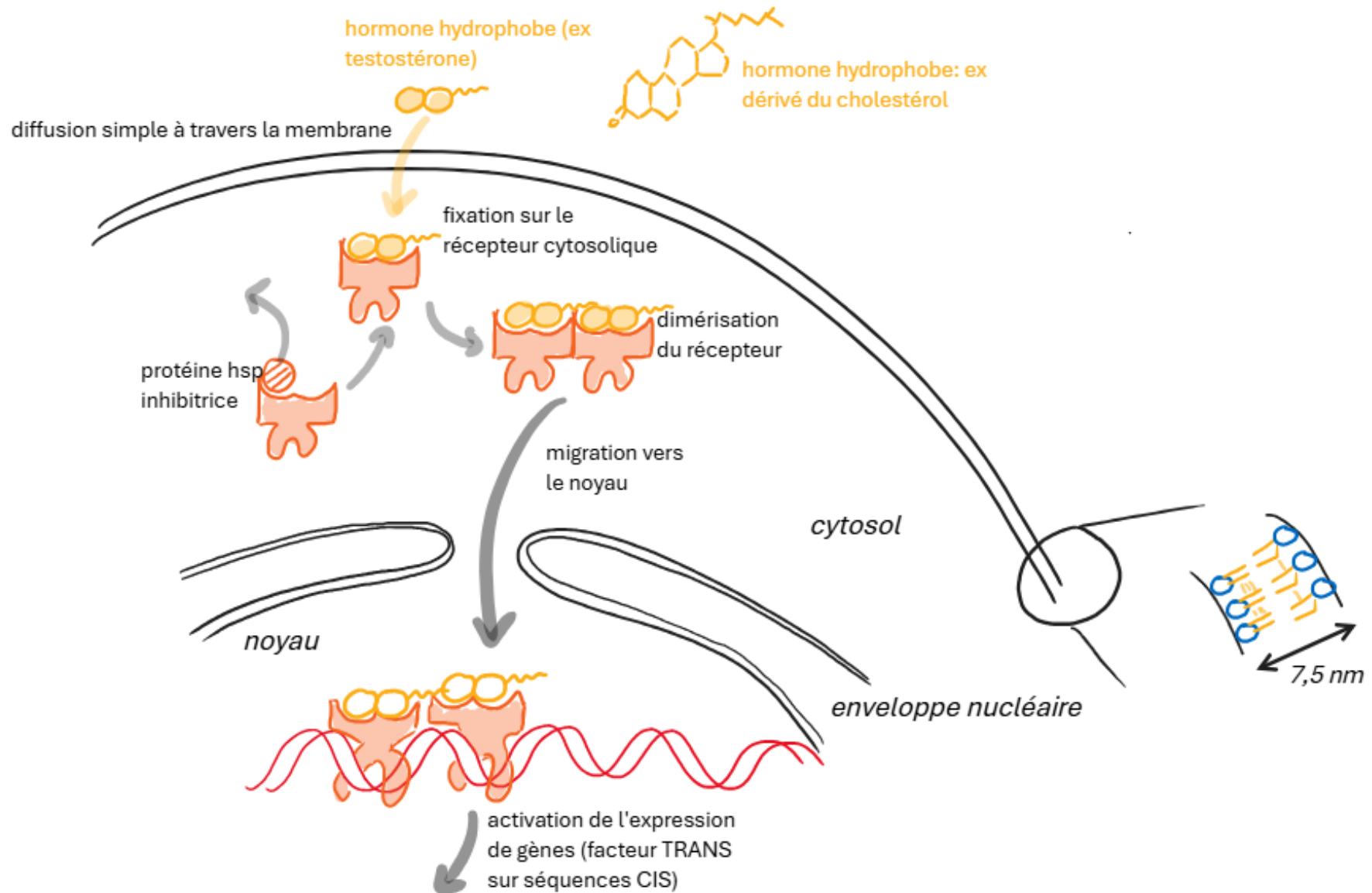
✓ Un **domaine de fixation à l'ADN** (de type doigt de zinc)

✓ Un **domaine d'activation de la transcription**



Régulation de la transcription par les récepteurs d'hormones stéroïdiennes





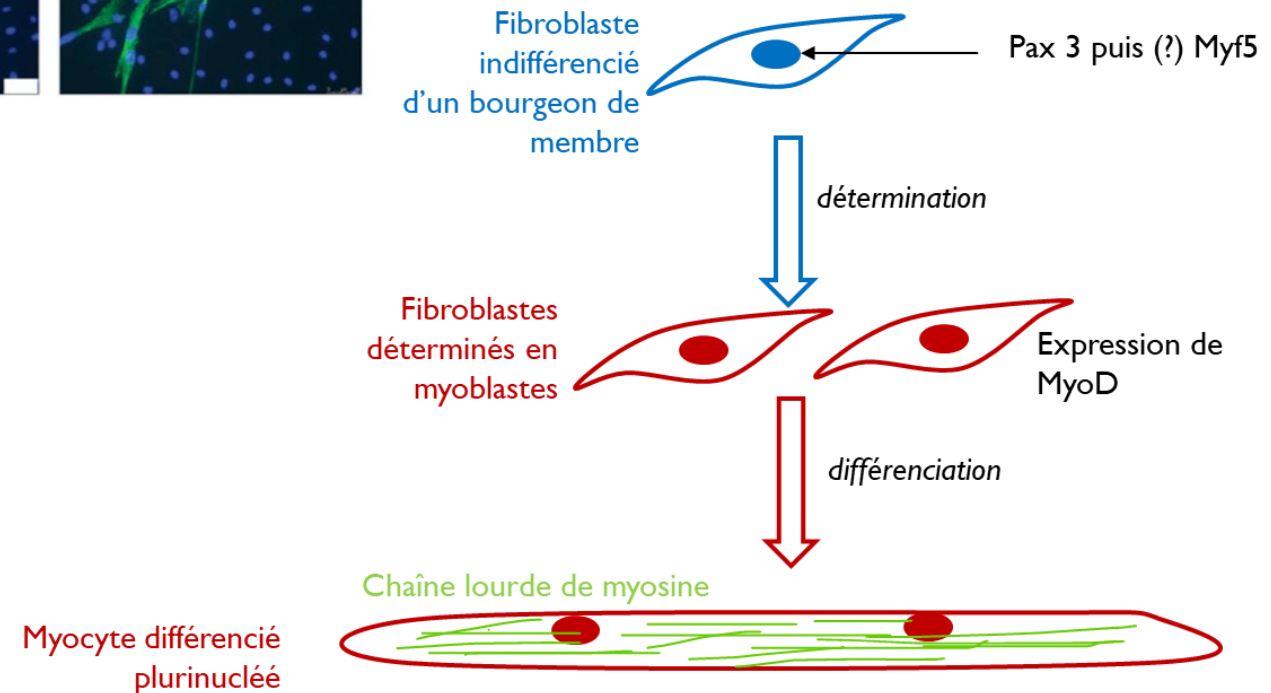
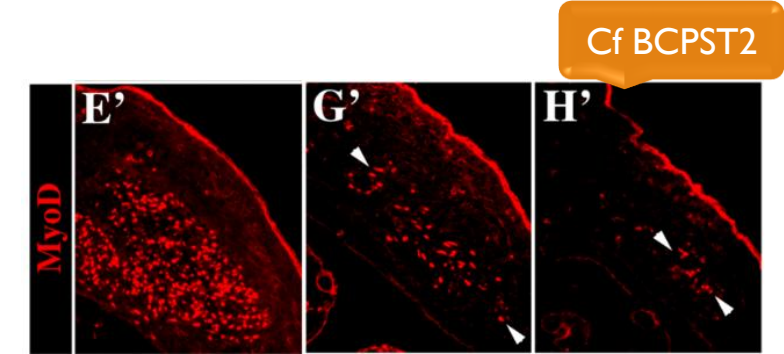
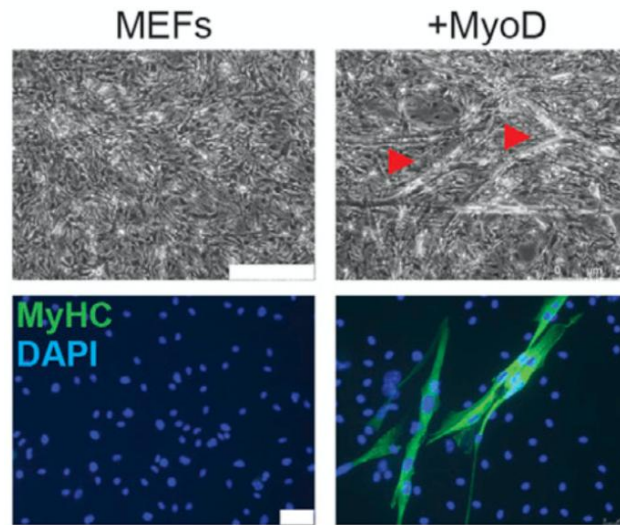
## REPONSE CELLULAIRE

# I. MISE EN EVIDENCE D'UN CONTROLE DE L'INFORMATION GENETIQUE

## D. L'EXPRESSION DE GÈNE EST CONTROLEE PAR DES FACTEURS INTERNES (EXTRA OU INTRACELLULAIRES)

### 2. Exemple de la différenciation musculaire

- Fibroblastes = cellules indéterminées
  1. Expression de Myf5 et Pax3 dans bourgeons de membres
    - ⇒ **Détermination** de fibroblastes en myoblastes et activation du gène MyoD
  2. Expression de MyoD
    - ⇒ Différenciation des Myoblastes en Myocytes

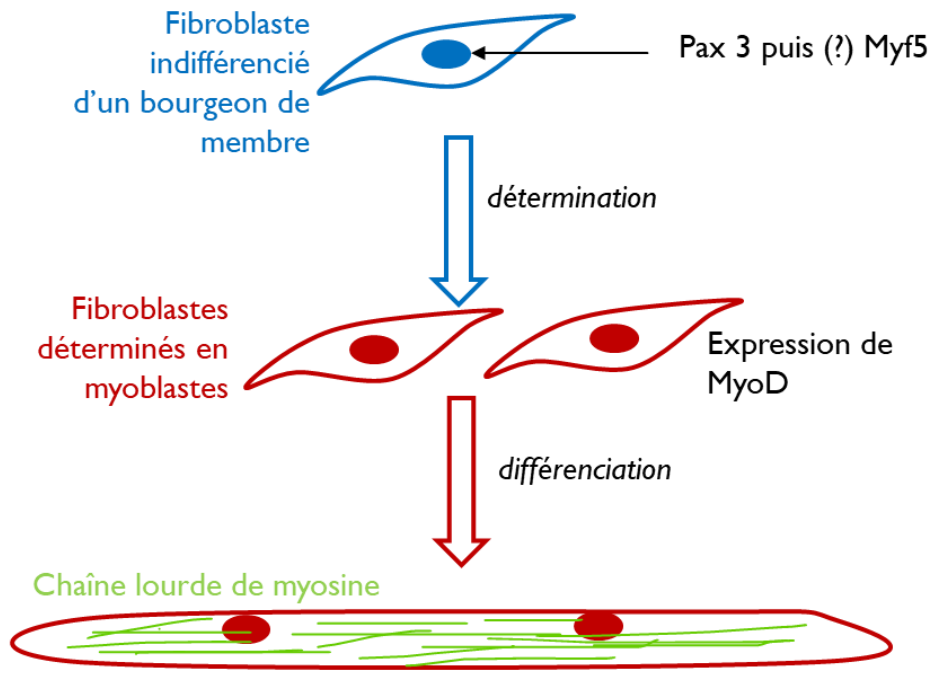


# I. MISE EN EVIDENCE D'UN CONTROLE DE L'INFORMATION GENETIQUE

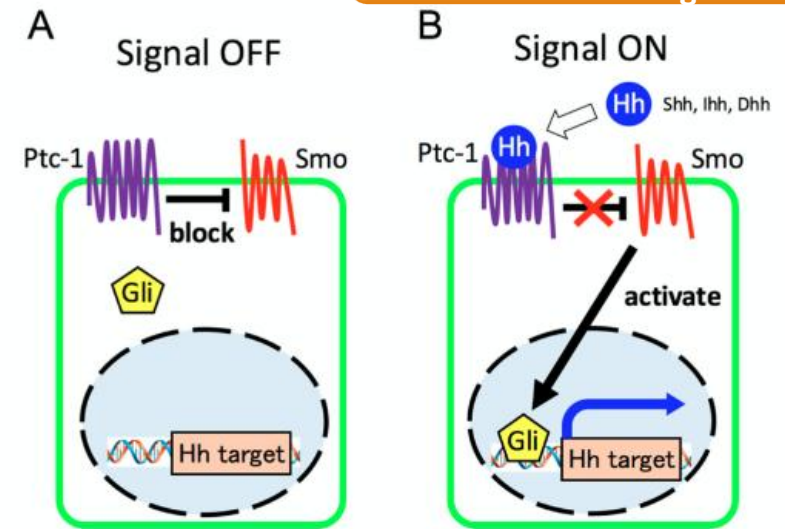
## D. L'EXPRESSION DE GÈNE EST CONTROLEE PAR DES FACTEURS INTERNES (EXTRA OU INTRACELLULAIRES)

### 3. Exemple de la voie SHH qui active l'expression de Myf 5 dans les somites

- Shh est exprimé dans le bourgeon de membre, c'est un **facteur paracrine**.
- Il se fixe sur un **récepteur membranaire spécifique**
- ⇒ il active le passage d'un messenger dans le noyau (Gli) qui va activer l'expression de gènes cibles comme Myf5.



Paracrine: molécule sécrétée qui agit sur des cellules voisines, par diffusion ou contiguïté



**Figure 2.** Overview of hedgehog signaling pathway. (A) In the absence of Hh ligands, Ptc-1 blocks Hh pathway activation through the repression of Smo. (B) Once the Hh ligand binds to Ptc-1, the repressive action to Smo is released, and Gli-mediated transcription leading to the regulation of downstream target Hh is activated.

Voie de signalisation du gène Sonic Hedgehog (Haraguchi et al., 2019)

(<https://devbiootaqo.wordpress.com/2013/03/20/muscle-patterning-and-the-role-of-shh/>)

<https://bcgdevelop.fr/le-developpement-des-muscles-stries-squelettiques/>

# I. MISE EN EVIDENCE D'UN CONTROLE DE L'INFORMATION GENETIQUE

## D. L'EXPRESSION DE GÈNE EST CONTROLEE PAR DES FACTEURS INTERNES (EXTRA OU INTRACELLULAIRES)

### 4. Généralisation : rôle de facteurs extracellulaires relayés par des facteurs intracellulaires

Des facteurs extracellulaires peuvent modifier l'expression de l'IG d'une cellule. Ce sont :

- les **hormones**
  - Action à longue distance
  - Circulation dans le sang ou les sèves
  - Action à faible concentration
  - Liposolubles ou hydrosolubles
- les facteurs **paracrines**
  - Action à faible distance en circulant dans la MEC
  - Interaction avec GAG et possibilité de **gradients de molécules informatives**
- Dans les deux cas = molécules informatives
- Action sur cellules **cibles**
  - ⇒ Récepteurs spécifiques
  - récepteur membranaire ou nucléaire
    - ⇒ Modification de l'expression de gènes spécifiques.



# PLAN DU COURS

## I. Mise en évidence d'un contrôle de l'expression de l'information génétique

- A. Diversité du transcriptome chez les pluricellulaires
- B. L'expression du génome peut être étudiée grâce à différentes techniques de biologie moléculaire
- C. La variation du transcriptome peut être contrôlée par les facteurs environnementaux
- D. L'expression de gènes est contrôlée par des facteurs internes

## II. Le contrôle épigénétique pré-transcriptionnel agit au niveau de la compaction de la chromatine

- A. Mise en évidence
- B. Les modifications covalentes des histones
- C. Application dans le cas de la vernalisation

## III. Le contrôle épigénétique pré-transcriptionnel agit au niveau de l'ADN

- A. Modification de l'ADN par méthylation
- B. Modification à l'échelle d'un chromosome

## IV. Le contrôle de l'initiation de la transcription par les séquences CIS et facteurs TRANS

- A. Définitions
- B. Séquences enhancers et silencers
- C. Facteurs TRANS: protéines régulatrices

## V. Les petites ARN régulateurs

- A. Mise en évidence fortuite des ARNi
- B. Elucidation du mode d'action des ARNi
- C. Intérêt évolutif des ARNi

## VI. Réflexion autour de l'épigénétique

- A. Définitions
- B. Transmission des modifications épigénétiques

## II. LE CONTRÔLE ÉPIGÉNÉTIQUE PRÉ-TRANSCRIPTIONNEL AGIT AU NIVEAU DE LA COMPACTION DE LA CHROMATINE

### A. MISE EN ÉVIDENCE : LIEN ENTRE ACCESSIBILITÉ DE L'ADN ET EXPRESSION DU GÉNOME



#### I. Expérience sur le gène de la globine

- **zones de transcription = zones de décondensation** chromatinienne
- Rappel : structure de la chromatine eucaryote
- **Hétérochromatine** : état condensé non accessible aux FT donc non transcrit.
  - ✓ Une portion de cette hétérochromatine est **constitutive** (ne sera jamais décondensée au cours de la vie de la cellule)
  - ✓ une autre est **transitoirement condensée** (facultative).
- **Euchromatine active** : fibres de **10nm**, état décondensé de la chromatine pouvant être transcrite.



1 : érythroblastes  
2 : neurones

#### Expérience : sensibilité à l'ADNase.

a/ prélèvement d'érythroblastes (précurseurs des globules rouges) ou de neurones chez le poulet.

b/ isolement des noyaux.

c/ traitement des noyaux par une ADNase coupant aléatoirement l'ADN.

d/ extraction de l'ADN.

e/ réalisation d'un Southern blot sans traitement de l'ADN par une enzyme de restriction avec une révélation utilisant une sonde radioactive complémentaire du gène de globine.

*Southern blot gène codant la globine, extrait d'érythroblastes (1) et de neurones (2) de poulet*

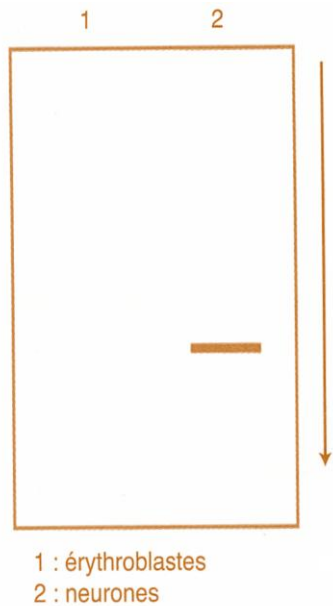
## II. LE CONTRÔLE ÉPIGÉNÉTIQUE PRÉ-TRANSCRIPTIONNEL AGIT AU NIVEAU DE LA COMPACTION DE LA CHROMATINE

### A. MISE EN ÉVIDENCE : LIEN ENTRE ACCESSIBILITÉ DE L'ADN ET EXPRESSION DU GÉNOME

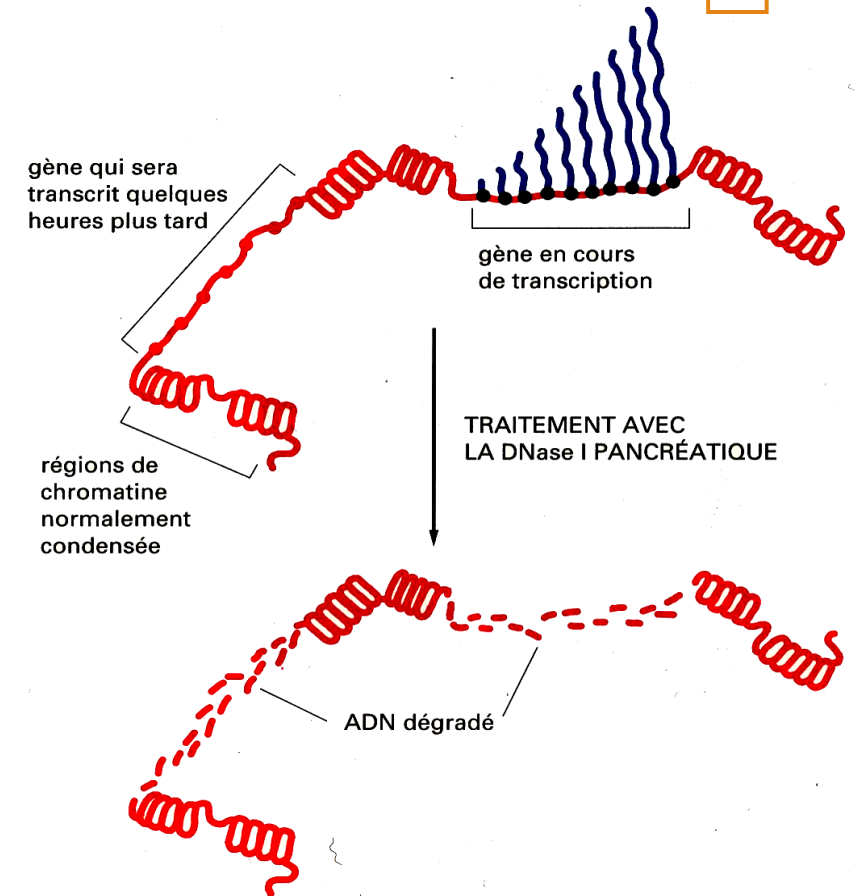
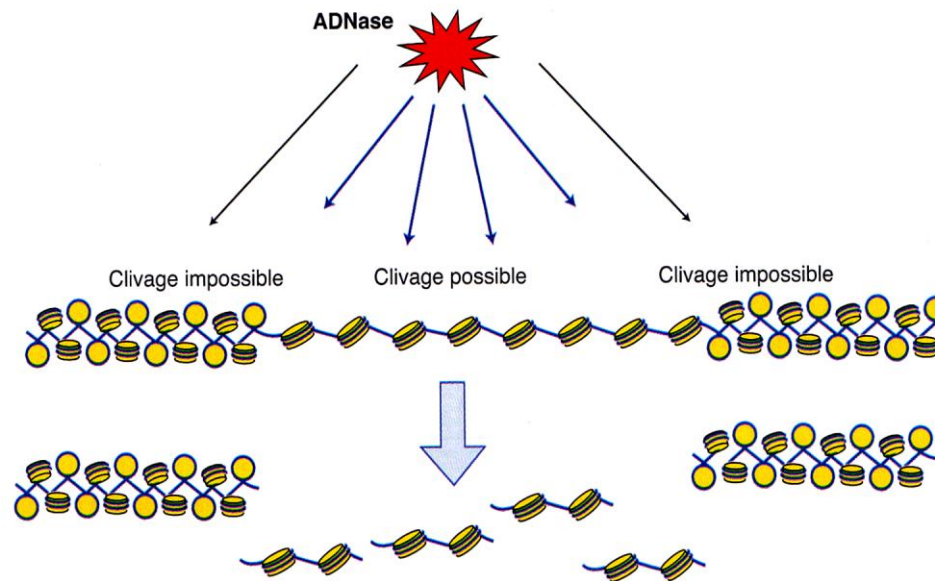


#### I. Expérience sur le gène de la globine

Dans une cellule différenciée, les gènes actifs sont dans les zones le plus décondensées de l'ADN. Ces zones diffèrent d'un tissu à l'autre.



*Southern blot gène codant la globine, extrait d'érythroblastes (1) et de neurones (2) de poulet*



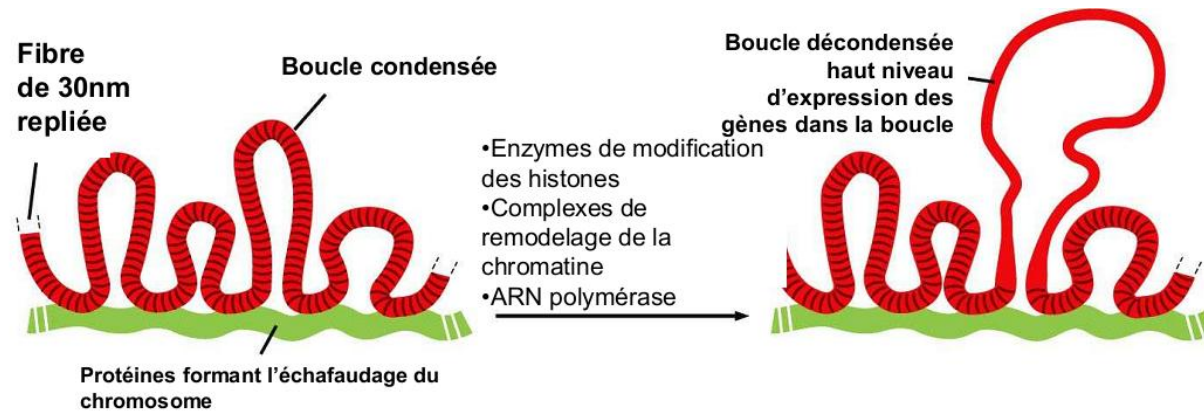
*L'état de compaction de la chromatine reflète les zones transcrites et celles non transcrites*

## II. LE CONTRÔLE ÉPIGÉNÉTIQUE PRÉ-TRANSCRIPTIONNEL AGIT AU NIVEAU DE LA COMPACTION DE LA CHROMATINE

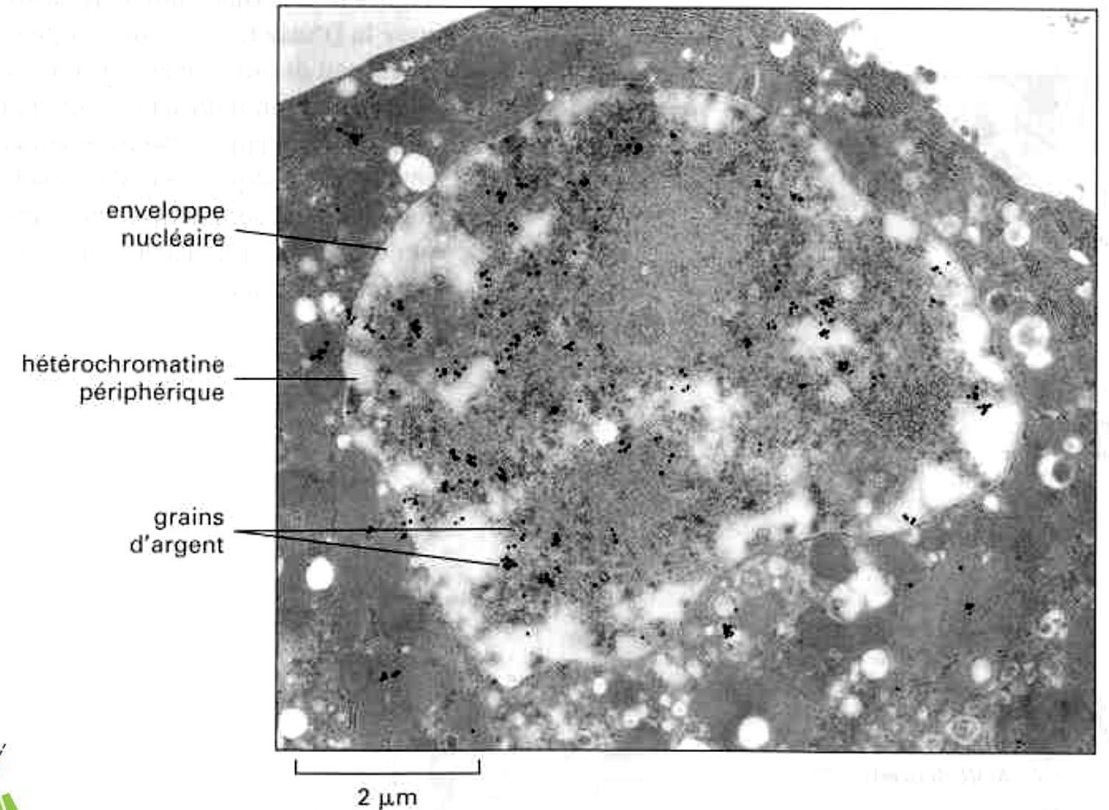
### A. MISE EN ÉVIDENCE : LIEN ENTRE ACCESSIBILITÉ DE L'ADN ET EXPRESSION DU GÉNOME

#### 2. Modifications de l'état de condensation de la chromatine

- autoradiographie d'un noyau incubé dans de l'**uridine tritiée**
  - sites de synthèse des ARN = sites d'expression
    - ✓ situés exclusivement au niveau de l'euchromatine
    - ✓ transcription où chromatine décondensée.
- Modifications d'accessibilité de l'ADN aux acteurs de la transcription = **processus épigénétiques**.
  - modifications covalentes des histones.



*Etat de condensation de l'euchromatine et expression génétique*



*Autoradiographie d'uridine tritiée dans le noyau*

# PLAN DU COURS

## I. Mise en évidence d'un contrôle de l'expression de l'information génétique

- A. Diversité du transcriptome chez les pluricellulaires
- B. L'expression du génome peut être étudiée grâce à différentes techniques de biologie moléculaire
- C. La variation du transcriptome peut être contrôlée par les facteurs environnementaux
- D. L'expression de gènes est contrôlée par des facteurs internes

## II. Le contrôle épigénétique pré-transcriptionnel agit au niveau de la compaction de la chromatine

- A. Mise en évidence
- B. Les modifications covalentes des histones
- C. Application dans le cas de la vernalisation

## III. Le contrôle épigénétique pré-transcriptionnel agit au niveau de l'ADN

- A. Modification de l'ADN par méthylation
- B. Modification à l'échelle d'un chromosome

## IV. Le contrôle de l'initiation de la transcription par les séquences CIS et facteurs TRANS

- A. Définitions
- B. Séquences enhancers et silencers
- C. Facteurs TRANS: protéines régulatrices

## V. Les petites ARN régulateurs

- A. Mise en évidence fortuite des ARNi
- B. Elucidation du mode d'action des ARNi
- C. Intérêt évolutif des ARNi

## VI. Réflexion autour de l'épigénétique

- A. Définitions
- B. Transmission des modifications épigénétiques

## II. LE CONTRÔLE ÉPIGÉNÉTIQUE PRÉ-TRANSCRIPTIONNEL AGIT AU NIVEAU DE LA COMPACTION DE LA CHROMATINE

### B. MODIFICATIONS COVALENTES DES HISTONES

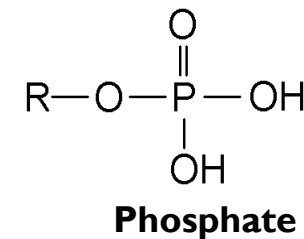
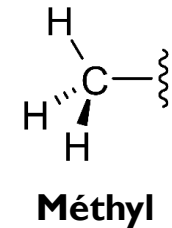
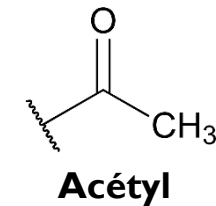
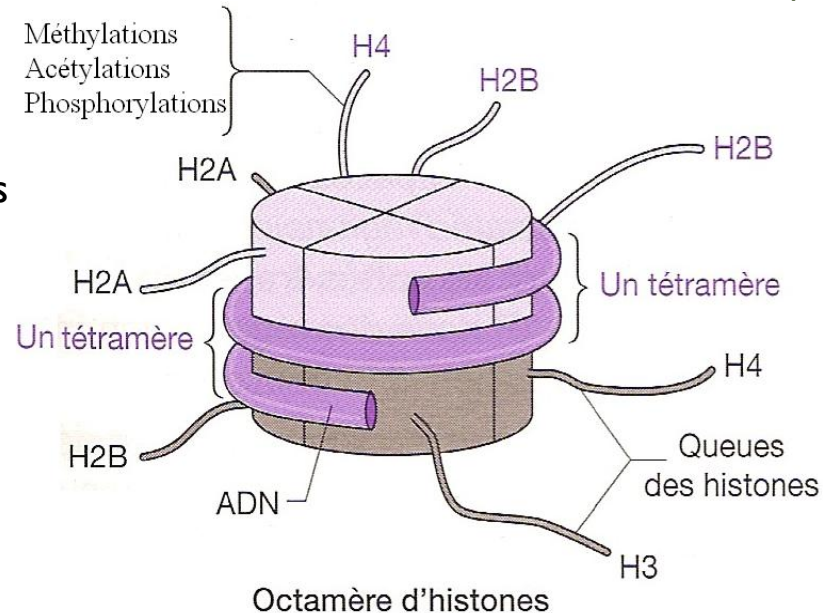
#### I. Les types de modifications des protéines histones

- Les histones de cœur (H2A, H2B, H3, H4) peuvent subir différents types de modifications sur leur queue N-ter (cf. tableau).
- Ces modifications sont effectuées par des *writers* et des *erasers* spécifiques.
  - Les **writers = écrivains** : protéines mettant en place des marqueurs épigénétiques
  - Les **erasers = effaçeurs** : protéines supprimant des marqueurs épigénétiques
  - Les **readers = lecteurs** : protéines « lisant » ces marqueurs
- L'ensemble de ces marqueurs épigénétique constituent un « **code histone** » qui contient de l'information.



Type de modification	Enzymes impliquées	Effet sur l'expression des gènes
Acétylation	Histone acétyl transférase	Favorisée
Désacétylation	Histone désacétylase	Réprimée
Méthylation	Histone méthyl transférase	Réprimée
Phosphorylation	Kinase	Réprimée
Déphosphorylation	Phosphatase	Favorisée

Modifications des histones



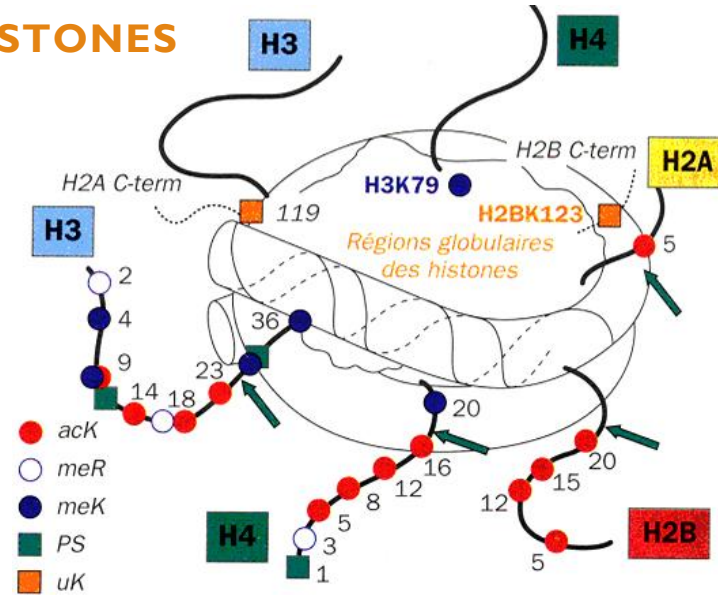
## II. LE CONTRÔLE ÉPIGÉNÉTIQUE PRÉ-TRANSCRIPTIONNEL AGIT AU NIVEAU DE LA COMPACTION DE LA CHROMATINE

### B. MODIFICATIONS COVALENTES DES HISTONES

#### I. Les types de modifications des protéines histones

- L'information contenue dans le **code histone** découle de plusieurs paramètres :

- Le type d'histone modifié (ex : H3...)
- La position de l'AA modifié sur la queue N-ter (ex : K9)
- Le type de modification (ex : méthylation)



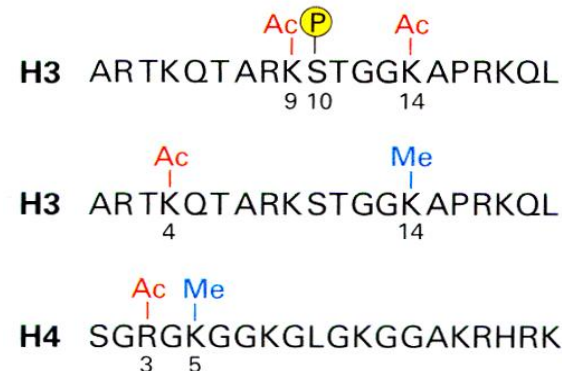
Modification des protéines histones au niveau des queues Nter (Compilation de modifications chez plusieurs types cellulaires) :

- ✓ acK = acétyl sur Lysine
- ✓ meR = méthyl sur arginine
- ✓ meK = méthyl sur Lys
- ✓ PS = phosphoryl sur Sérine
- ✓ uK = lysine ubiquitinylée

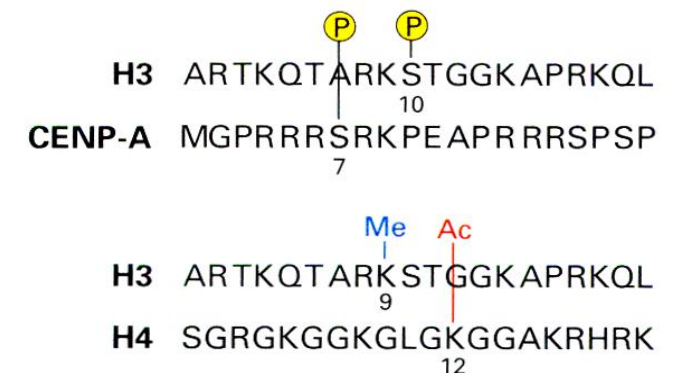


Modifications post-traductionnelles des queues Nter des histones H3 et H4 dans l'euchromatine et l'hétérochromatine.

#### Euchromatine (active/ouverte)

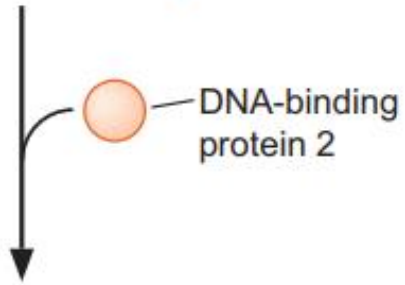
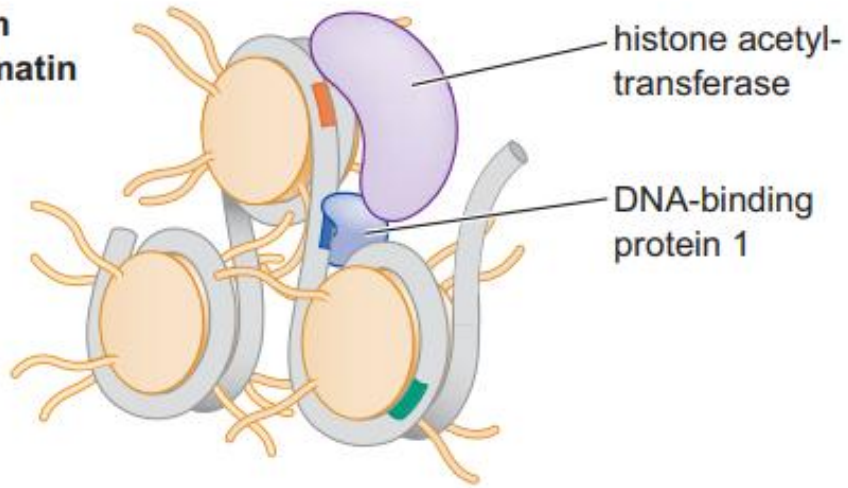


#### Hétérochromatine (inactive/condensée)

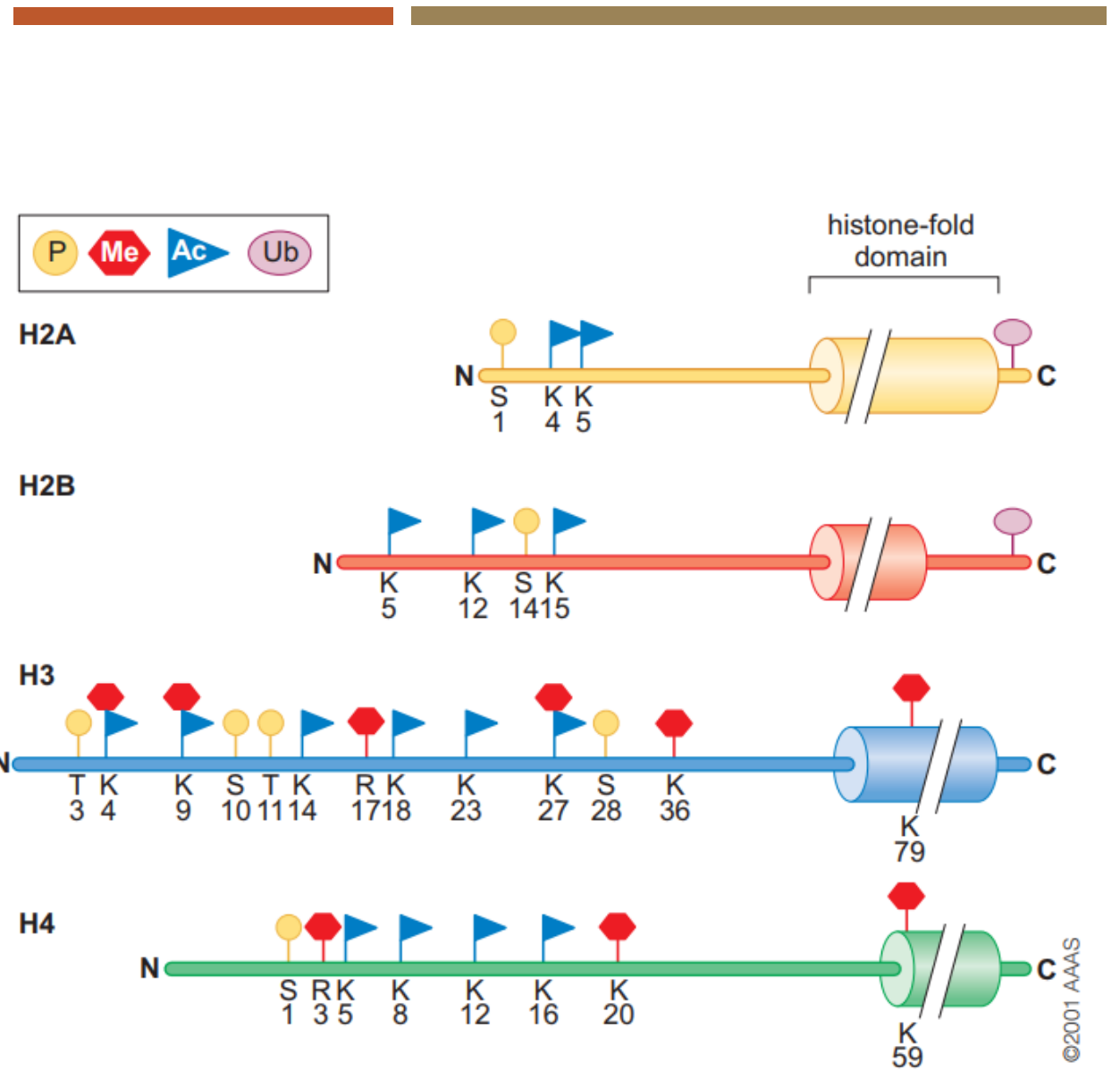
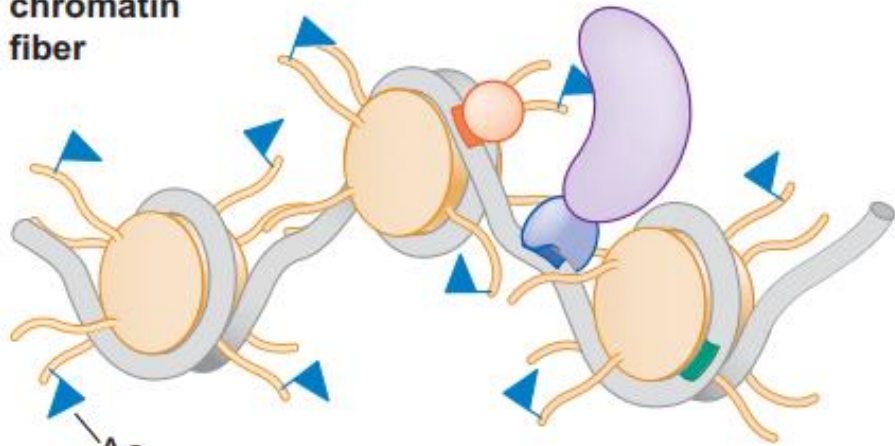


- Certaines modifications semblent associées préférentiellement à euchromatine ou l'hétérochromatine, mais le code histone n'est pas encore complètement élucidé...

30-nm chromatin fiber



10-nm chromatin fiber



## II. LE CONTRÔLE ÉPIGÉNÉTIQUE PRÉ-TRANSCRIPTIONNEL AGIT AU NIVEAU DE LA COMPACTION DE LA CHROMATINE

### B. MODIFICATIONS COVALENTES DES HISTONES

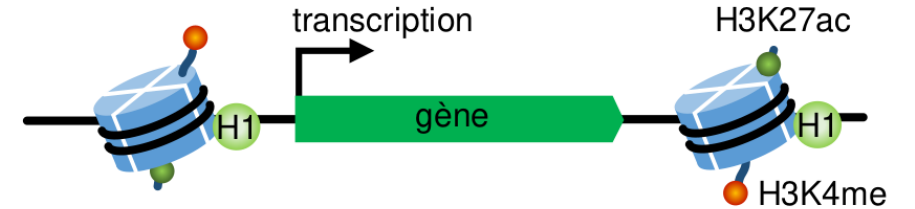
#### I. Les types de modifications des protéines histones

- Relation entre état de condensation de la chromatine et transcription de l'ADN
  - transcription possible au niveau de l'euchromatine active
  - transcription impossible dans l'hétérochromatine
  - Degré de condensation de la chromatine dépend de marques chromatinienne, en particulier des modifications post-traductionnelles des queues d'histones.

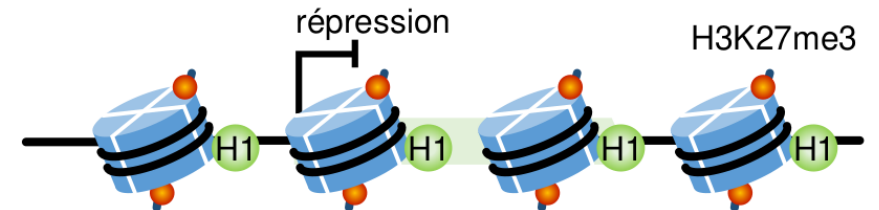
- États chromatinien permmissifs à la transcription= euchromatine
- États chromatinien temporairement répressifs à la transcription= euchromatine inactive et hétérochromatine facultative



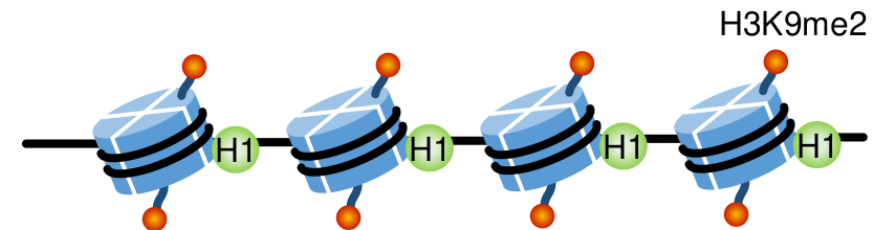
euchromatine



hétérochromatine facultative



hétérochromatine constitutive



*L'hétérochromatine constitutive vs facultative dépend du code histone*

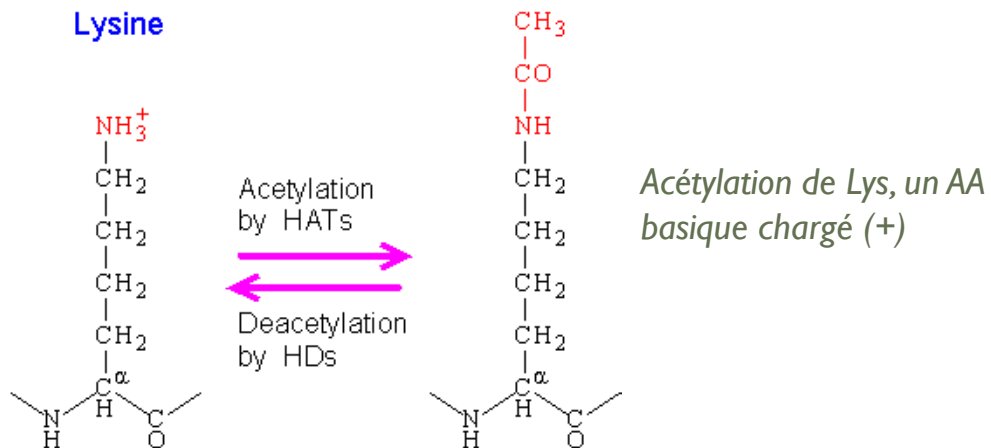
## II. LE CONTRÔLE ÉPIGÉNÉTIQUE PRÉ-TRANSCRIPTIONNEL AGIT AU NIVEAU DE LA COMPACTION DE LA CHROMATINE

### B. MODIFICATIONS COVALENTES DES HISTONES

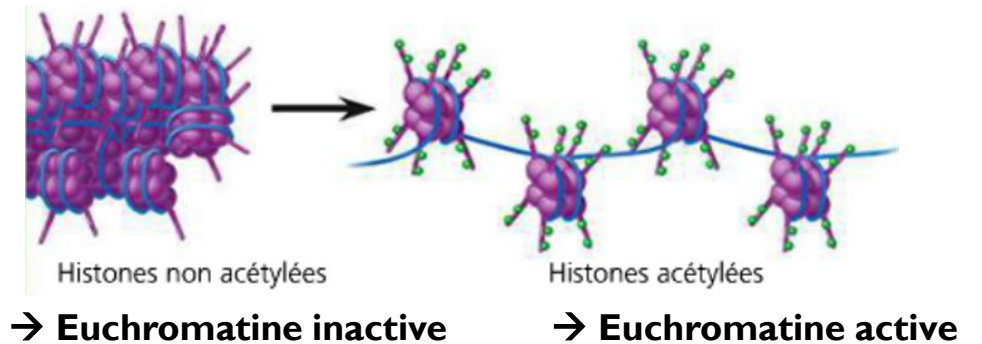
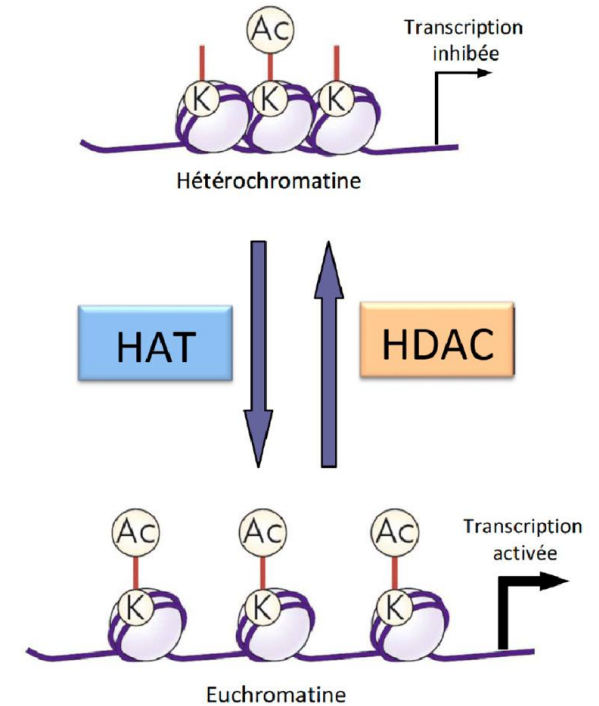
## 2. Les acteurs de modifications des protéines histones

- Parmi les writers épigénétiques, on peut citer les histones acétylases
- L'acétylation des histones a lieu au niveau des résidus AA basiques (+).

- neutralisation de la charge des queues des histones
  - ⇒ Diminution des liaisons ioniques entre histones (+) et ADN (-)
  - ⇒ Décompaction de l'ADN



Effet de l'acétylation des histones sur la structure de la chromatine



## II. LE CONTRÔLE ÉPIGÉNÉTIQUE PRÉ-TRANSCRIPTIONNEL AGIT AU NIVEAU DE LA COMPACTION DE LA CHROMATINE

### B. MODIFICATIONS COVALENTES DES HISTONES

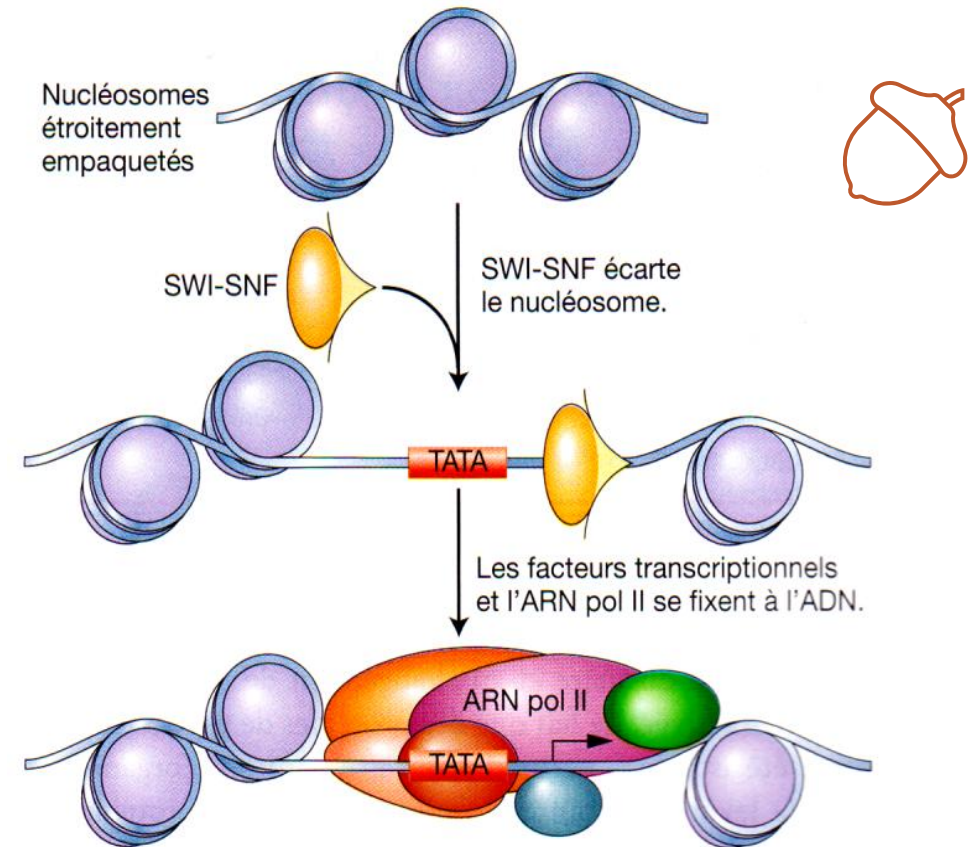
### 3. Les lecteurs des modifications des protéines histones

- **Code histone reconnu** par des **protéines de remodelage** de la chromatine, capables de déplacer les nucléosomes.
- Mode de fonctionnement : utilisation de l'ATP pour rompre les liaisons ADN/Protéines (histones).

Ex : SWI / SNF (Switch/Sniff = SWItching/Sucrose Non-Fermenting)

- ⇒ Dissociation transitoire de l'ADN de la surface des nucléosomes
  - ⇒ Glissement de l'octamère d'histones le long de l'ADN
  - ⇒ Décondensation locale et accessibilité de l'ADN

→ **En contrôlant la localisation des nucléosomes, les facteurs de remodelage de la chromatine déterminent quelles régions de l'ADN peuvent être exprimées ou non.**



*Fonctionnement du complexe de remodelage de la chromatine, SWI/SNF (chez la levure)*

# PLAN DU COURS

## I. Mise en évidence d'un contrôle de l'expression de l'information génétique

- A. Diversité du transcriptome chez les pluricellulaires
- B. L'expression du génome peut être étudiée grâce à différentes techniques de biologie moléculaire
- C. La variation du transcriptome peut être contrôlée par les facteurs environnementaux
- D. L'expression de gènes est contrôlée par des facteurs internes

## II. Le contrôle épigénétique pré-transcriptionnel agit au niveau de la compaction de la chromatine

- A. Mise en évidence
- B. Les modifications covalentes des histones
- C. Application dans le cas de la vernalisation

## III. Le contrôle épigénétique pré-transcriptionnel agit au niveau de l'ADN

- A. Modification de l'ADN par méthylation
- B. Modification à l'échelle d'un chromosome

## IV. Le contrôle de l'initiation de la transcription par les séquences CIS et facteurs TRANS

- A. Définitions
- B. Séquences enhanceurs et silenciers
- C. Facteurs TRANS: protéines régulatrices

## V. Les petites ARN régulateurs

- A. Mise en évidence fortuite des ARNi
- B. Elucidation du mode d'action des ARNi
- C. Intérêt évolutif des ARNi

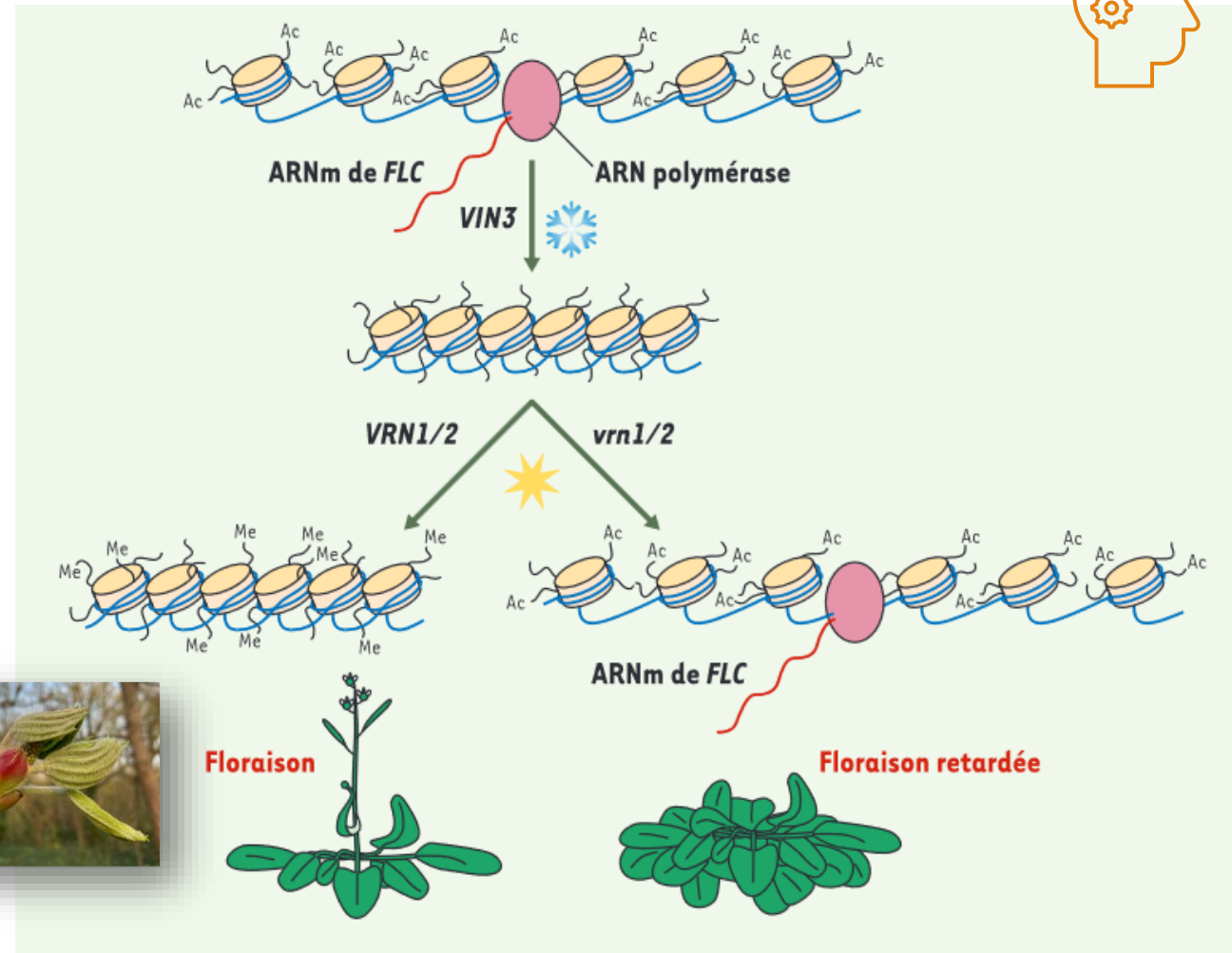
## VI. Réflexion autour de l'épigénétique

- A. Définitions
- B. Transmission des modifications épigénétiques

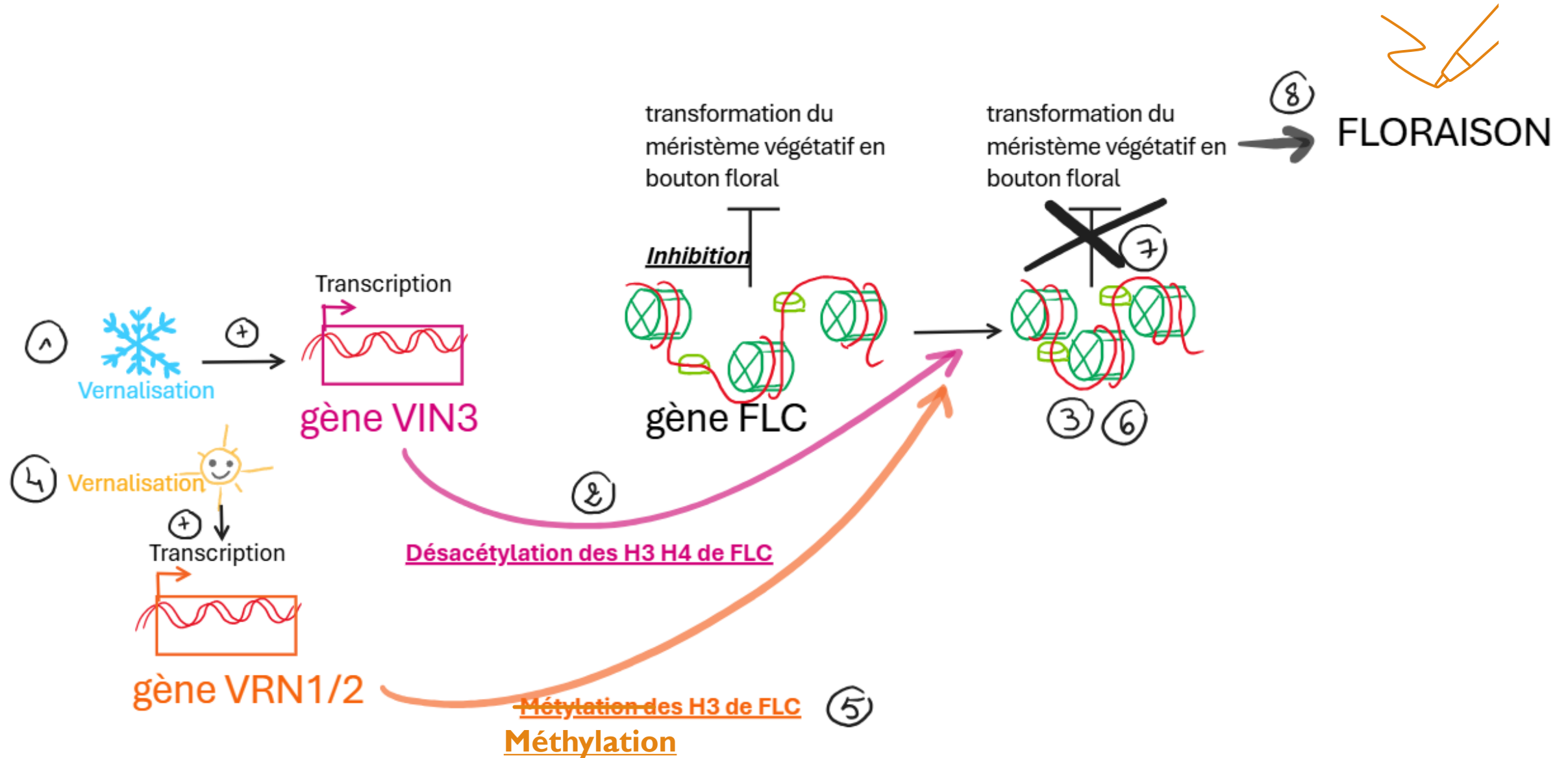
## II. LE CONTRÔLE ÉPIGÉNÉTIQUE PRÉ-TRANSCRIPTIONNEL AGIT AU NIVEAU DE LA COMPACTION DE LA CHROMATINE

### C. APPLICATION DE LA MODIFICATION DES HISTONES DANS LE CAS DE LA VERNALISATION

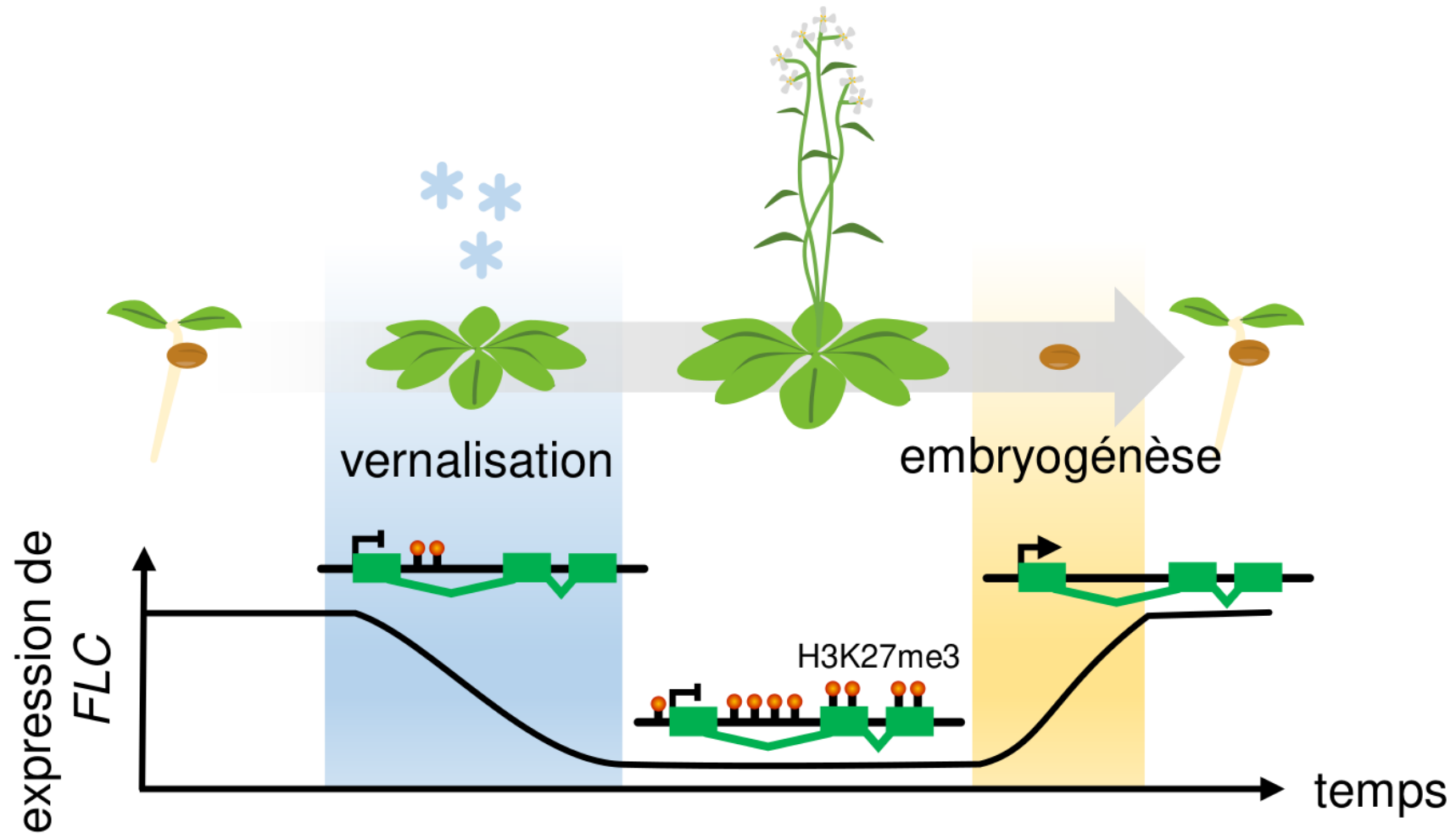
- En l'absence de vernalisation, le **répresseur floral FLC** (FLOWERING LOCUS C) = configuration chromatinienne « ouverte »
  - hyperacétylation des histones H3 et H4
    - ⇒ forte expression de FLC ⇒ bourgeon végétatif
- Traitement par le froid: ⇒ expression du **gène VIN3** (VERNALIZATION INSENSITIVE 3)
  - ⇒ désacétylation des histones H3 et H4 au locus FLC
  - ⇒ inactivation de FLC
  - ⇒ Levée de répression transcriptionnelle de FLC
- Allongement des jours ⇒ **complexe VRN1/2** (VERNALISATION 1 et 2)
  - ⇒ Inactivation de FLC maintenue par ajout de groupements méthyles sur les lysines 9 et 27 de l'histone H3 par VRN1/2
- En contexte mutant *vrn1* ou *vrn2*, la répression de FLC n'est pas maintenue après vernalisation, ce qui conduit à un retard de la floraison.



*Contrôle de l'expression du gène flc et floraison (dans  
Medecine Sciences, 2005, 21)*



Contrôle de l'expression du gène *flc* et floraison (S. Dalaine)



*La modification des histones (méthylation) sous contrôle environnemental ( $T^{\circ}C$  froide puis rallongement de la photopériode) inhibe l'expression du gène *FLC*, et permet la différenciation du méristème végétatif en méristème inflorescentiel*

# PLAN DU COURS

## **I. Mise en évidence d'un contrôle de l'expression de l'information génétique**

- A. Diversité du transcriptome chez les pluricellulaires
- B. L'expression du génome peut être étudiée grâce à différentes techniques de biologie moléculaire
- C. La variation du transcriptome peut être contrôlée par les facteurs environnementaux
- D. L'expression de gènes est contrôlée par des facteurs internes

## **II. Le contrôle épigénétique pré-transcriptionnel agit au niveau de la compaction de la chromatine**

- A. Mise en évidence
- B. Les modifications covalentes des histones
- C. Application dans le cas de la vernalisation

## **III. Le contrôle épigénétique pré-transcriptionnel agit au niveau de l'ADN**

- A. Modification de l'ADN par méthylation
- B. Modification à l'échelle d'un chromosome

## **IV. Le contrôle de l'initiation de la transcription par les séquences CIS et facteurs TRANS**

- A. Définitions
- B. Séquences enhancers et silencers
- C. Facteurs TRANS: protéines régulatrices

## **V. Les petites ARN régulateurs**

- A. Mise en évidence fortuite des ARNi
- B. Elucidation du mode d'action des ARNi
- C. Intérêt évolutif des ARNi

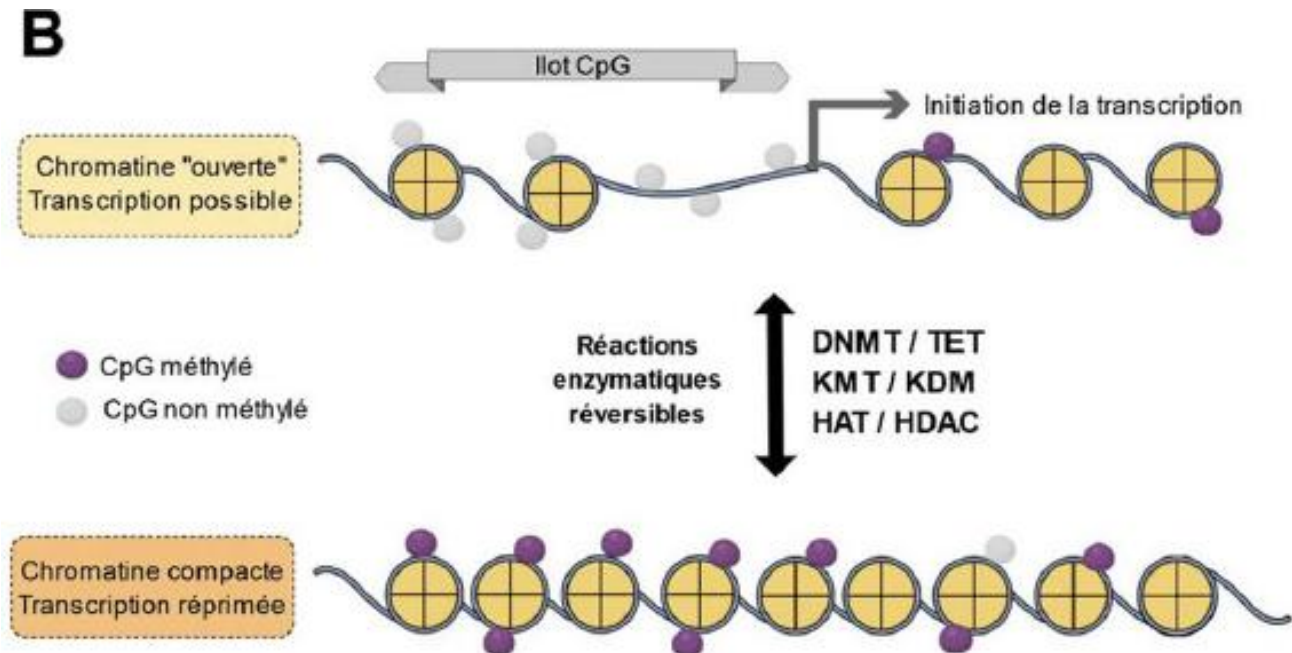
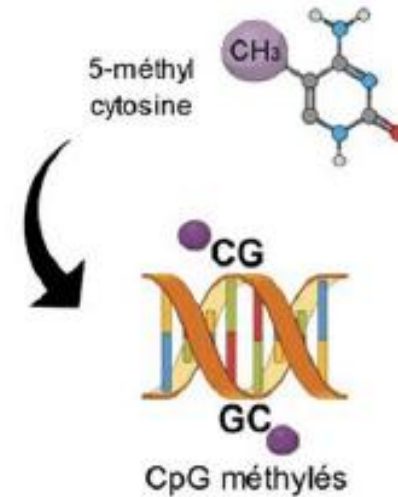
## **VI. Réflexion autour de l'épigénétique**

- A. Définitions
- B. Transmission des modifications épigénétiques

# III. LE CONTROLE EPIGENETIQUE PRE-TRANSCRIPTIONNEL AGIT AU NIVEAU DE L'ADN

## A. MODIFICATIONS DE L'ADN PAR METHYLATION

- Modification de l'ADN la plus fréquente : **méthylation de l'ADN**
  - ajout d'un groupement méthyle sur les bases azotées
- La méthylation affecte souvent les Cytosines des « îlots CpG » **présents dans les promoteurs** des gènes.
  - Séquences répétées riches en C et G :  
5' CGCGCGCGCGCG 3'
  - ~10% des C des Vertébrés sont méthylées
- La méthylation **inhibe la transcription** des séquences concernées.
- Mécanisme possible :
  - îlots méthylés reconnus par des protéines (*readers*)
    - désacétylation locale des histones
    - compaction de l'ADN



# PLAN DU COURS

## **I. Mise en évidence d'un contrôle de l'expression de l'information génétique**

- A. Diversité du transcriptome chez les pluricellulaires
- B. L'expression du génome peut être étudiée grâce à différentes techniques de biologie moléculaire
- C. La variation du transcriptome peut être contrôlée par les facteurs environnementaux
- D. L'expression de gènes est contrôlée par des facteurs internes

## **II. Le contrôle épigénétique pré-transcriptionnel agit au niveau de la compaction de la chromatine**

- A. Mise en évidence
- B. Les modifications covalentes des histones
- C. Application dans le cas de la vernalisation

## **III. Le contrôle épigénétique pré-transcriptionnel agit au niveau de l'ADN**

- A. Modification de l'ADN par méthylation
- B. Modification à l'échelle d'un chromosome

## **IV. Le contrôle de l'initiation de la transcription par les séquences CIS et facteurs TRANS**

- A. Définitions
- B. Séquences enhancers et silencers
- C. Facteurs TRANS: protéines régulatrices

## **V. Les petites ARN régulateurs**

- A. Mise en évidence fortuite des ARNi
- B. Elucidation du mode d'action des ARNi
- C. Intérêt évolutif des ARNi

## **VI. Réflexion autour de l'épigénétique**

- A. Définitions
- B. Transmission des modifications épigénétiques

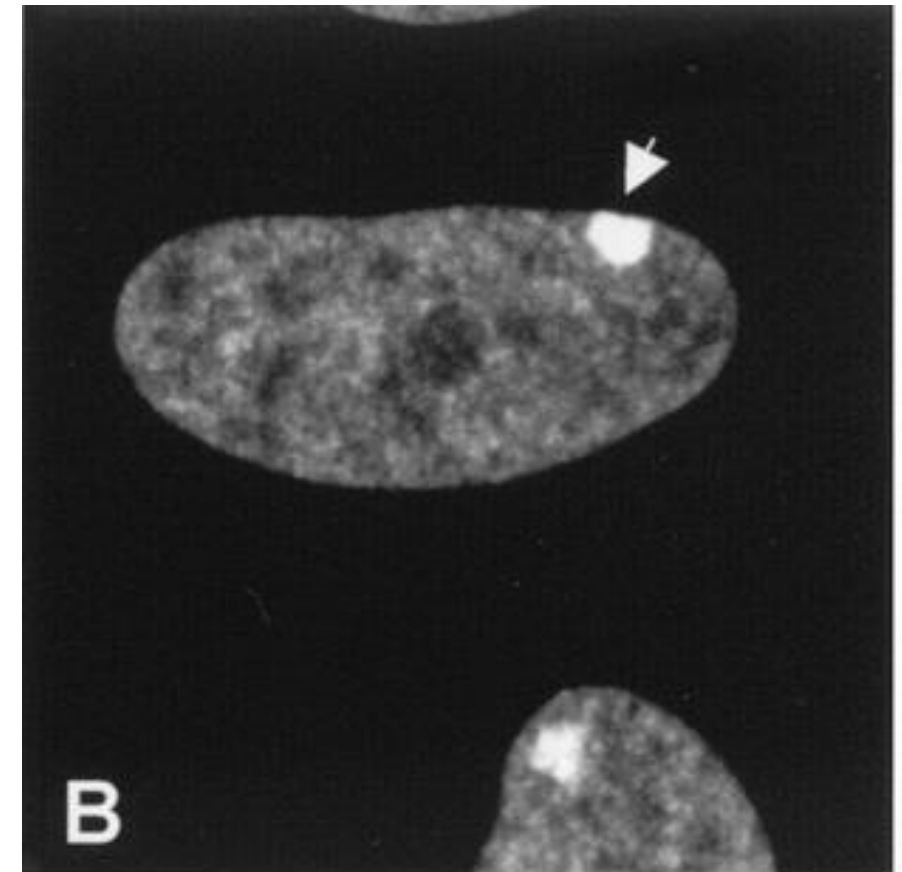
### III. LE CONTROLE EPIGENETIQUE PRE-TRANSCRIPTIONNEL AGIT AU NIVEAU DE L'ADN

#### B. MODIFICATIONS A L'ECHELLE D'UN CHROMOSOME : EXEMPLE DE L'INACTIVATION DU X

- Les mammifères femelles possèdent 2 fois plus de gènes X que les mâles. Pourtant, il n'y a pas de surexpression de ces gènes.
- Chez les femelles, dans les noyaux, l'un des chromosomes est toujours présent sous la forme d'un **corpuscule de Barr**.  
→ état super-condensé du chromosome
- Conséquences : tous les gènes du chromosome sous forme super-condensé sont réprimés
- Mécanisme : intervention d'un **long ARN non codant (lncRNA)** codé par le chromosome X lui-même.

→ **Inactivation du X**

Mécanisme de répression  
des gènes X chez les  
femelles ?



Immunofluorescence du corpuscule de Barr (voir  
flèche) sur des fibroblastes humains

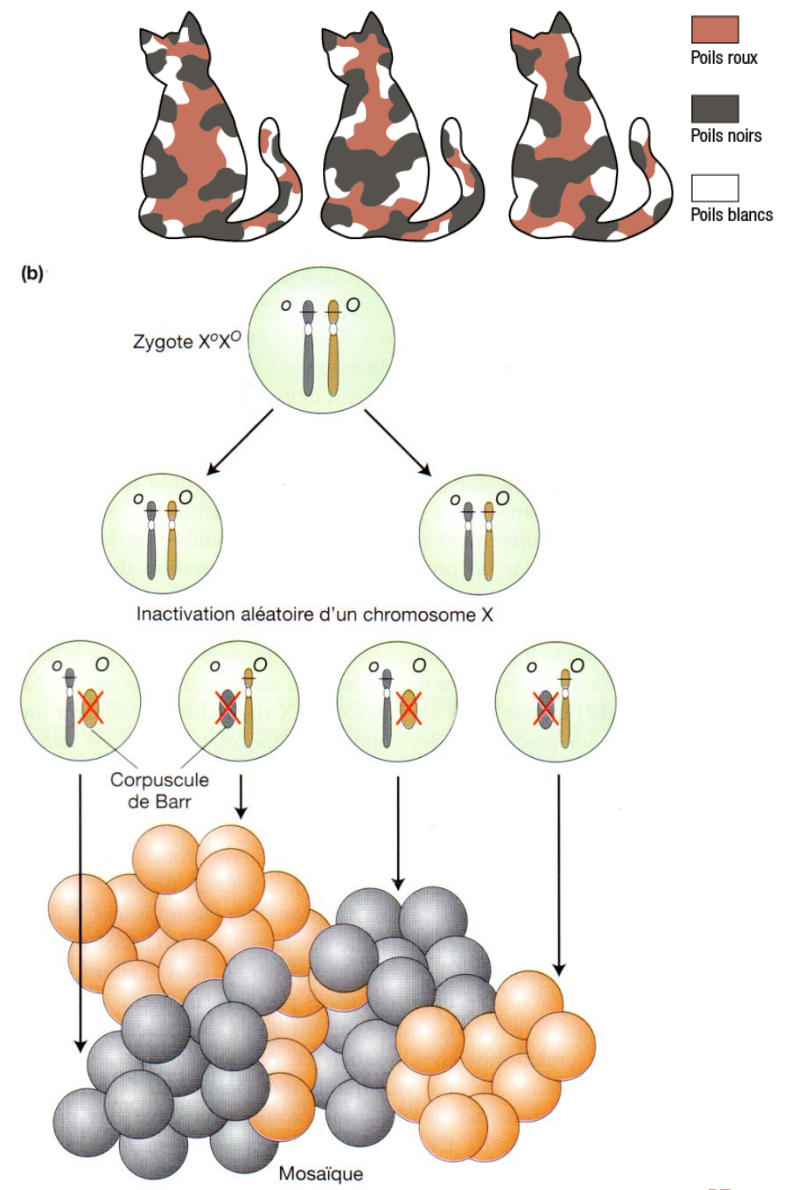
### III. LE CONTROLE EPIGENETIQUE PRE-TRANSCRIPTIONNEL AGIT AU NIVEAU DE L'ADN

#### B. MODIFICATIONS A L'ECHELLE D'UN CHROMOSOME : EXEMPLE DE L'INACTIVATION DU X

- **L'inactivation de l'X** intervient au niveau du **développement embryonnaire**.
- Elle touche **au hasard** l'un ou l'autre des 2 chromosomes de chaque cellule.
- L'état inactivé (super-condensé) est ensuite **transmis aux cellules filles**.



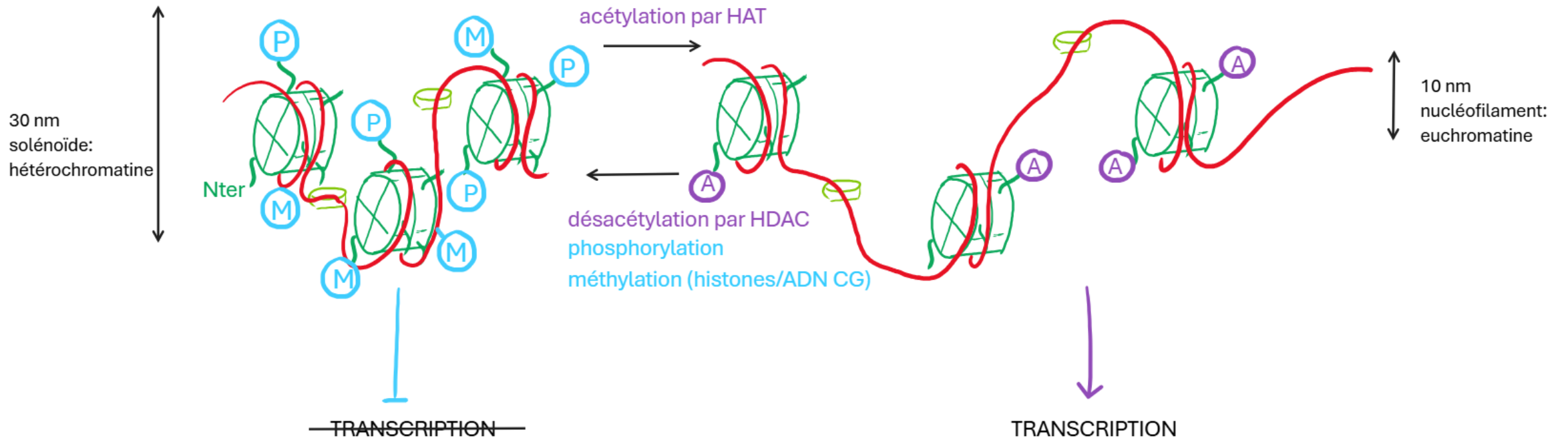
*Les chats calicots, témoins de l'inactivation du X chez les femelles*



**Les chats calico (tortie).**

- Chez le chat, le X porte un gène qui détermine la couleur du pelage  
→ 2 allèles : « roux » ou « noir ».
- Chez les femelles hétérozygotes, on observe un phénotype en écaille de tortue (= calico = tortie).
- Chez les mâles, on ne retrouve pas ce phénotype (sauf mutation génomique).
- Explication : l'inactivation aléatoire du X dans les cellules embryonnaires résulte en des lignées cellulaires de phénotype soit « noir » soit « roux ».

*Rem : un autre gène détermine la couleur blanche.*



### Schéma des modifications pré-transcriptionnelles des l'ADN

*Schéma bilan des modifications pré-transcriptionnels de l'ADN, méthylation des îlots CpG et modification covalentes des histones*

# PLAN DU COURS

## **I. Mise en évidence d'un contrôle de l'expression de l'information génétique**

- A. Diversité du transcriptome chez les pluricellulaires
- B. L'expression du génome peut être étudiée grâce à différentes techniques de biologie moléculaire
- C. La variation du transcriptome peut être contrôlée par les facteurs environnementaux
- D. L'expression de gènes est contrôlée par des facteurs internes

## **II. Le contrôle épigénétique pré-transcriptionnel agit au niveau de la compaction de la chromatine**

- A. Mise en évidence
- B. Les modifications covalentes des histones
- C. Application dans le cas de la vernalisation

## **III. Le contrôle épigénétique pré-transcriptionnel agit au niveau de l'ADN**

- A. Modification de l'ADN par méthylation
- B. Modification à l'échelle d'un chromosome

## **IV. Le contrôle de l'initiation de la transcription par les séquences CIS et facteurs TRANS**

- A. Définitions
- B. Séquences enhancers et silencers
- C. Facteurs TRANS: protéines régulatrices

## **V. Les petites ARN régulateurs**

- A. Mise en évidence fortuite des ARNi
- B. Elucidation du mode d'action des ARNi
- C. Intérêt évolutif des ARNi

## **VI. Réflexion autour de l'épigénétique**

- A. Définitions
- B. Transmission des modifications épigénétiques

# IV. LE CONTROLE DE L'INITIATION DE LA TRANSCRIPTION PAR INTERACTION SPECIFIQUE ENTRE SEQUENCE REGULATRICE (CIS) ET FACTEURS DE TRANSCRIPTION (TRANS)

## A. DÉFINITIONS: SÉQUENCES CIS ET FACTEURS TRANS

- **séquence cis** : (n.m.) **séquence d'ADN** capable d'influencer l'expression d'un gène, et étant localisée sur le même chromosome que ce gène ou sur un chromosome différent.

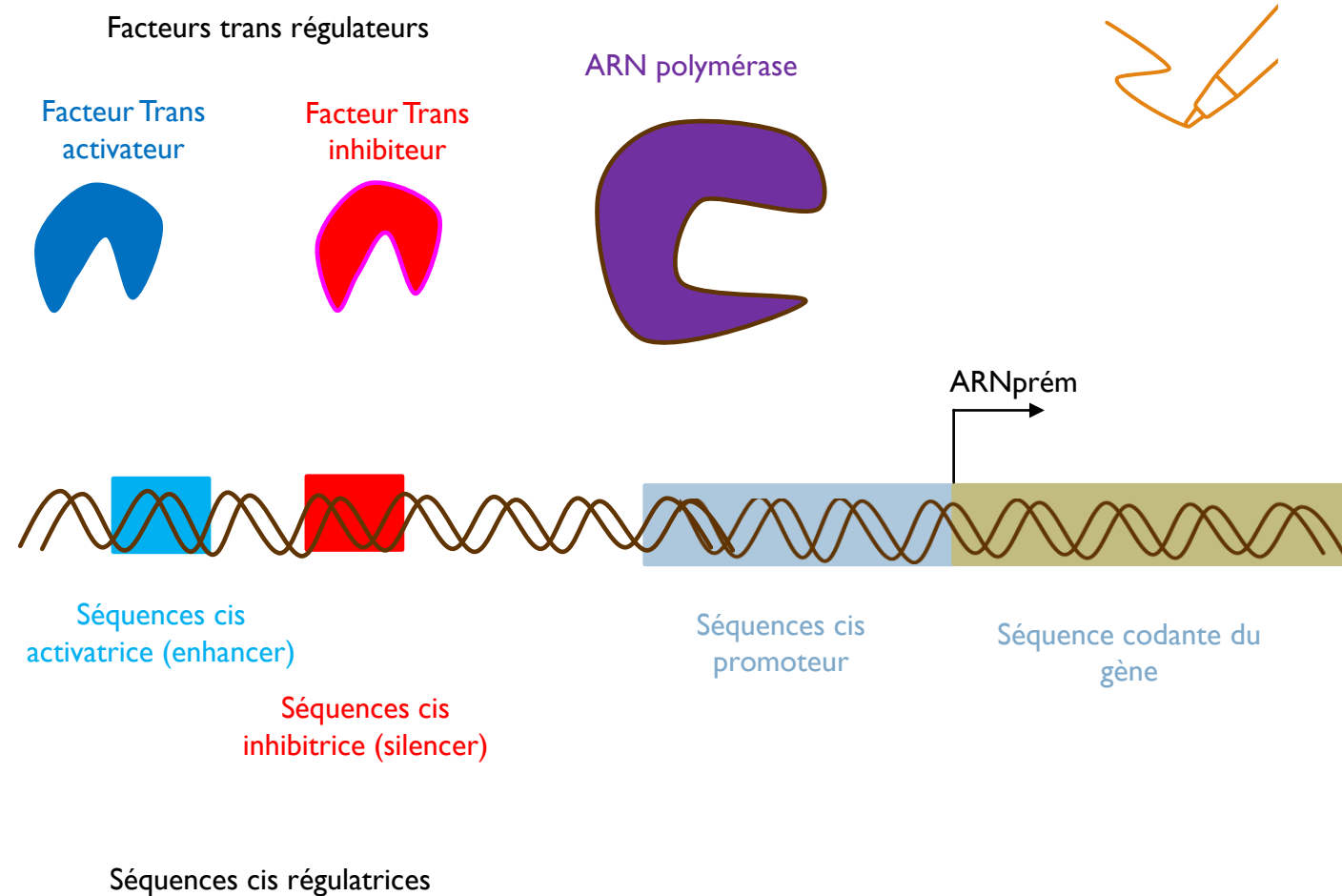
✓ *Enhancer, silencer*



- **Facteur trans** : (n.m.) **protéine** capable de diffuser et de se lier à l'ADN pour réguler l'expression des gènes.

✓ *Ex : TF généraux, activateurs, répresseurs*

→ **La transcription d'un gène résulte de l'intégration de multiples signaux de régulation, positifs et négatifs.**



*Séquences cis et facteurs trans régulant la transcription d'un gène*

# PLAN DU COURS

## I. Mise en évidence d'un contrôle de l'expression de l'information génétique

- A. Diversité du transcriptome chez les pluricellulaires
- B. L'expression du génome peut être étudiée grâce à différentes techniques de biologie moléculaire
- C. La variation du transcriptome peut être contrôlée par les facteurs environnementaux
- D. L'expression de gènes est contrôlée par des facteurs internes

## II. Le contrôle épigénétique pré-transcriptionnel agit au niveau de la compaction de la chromatine

- A. Mise en évidence
- B. Les modifications covalentes des histones
- C. Application dans le cas de la vernalisation

## III. Le contrôle épigénétique pré-transcriptionnel agit au niveau de l'ADN

- A. Modification de l'ADN par méthylation
- B. Modification à l'échelle d'un chromosome

## IV. Le contrôle de l'initiation de la transcription par les séquences CIS et facteurs TRANS

- A. Définitions
- B. Séquences enhancers et silencers
- C. Facteurs TRANS: protéines régulatrices

## V. Les petites ARN régulateurs

- A. Mise en évidence fortuite des ARNi
- B. Elucidation du mode d'action des ARNi
- C. Intérêt évolutif des ARNi

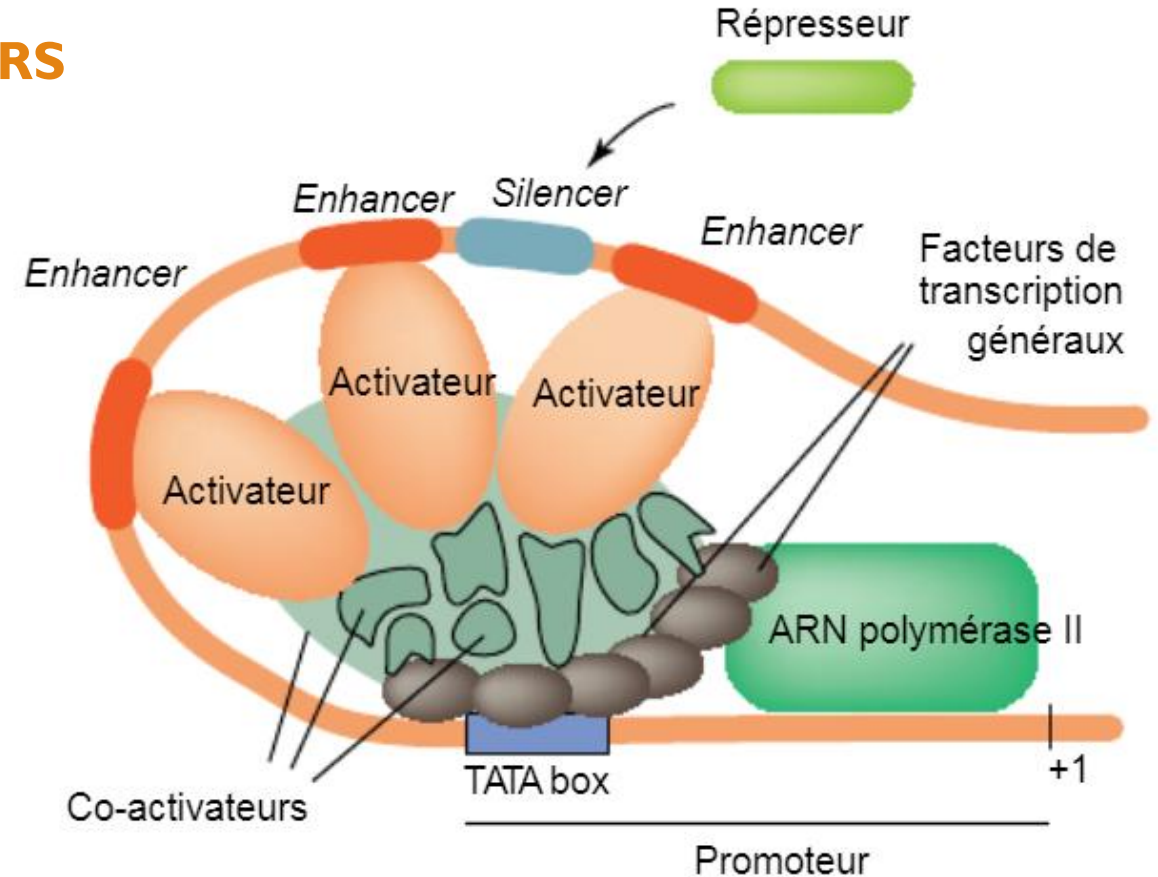
## VI. Réflexion autour de l'épigénétique

- A. Définitions
- B. Transmission des modifications épigénétiques

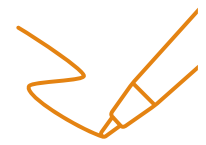
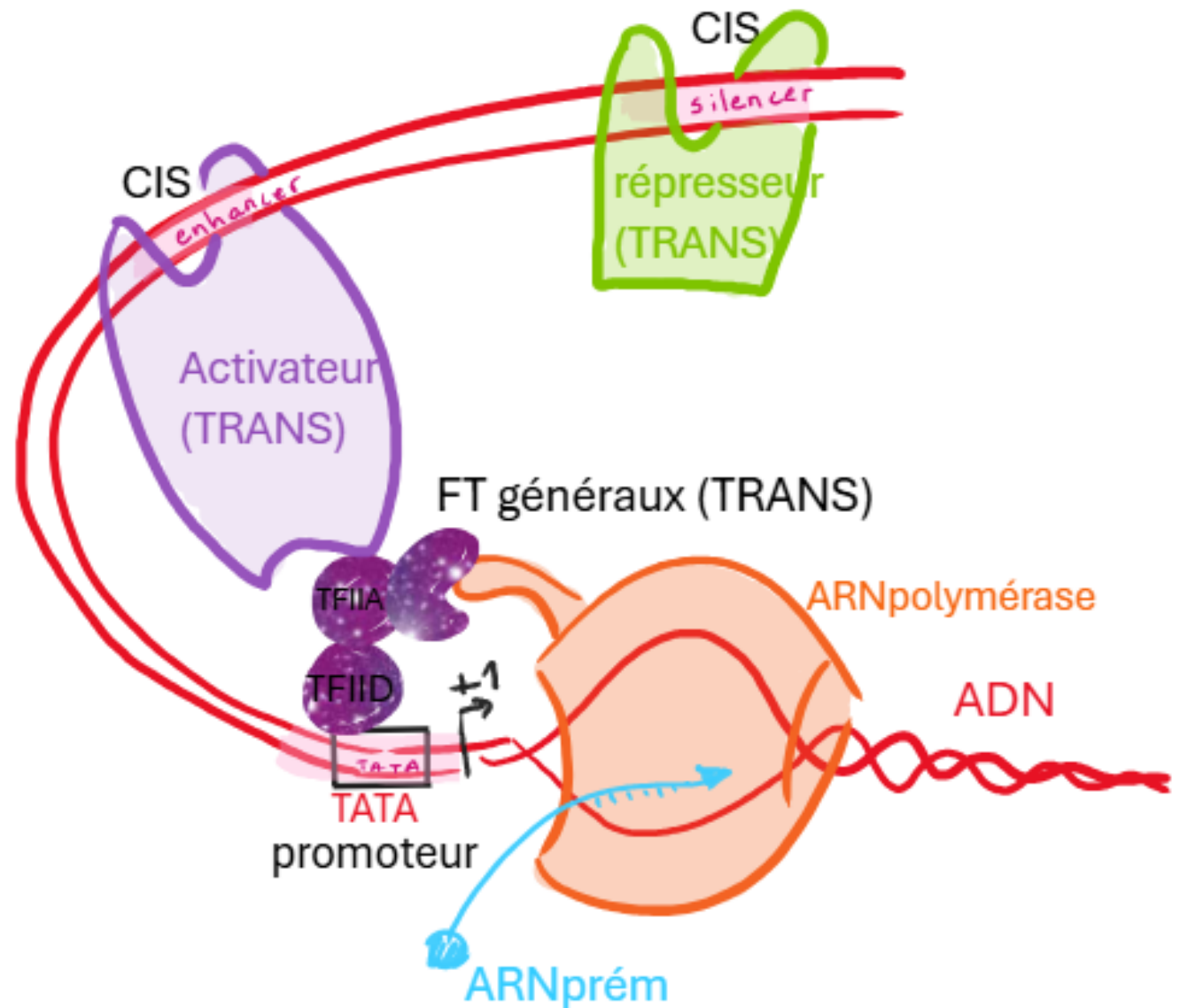
# IV. LE CONTROLE DE L'INITIATION DE LA TRANSCRIPTION PAR INTERACTION SPECIFIQUE ENTRE SEQUENCE REGULATRICE (CIS) ET FACTEURS DE TRANSCRIPTION (TRANS)

## B. SÉQUENCES ENHANCERS ET SILENCERS

- Localisation des **séquences cis-régulatrices** :
  - Très en amont du gène
  - Très en aval du gène
  - Au niveau des **introns**
- Deux types de séquence :
  - **Les enhancers**
    - ✓ séquences activatrices, amplificatrices
    - ✓ Nécessaires pour un niveau normal de transcription
    - ✓ Délétion de ces séquences →  $\searrow$  x 100 du taux de transcription
  - **Les silencers**
    - ✓ séquences inhibitrices, « atténuatrices »



Mode d'action des enhancers et silencers sur la transcription d'un gène



**Mode d'action des enhancers et silenciers sur la transcription d'un gène**

# PLAN DU COURS

## I. Mise en évidence d'un contrôle de l'expression de l'information génétique

- A. Diversité du transcriptome chez les pluricellulaires
- B. L'expression du génome peut être étudiée grâce à différentes techniques de biologie moléculaire
- C. La variation du transcriptome peut être contrôlée par les facteurs environnementaux
- D. L'expression de gènes est contrôlée par des facteurs internes

## II. Le contrôle épigénétique pré-transcriptionnel agit au niveau de la compaction de la chromatine

- A. Mise en évidence
- B. Les modifications covalentes des histones
- C. Application dans le cas de la vernalisation

## III. Le contrôle épigénétique pré-transcriptionnel agit au niveau de l'ADN

- A. Modification de l'ADN par méthylation
- B. Modification à l'échelle d'un chromosome

## IV. Le contrôle de l'initiation de la transcription par les séquences CIS et facteurs TRANS

- A. Définitions
- B. Séquences enhancers et silencers
- C. Facteurs TRANS: protéines régulatrices

## V. Les petites ARN régulateurs

- A. Mise en évidence fortuite des ARNi
- B. Elucidation du mode d'action des ARNi
- C. Intérêt évolutif des ARNi

## VI. Réflexion autour de l'épigénétique

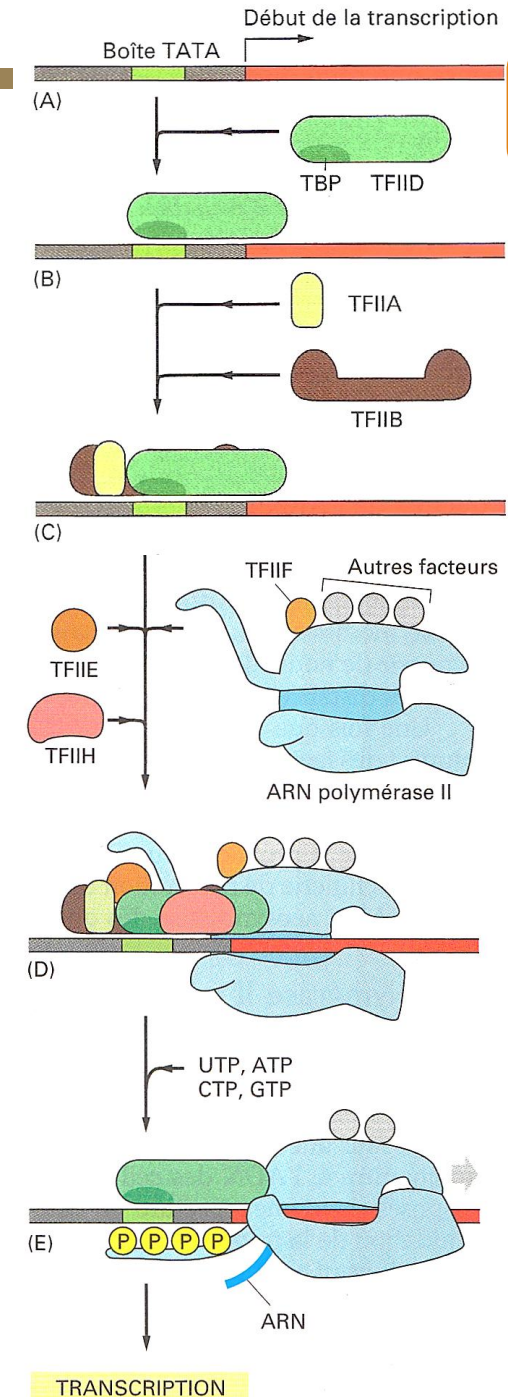
- A. Définitions
- B. Transmission des modifications épigénétiques

## IV. LE CONTROLE DE L'INITIATION DE LA TRANSCRIPTION PAR INTERACTION SPECIFIQUE ENTRE SEQUENCE REGULATRICE (CIS) ET FACTEURS DE TRANSCRIPTION (TRANS)

### C. INITIATION ET TERMINAISON DE LA TRANSCRIPTION

#### Fonctionnement d'un promoteur

- Assemblage d'un complexe de pré-initiation TFIID orienté au niveau de la TATA box
  - Entraîne une courbure locale de l'ADN
    - Recrutement d'autres facteurs de transcription TFII
      - ✓ Fixation orientée de l'ARN polymérase II
- Effets du complexe de pré-initiation :
  - TFIIIE : activité hélicase → ouverture de la double hélice d'ADN
  - TFIIH : phosphorylation de la queue C-ter de l'ARN polymérase → séparation de l'ARN pol du complexe de pré-initiation → début de la transcription
  - Détachement des facteurs de transcription



Cf SV-F-2



## IV. LE CONTROLE DE L'INITIATION DE LA TRANSCRIPTION PAR INTERACTION SPECIFIQUE ENTRE SEQUENCE REGULATRICE (CIS) ET FACTEURS DE TRANSCRIPTION (TRANS)

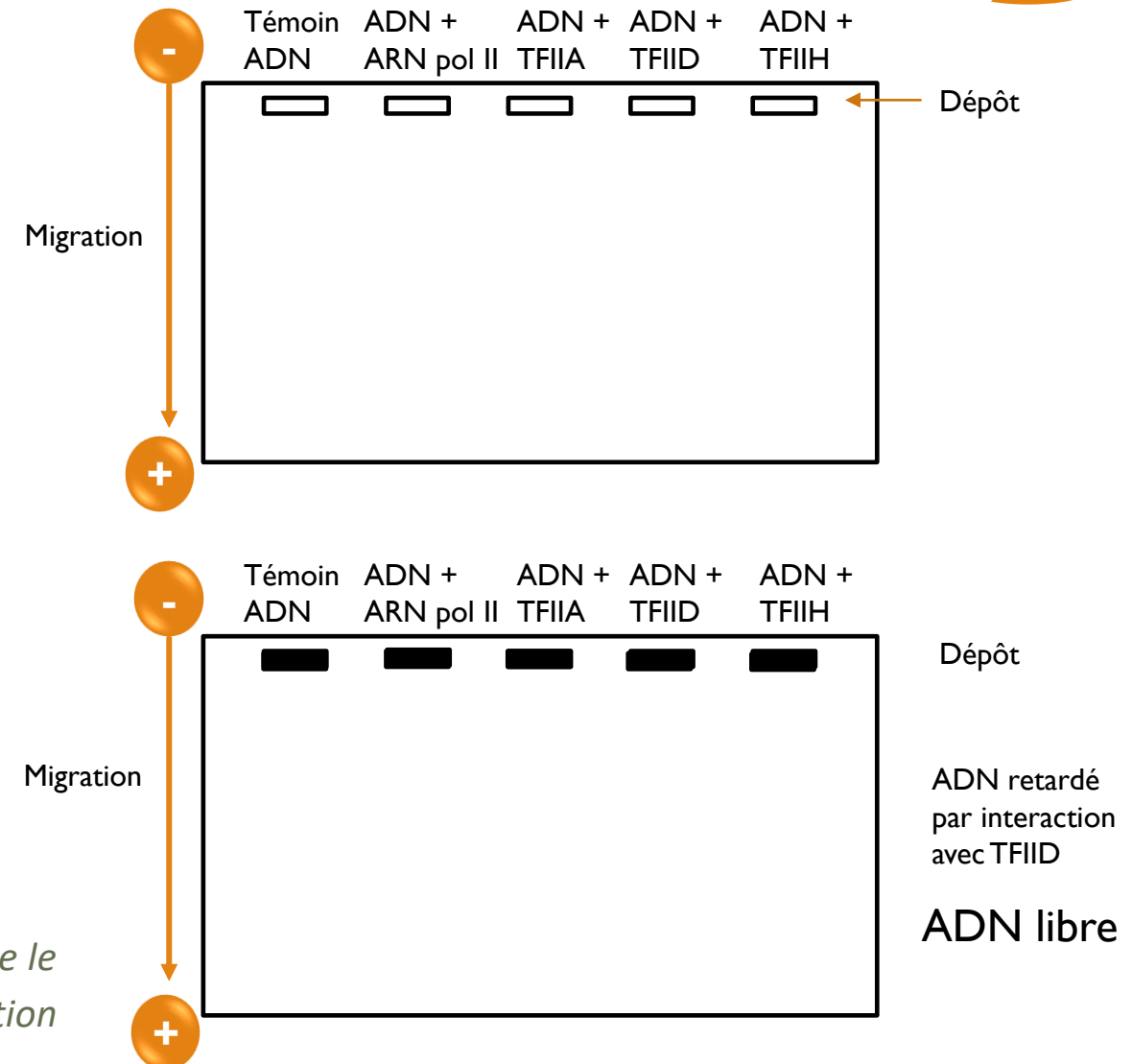
### C. INITIATION ET TERMINAISON DE LA TRANSCRIPTION

#### I.2 les facteurs de transcription se lient à l'ADN

#### Technique de retard sur gel

- **Objectif** : identifier des interactions entre acides nucléiques et protéines
- **Principe** :
  1. On incube un fragment d'acide nucléique portant une séquence particulière avec différentes protéines (tubes séparés).
  2. On soumet les différents mélanges à une électrophorèse sur un gel.

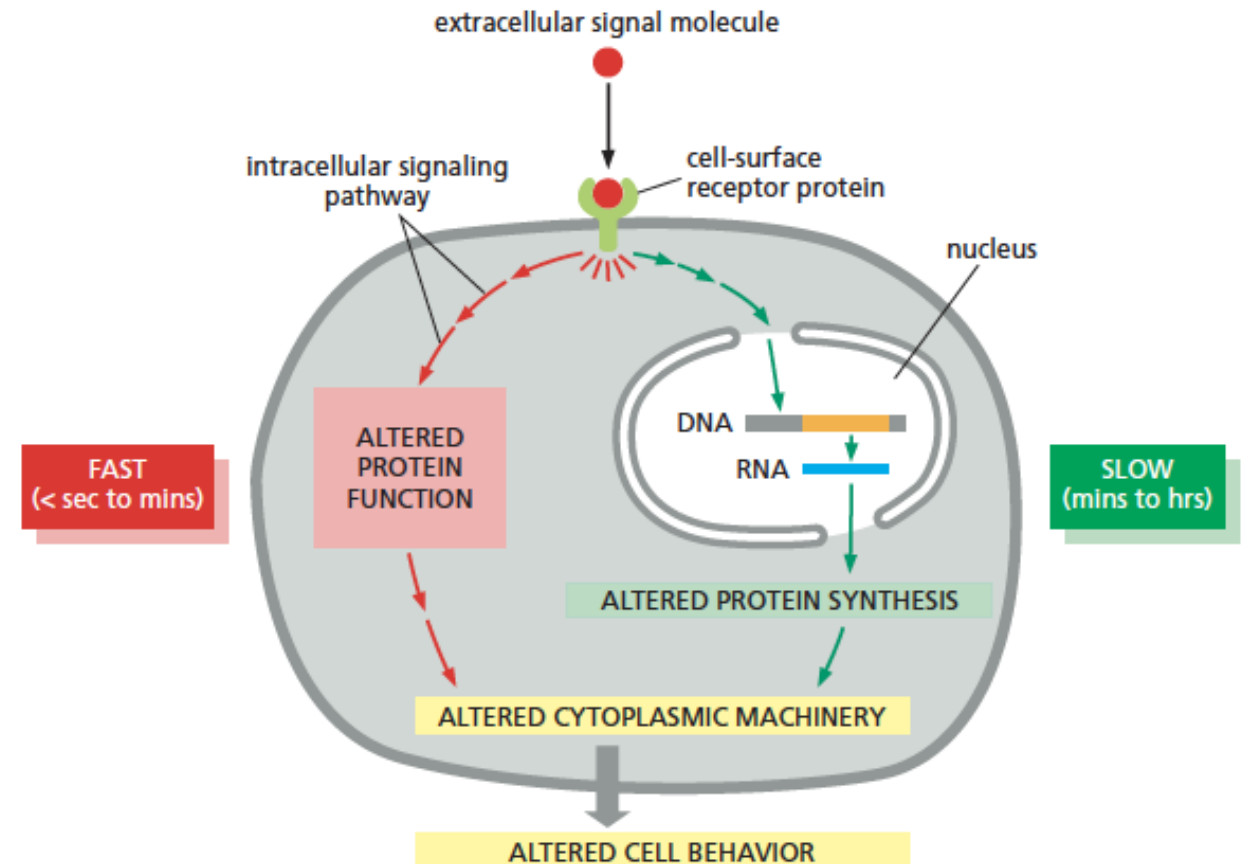
*Méthode de retard du gel pour comprendre le lien ADN-facteurs de transcription*



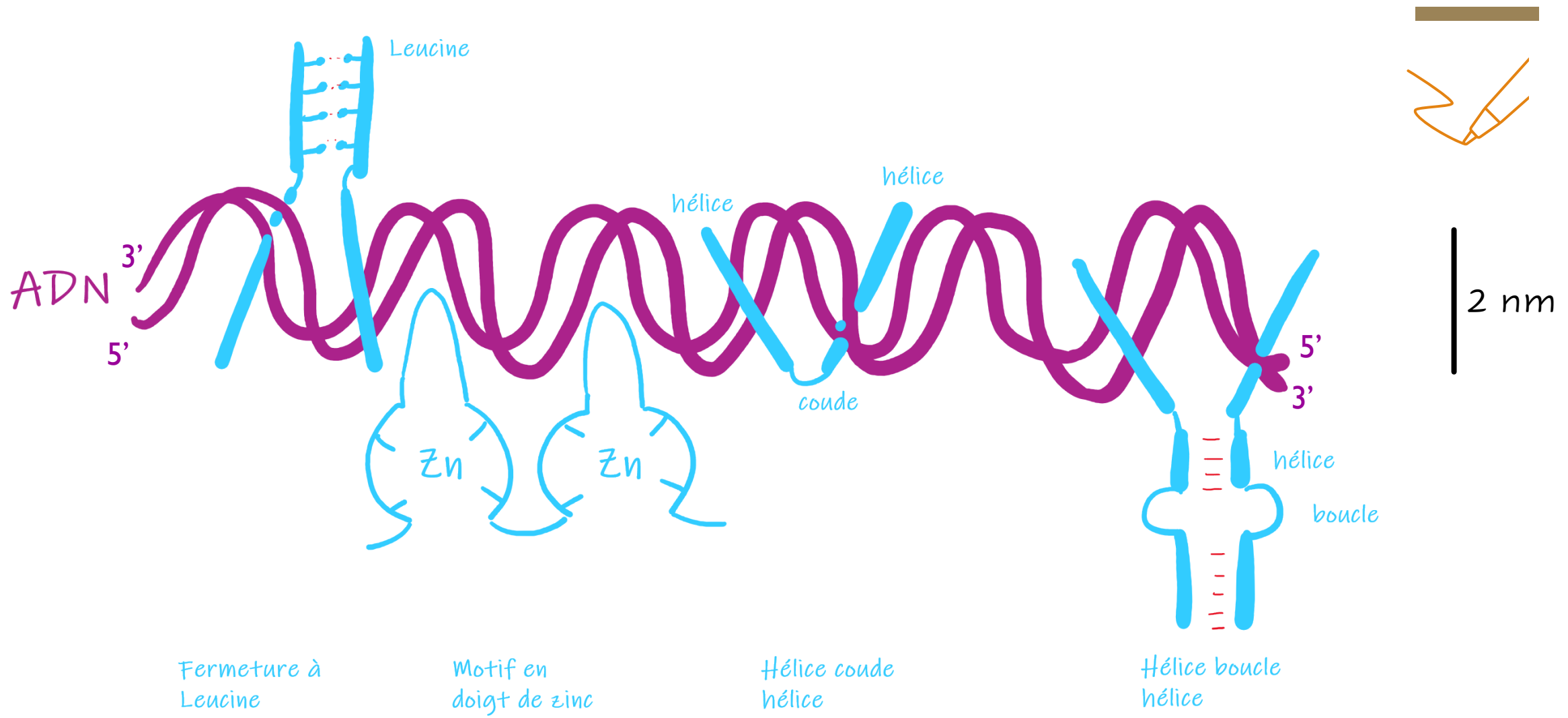
# IV. LE CONTROLE DE L'INITIATION DE LA TRANSCRIPTION PAR INTERACTION SPECIFIQUE ENTRE SEQUENCE REGULATRICE (CIS) ET FACTEURS DE TRANSCRIPTION (TRANS)

## C. FACTEURS TRANS : PROTEINES REGULATRICES

- Des signaux externes à la cellule peuvent réguler la transcription  
→ expression de gènes adaptés en réponse au signal
- Les **récepteurs** de molécules **signal hydrophile** (sauf récepteurs-canaux) **activent** des **facteurs trans** via une voie de transduction.  
→ Réponse nucléaire retardée ( $\neq$  réponse cytoplasmique rapide)
- Les **récepteurs** de molécules **signal hydrophobes** sont **intracellulaires** et sont eux-mêmes des **facteurs trans** (régulateurs de la transcription)



Réponse rapide et retardée à un signal extracellulaire hydrophile

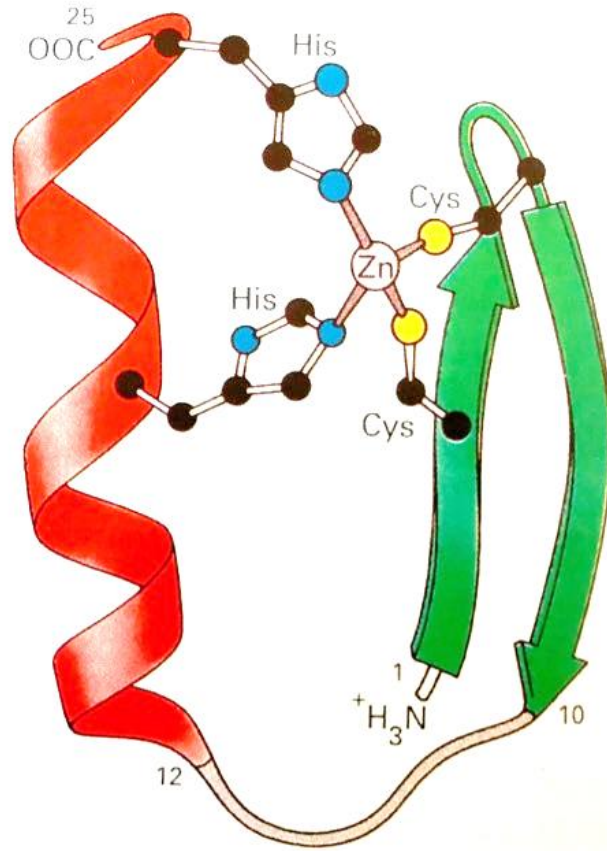


Diversité des motifs des facteurs de transcription (S. Dalaine)

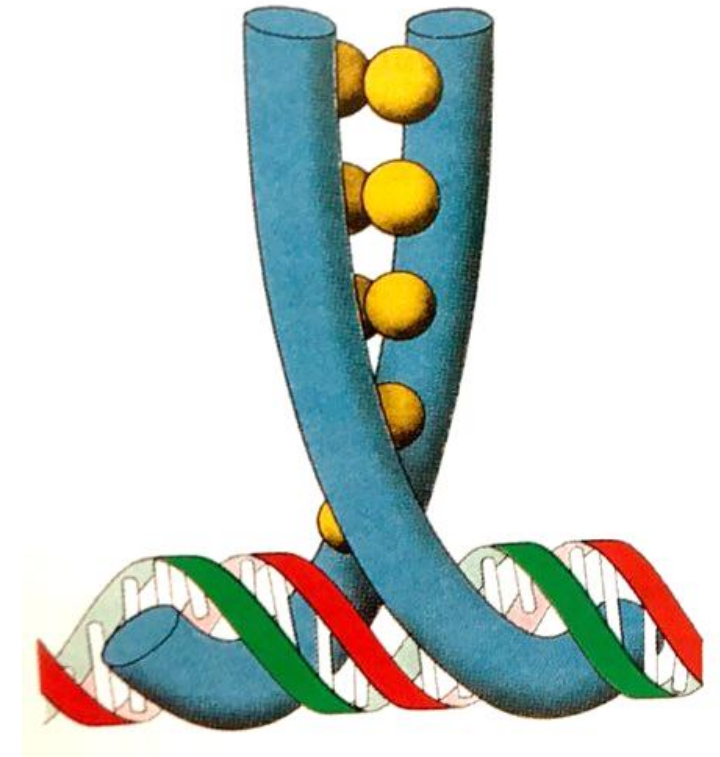
**Figure 37-33**

Représentation schématique d'un doigt de zinc. Une épingle à cheveux  $\beta$  antiparallèle (vert) et une boucle (gris) sont suivies par une hélice  $\alpha$  (rouge) qui joue un rôle clé dans la reconnaissance du DNA. Un ion zinc est lié à deux résidus histidine de l'hélice et à deux résidus cystéine du feuillet  $\beta$ . [D'après C. Branden et J. Tooze. *Introduction to Molecular Structure*. (Garland; 1991), p. 117.]

D'après Stryer 4<sup>e</sup> ed



D'après Stryer 4<sup>e</sup> ed



**Figure 37-39**

Représentation schématique montrant le mode hypothétique de liaison d'une protéine à fermeture éclair à leucine à une séquence de DNA cible palindromique. [D'après C.R. Vinson, P.B. Sigler et S.L. McKnight. *Science* 246(1989):911.]

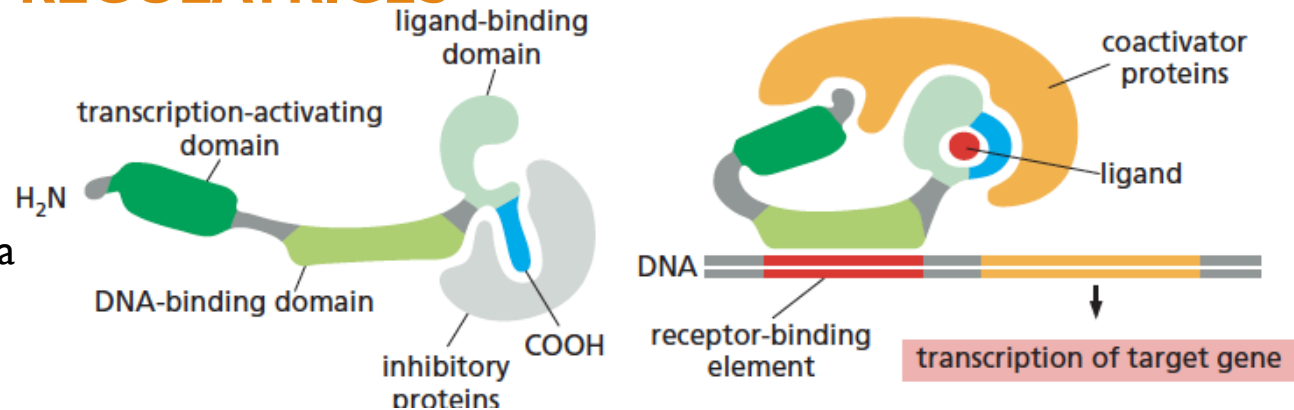
# IV. LE CONTROLE DE L'INITIATION DE LA TRANSCRIPTION PAR INTERACTION SPECIFIQUE ENTRE SEQUENCE REGULATRICE (CIS) ET FACTEURS DE TRANSCRIPTION (TRANS)

## C. FACTEURS CIS ET TRANS : PROTEINES REGULATRICES

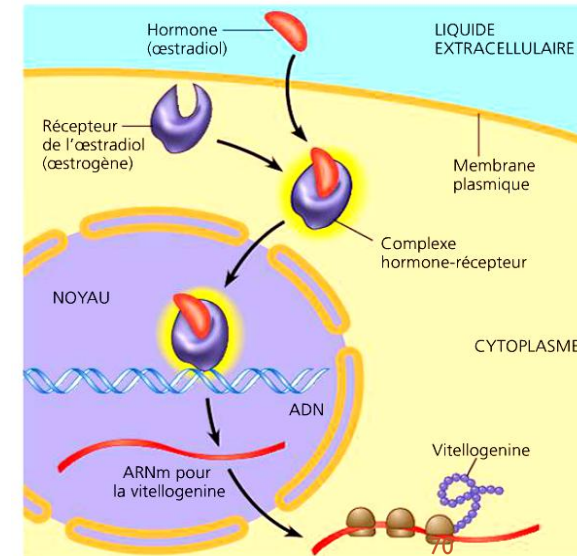
### Cas des hormones liposolubles

ex : œstradiol, testostérone

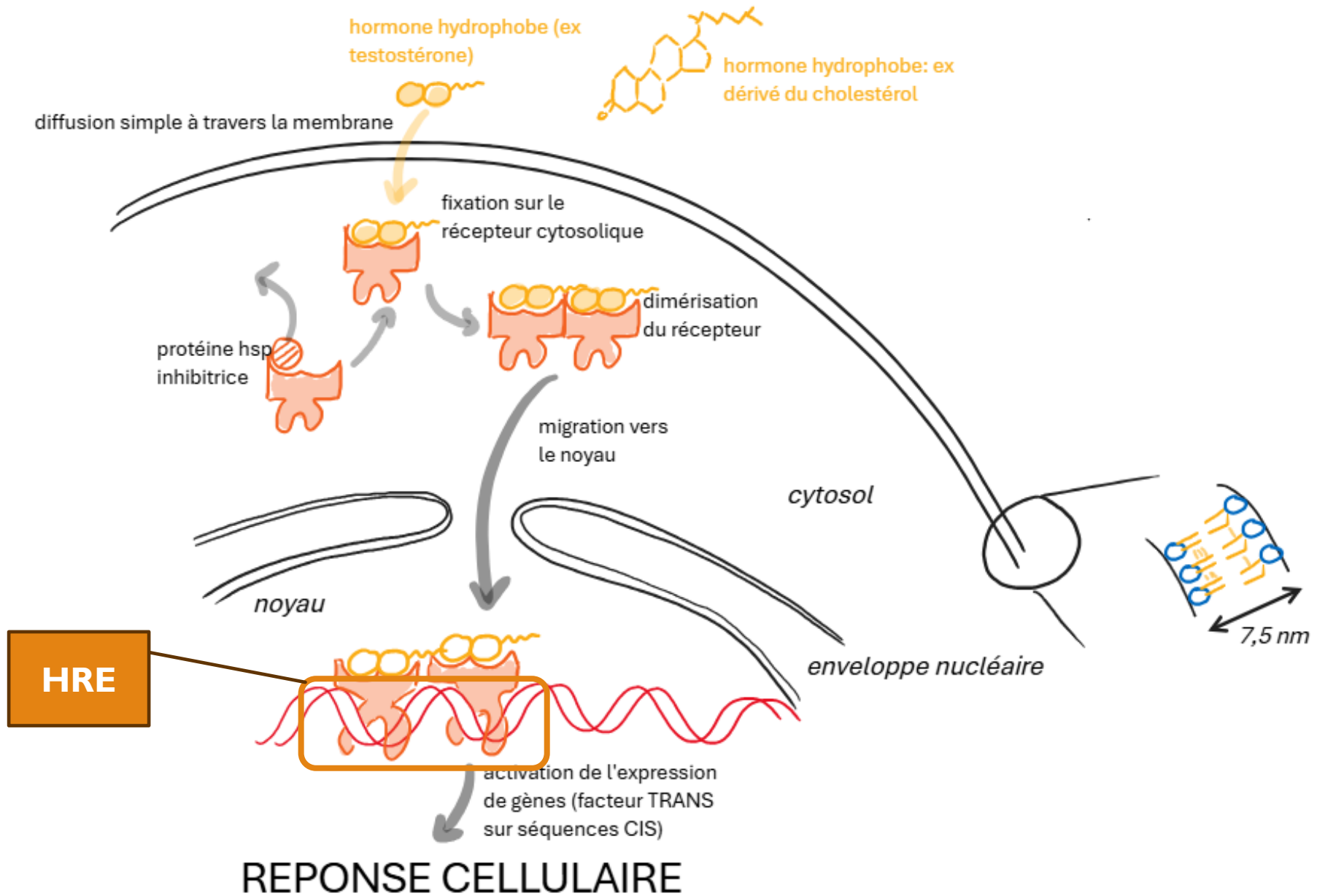
- Structure du récepteur : 1 domaine de liaison à l'ADN + 1 domaine de liaison à l'hormone + 1 domaine d'activation de la transcription
- En l'absence de ligand → **inactivation du récepteur par association à une protéine inhibitrice**
- En présence de ligand → activation du récepteur : changement de conformation par fixation du ligand entraînant le détachement de la protéine inhibitrice.
- Étapes
  - Diffusion à travers la membrane plasmique
  - Liaison à un récepteur intracellulaire
  - Entrée dans le noyau et fixation à l'ADN du récepteur au niveau d'une séquence spécifique = **HRE (hormone response element) proche du promoteur de certains gènes** → **Activation de la transcription**



Structure du récepteur des hormones stéroïdes, inactif et actif



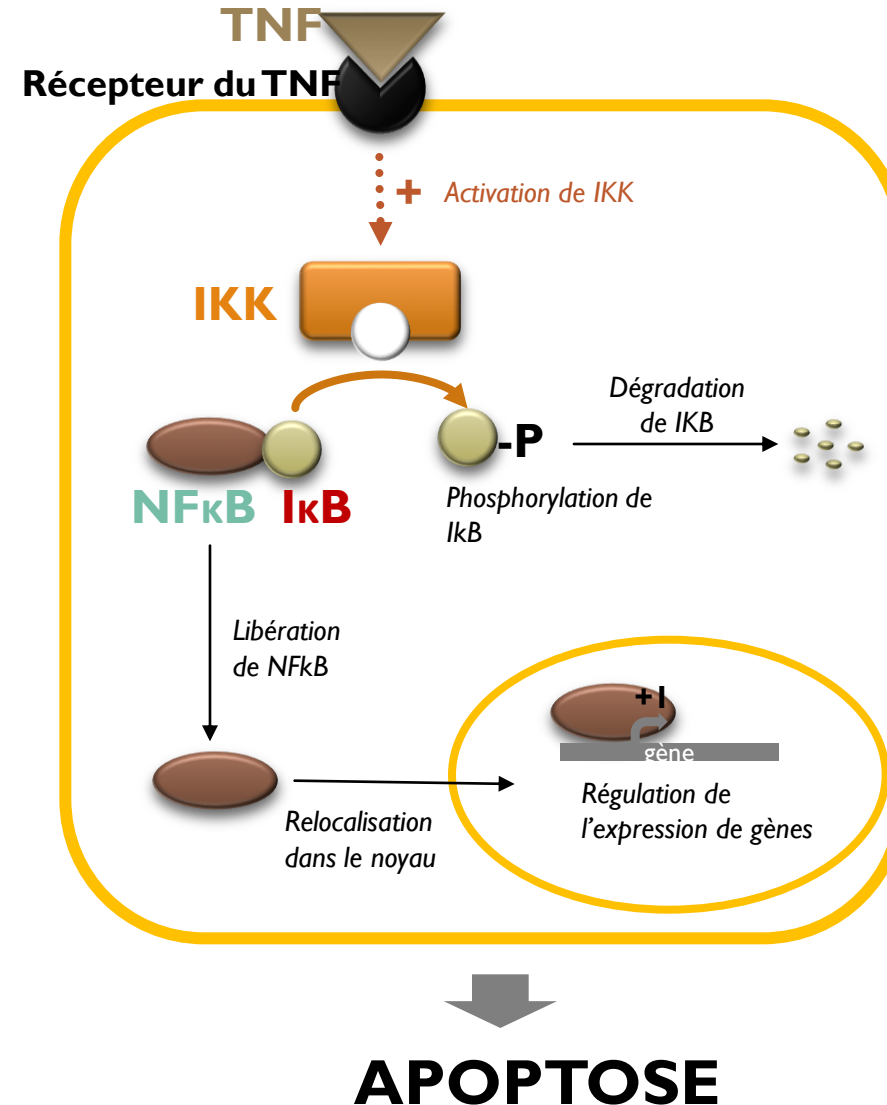
Régulation de la transcription par les récepteurs d'hormones stéroïdes



## Exercice 4 – Sujet ENS 2005

## QUESTION 8

- 1) Le TNF se fixe sur son récepteur qui envoie un signal dans la cellule active la kinase IKK
- 2) IKK phosphoryle I $\kappa$ B
- 3) I $\kappa$ B se détache de NF $\kappa$ B et est dégradé (par le protéasome sans doute).
- 4) NF $\kappa$ B étant libre est relocalisé dans le noyau où il modifie l'expression de certains gènes.
- 5) Les modifications induites par le TNF sur NF $\kappa$ B et d'autres molécules conduisent à l'apoptose.



# PLAN DU COURS

## I. Mise en évidence d'un contrôle de l'expression de l'information génétique

- A. Diversité du transcriptome chez les pluricellulaires
- B. L'expression du génome peut être étudiée grâce à différentes techniques de biologie moléculaire
- C. La variation du transcriptome peut être contrôlée par les facteurs environnementaux
- D. L'expression de gènes est contrôlée par des facteurs internes

## II. Le contrôle épigénétique pré-transcriptionnel agit au niveau de la compaction de la chromatine

- A. Mise en évidence
- B. Les modifications covalentes des histones
- C. Application dans le cas de la vernalisation

## III. Le contrôle épigénétique pré-transcriptionnel agit au niveau de l'ADN

- A. Modification de l'ADN par méthylation
- B. Modification à l'échelle d'un chromosome

## IV. Le contrôle de l'initiation de la transcription par les séquences CIS et facteurs TRANS

- A. Définitions
- B. Séquences enhancers et silencers
- C. Facteurs TRANS: protéines régulatrices

## V. Les petites ARN régulateurs

- A. Mise en évidence fortuite des ARNi
- B. Elucidation du mode d'action des ARNi
- C. Intérêt évolutif des ARNi

## VI. Réflexion autour de l'épigénétique

- A. Définitions
- B. Transmission des modifications épigénétiques

## V. LES PETITS ARN REGULATEURS : UN CONTROLE POST-TRANSCRIPTIONNEL

### A. MISE EN ÉVIDENCE FORTUITE DES ARN INTERFÉRENTS

#### ❖ Contexte:

Dans les années 90, des chercheurs ont fait la tentative d'assombrir des pétunias en introduisant des exemplaires supplémentaires des gènes codant une enzyme productrice de pigments.

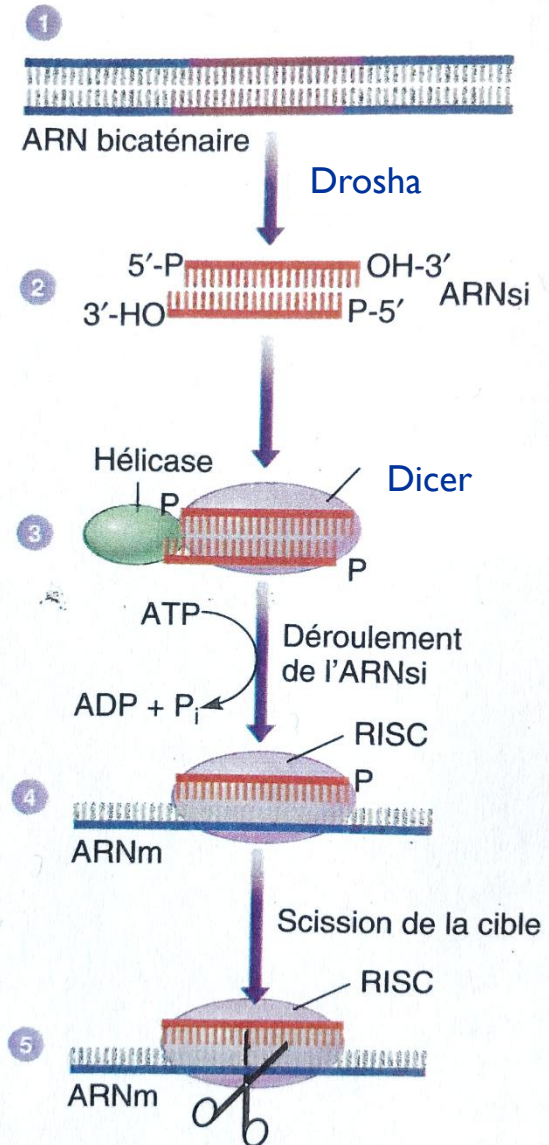
#### ❖ Résultats:

A la surprise des chercheurs, les pétales ont perdu leur couleur...



# V. LES PETITS ARN REGULATEURS : UN CONTROLE POST-TRANSCRIPTIONNEL

## B. ELUCIDATION DU MODE D'ACTION DES ARN BICATÉNAIRES (ARNSI)



Karp, p.465

① L'ARN exogène, produit en grande quantité, forme un double brin

② obtention d'un petit ARNsi (une vingtaine de nucléotides) avec des extrémités en surplomb grâce à une endonucléase Droscha

③ l'ARNsi s'associe à une hélicase et à une enzyme « éminceuses » (Dicer), dégradant un des deux brins d'ARNsi

④ L'ARNsi monocaténaire actif, associé à RISC (RNA induced silencing complex), s'unit à l'ARNm cible possédant une séquence complémentaire

⑤ L'ARNm est alors dégradé

# V. LES PETITS ARN REGULATEURS : UN CONTROLE POST-TRANSCRIPTIONNEL

## B. ELUCIDATION DU MODE D'ACTION DES ARN BICATÉNAIRES (ARNsi)

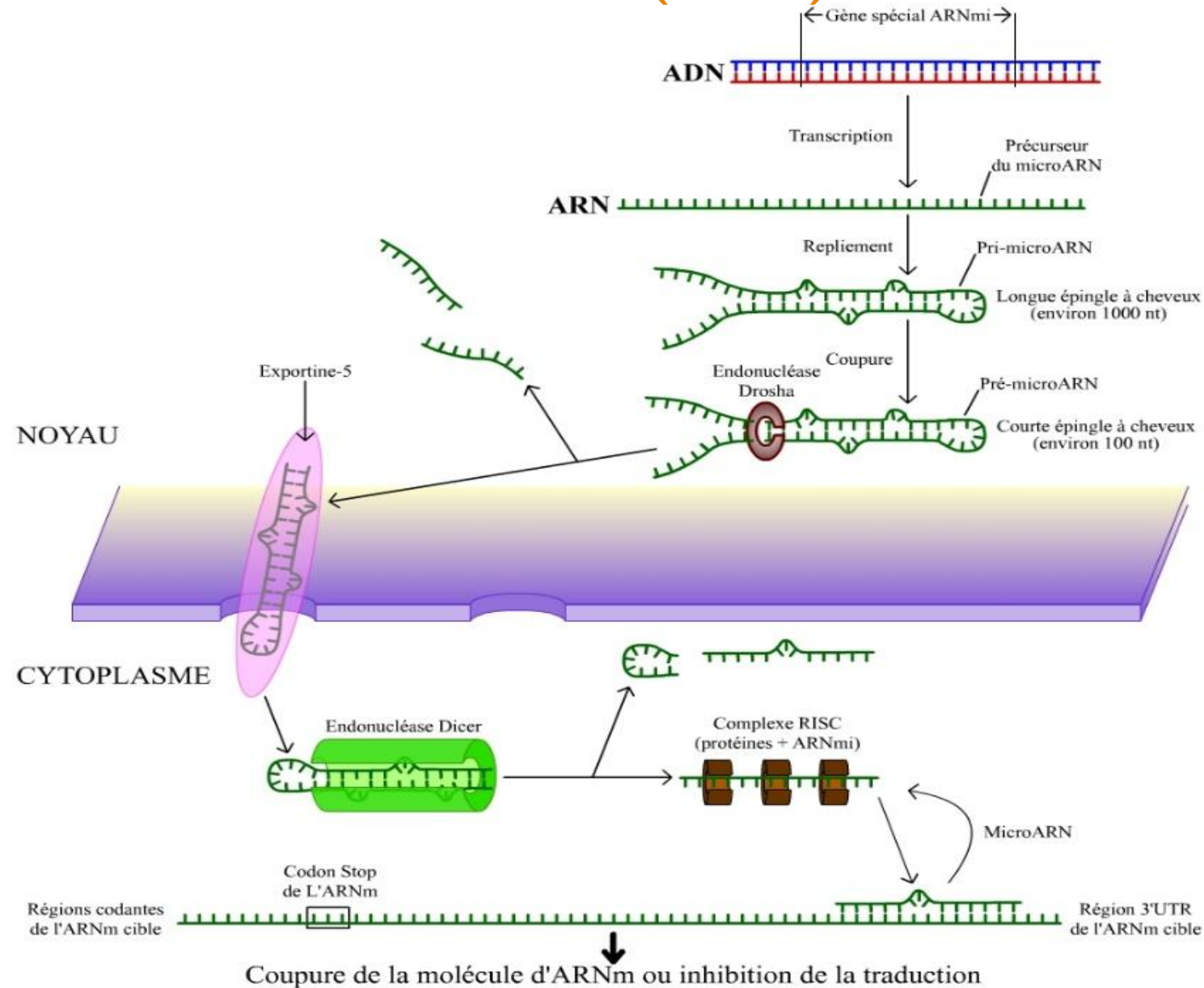
① L'ARN produit en grande quantité, forme un double brin ou ADN code un ARNmi spécial

② obtention d'un petit ARNmi (une vingtaine de nucléotides) avec des extrémités en surplomb grâce à une endonucléase Drosha

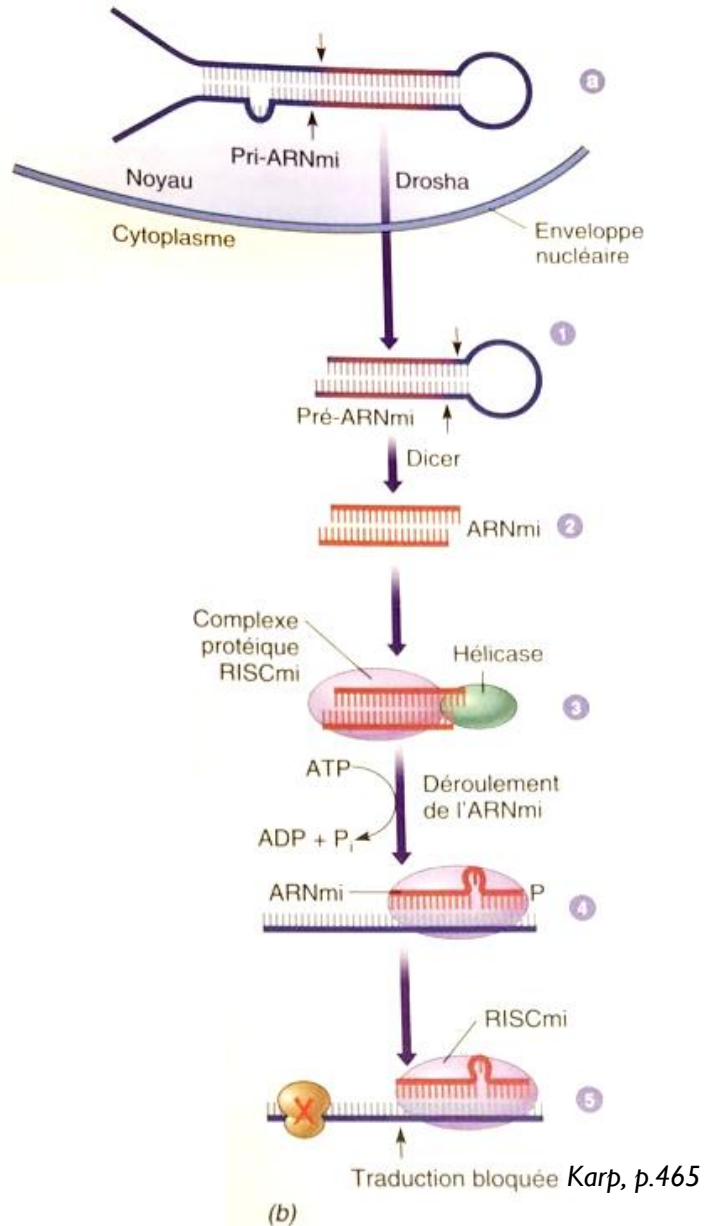
③ l'ARNmi s'associe à une hélicase et à une enzyme « éminceuse » (Dicer), dégradant un des deux brins d'ARNsi

④ L'ARNmi monocaténaire actif, associé à RISC, s'unit à l'ARNm cible possédant une séquence complémentaire

⑤ L'ARNm est alors dégradé



## ARNmi cousin de ARNsi



les micro-ARN dérivent d'ARN précurseurs monocaténaire possédant des séquences complémentaires qui leur permettent de se replier en ARN bicaténaire avec une boucle terminale. Ce pseudo ARNmi est scindé par une endonucléase (Drosha) et donne un pré-ARNmi avec un surplomb en 3'

① le pré-ARNmi est exporté vers le cytoplasme où il est scindé par Dicer en un petit ARNmi double, avec surplomb 3' aux deux bouts

② ③ l'ARNmi bicaténaire s'associe à RISC et à une hélicase

④ l'ARNmi mature s'unit à une région complémentaire d'un ARNm parfaitement (et alors dégradation) ou partiellement

⑤ L'ARNm associé imparfaitement à l'ARNmi bloque alors la traduction.

# PLAN DU COURS

## I. Mise en évidence d'un contrôle de l'expression de l'information génétique

- A. Diversité du transcriptome chez les pluricellulaires
- B. L'expression du génome peut être étudiée grâce à différentes techniques de biologie moléculaire
- C. La variation du transcriptome peut être contrôlée par les facteurs environnementaux
- D. L'expression de gènes est contrôlée par des facteurs internes

## II. Le contrôle épigénétique pré-transcriptionnel agit au niveau de la compaction de la chromatine

- A. Mise en évidence
- B. Les modifications covalentes des histones
- C. Application dans le cas de la vernalisation

## III. Le contrôle épigénétique pré-transcriptionnel agit au niveau de l'ADN

- A. Modification de l'ADN par méthylation
- B. Modification à l'échelle d'un chromosome

## IV. Le contrôle de l'initiation de la transcription par les séquences CIS et facteurs TRANS

- A. Définitions
- B. Séquences enhancers et silencers
- C. Facteurs TRANS: protéines régulatrices

## V. Les petites ARN régulateurs

- A. Mise en évidence fortuite des ARNi
- B. Elucidation du mode d'action des ARNi
- C. Intérêt évolutif des ARNi

## VI. Réflexion autour de l'épigénétique

- A. Définitions
- B. Transmission des modifications épigénétiques

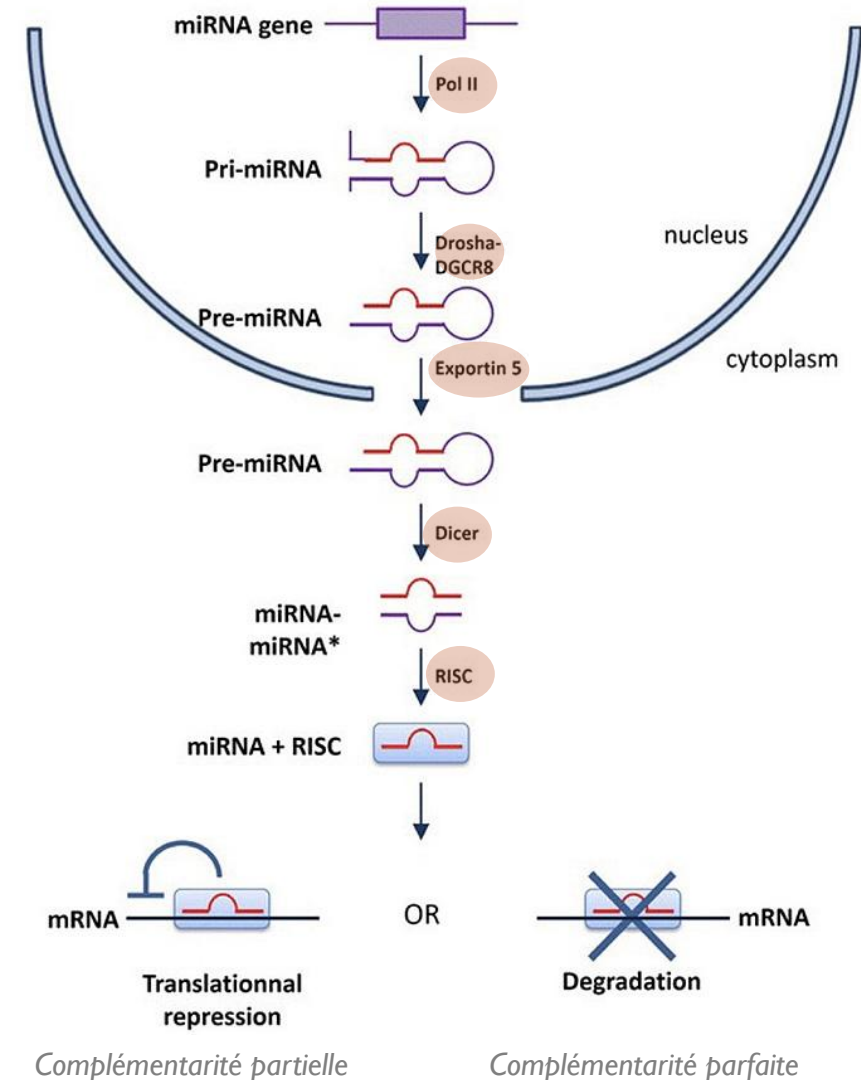
# V. LES PETITS ARN REGULATEURS : UN CONTROLE POST-TRANSCRIPTIONNEL

## B. ELUCIDATION DU MODE D'ACTION DES ARN BICATÉNAIRES (ARNSI)

### Exemple : régulation post-transcriptionnelle via les miRNA

1. Production d'un long précurseur de miRNA qui forme des structures double brin
2. Reconnaissance et clivage par une Rnase (**Dicer**)  
→ production du miRNA double brin
3. Dénaturation → miRNA simple brin
4. Association à un complexe enzymatique (**RISC** = RNA-induced silencing complex)
5. **Interaction** entre le miARN simple brin (au sein du complexe RISC) et l'ARN cible
  - ⇒ **Dégradation** de l'ARN cible
  - ⇒ Répression de l'expression du gène

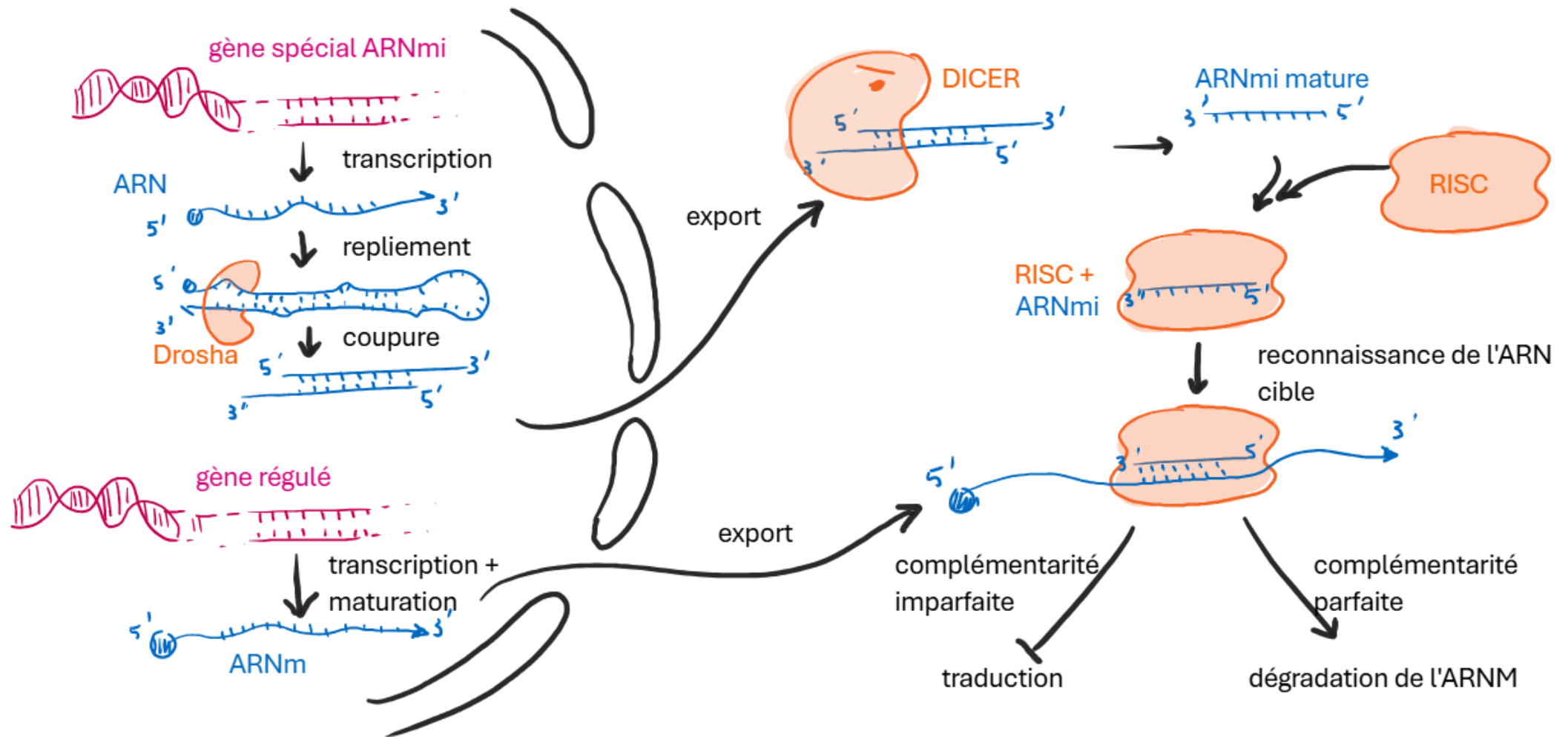
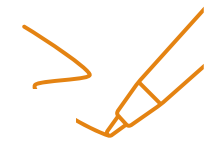
<https://www.youtube.com/watch?v=t5jroSCBBwk>



Complémentarité partielle

Complémentarité parfaite

Production et mode d'action des miRNA



**Schéma du mode de fonctionnement des ARN interférents (ARNmi).**

*Schéma sur le mode de fonctionnement des ARN interférents de type ARNmi*

# PLAN DU COURS

## I. Mise en évidence d'un contrôle de l'expression de l'information génétique

- A. Diversité du transcriptome chez les pluricellulaires
- B. L'expression du génome peut être étudiée grâce à différentes techniques de biologie moléculaire
- C. La variation du transcriptome peut être contrôlée par les facteurs environnementaux
- D. L'expression de gènes est contrôlée par des facteurs internes

## II. Le contrôle épigénétique pré-transcriptionnel agit au niveau de la compaction de la chromatine

- A. Mise en évidence
- B. Les modifications covalentes des histones
- C. Application dans le cas de la vernalisation

## III. Le contrôle épigénétique pré-transcriptionnel agit au niveau de l'ADN

- A. Modification de l'ADN par méthylation
- B. Modification à l'échelle d'un chromosome

## IV. Le contrôle de l'initiation de la transcription par les séquences CIS et facteurs TRANS

- A. Définitions
- B. Séquences enhancers et silencers
- C. Facteurs TRANS: protéines régulatrices

## V. Les petites ARN régulateurs

- A. Mise en évidence fortuite des ARNi
- B. Elucidation du mode d'action des ARNi
- C. Intérêt évolutif des ARNi

## VI. Réflexion autour de l'épigénétique

- A. Définitions
- B. Transmission des modifications épigénétiques

# V. LES PETITS ARN REGULATEURS : UN CONTROLE POST-TRANSCRIPTIONNEL


## C. INTÉRÊT ÉVOLUTIF DES ARNSI?




Donc une protection contre les virus?



Et également une protection face au déplacement des transposons?



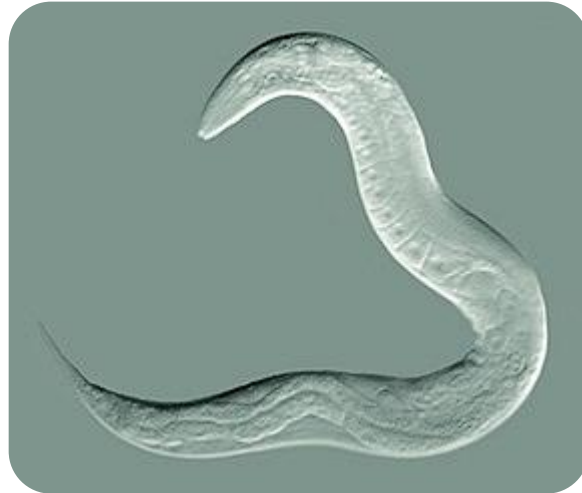
On suppose que l'interférence à ARN a évolué comme une sorte de « système immunitaire » pour protéger les organismes de la présence de matériel étranger ou non souhaité.



**Application** : production *in vitro* de siRNA pour « éteindre » des gènes spécifiques à des fins de recherche ou thérapeutique (thérapie génique)

## LES MICRO-ARN, UN NOUVEAU RÉSEAU DE RÉGULATION GÉNIQUE

Dans les années 90, travaux sur *Caenorhabditis elegans* : existence de gènes (*lin-4*) codant des ARNm complémentaires de régions 3' UTR d'ARNm codant protéine LIN-14. On parle de micro-ARN ou ARNmi.



En 2000, mise en évidence de l'existence de micro-ARN chez l'Homme (*let-7*).



## ARNmi

- Défi soulevé par l'ARNmi: identifier gènes codant ARNmi
- Analyse informatique : un millier d'espèces d'ARNmi dans génome humain; environ 1/3 des ARNm humains possèdent séquences complémentaires avec des ARNmi potentiels
- affinage du niveau d'expression des gènes

Des travaux récents montrent que près de 50% des génomes humain et murin sont transcrits

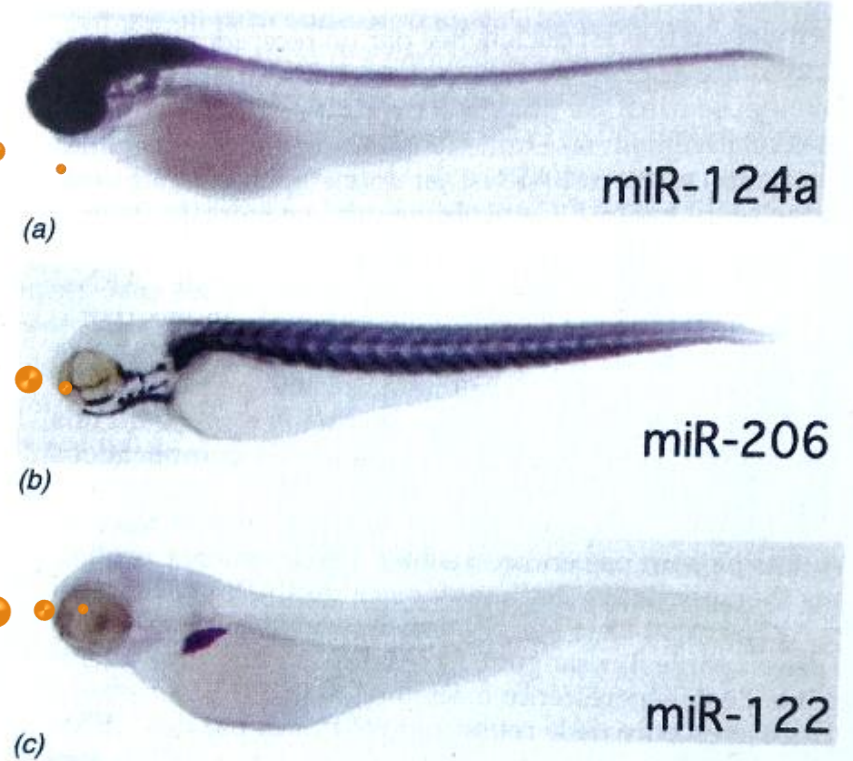


D'autres travaux récents montrent que souvent les cellules transcrivent les deux brins d'un élément ADN et produisent un ARNsens et un ARN antisens.

apoptose

Contrôle de la prolifération

Contrôle de la différenciation



**Figure 11.39** Les micro-ARN sont synthétisés dans des tissus spécifiques au cours du développement embryonnaire. Ces photos d'embryons de poisson-zèbre illustrent l'expression spécifique de trois ARNmi différents dont la localisation est indiquée par la coloration bleue. miR-124a s'exprime spécifiquement dans le système nerveux (a), miR-206 dans le muscle squelettique (b) et miR-122 dans le foie (c). (D'après Erno Wienholds, Wigard Kloosterman et al., *Science* 309:311, 2005, grâce à l'obligeance de Ronald H.A. Plasterk ; © Copyright 2005, American Association for the Advancement of Science.)

# PLAN DU COURS

## **I. Mise en évidence d'un contrôle de l'expression de l'information génétique**

- A. Diversité du transcriptome chez les pluricellulaires
- B. L'expression du génome peut être étudiée grâce à différentes techniques de biologie moléculaire
- C. La variation du transcriptome peut être contrôlée par les facteurs environnementaux
- D. L'expression de gènes est contrôlée par des facteurs internes

## **II. Le contrôle épigénétique pré-transcriptionnel agit au niveau de la compaction de la chromatine**

- A. Mise en évidence
- B. Les modifications covalentes des histones
- C. Application dans le cas de la vernalisation

## **III. Le contrôle épigénétique pré-transcriptionnel agit au niveau de l'ADN**

- A. Modification de l'ADN par méthylation
- B. Modification à l'échelle d'un chromosome

## **IV. Le contrôle de l'initiation de la transcription par les séquences CIS et facteurs TRANS**

- A. Définitions
- B. Séquences enhancers et silencers
- C. Facteurs TRANS: protéines régulatrices

## **V. Les petites ARN régulateurs**

- A. Mise en évidence fortuite des ARNi
- B. Elucidation du mode d'action des ARNi
- C. Intérêt évolutif des ARNi

## **VI. Réflexion autour de l'épigénétique**

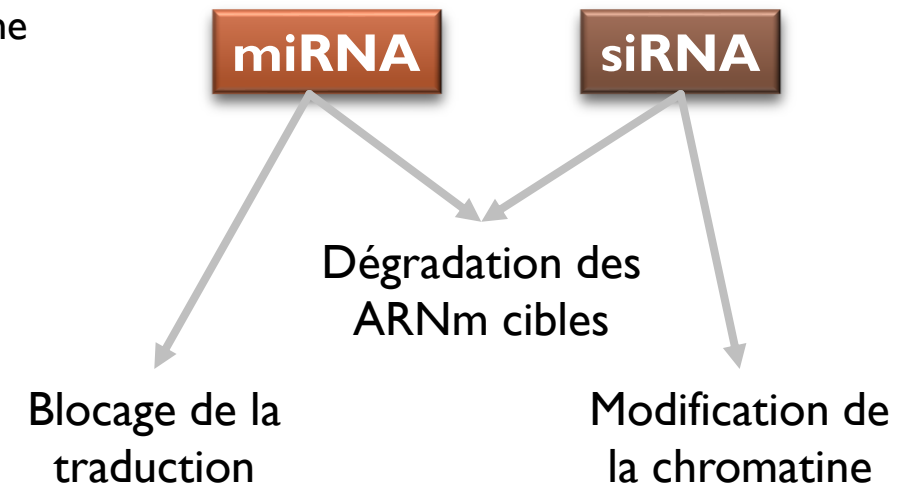
- A. Définitions
- B. Transmission des modifications épigénétiques

# V. LES PETITS ARN REGULATEURS : UN CONTROLE POST-TRANSCRIPTIONNEL

## D. BILAN SUR LES PETITS ARN, LES SMALL INTERFERENTS ARN

- Il existe en réalité deux types de **petits ARN régulateurs** :
  - **ARNsi** (siRNA = small interfering RNA) **exogène** à la cellule → protection face aux virus
  - **ARNmi** (miRNA = micro RNA) **endogène** à la cellule → mécanisme de régulation normal de la cellule (ex : contrôle de l'apoptose, la division cellulaire, la différenciation)
- Caractéristiques communes** aux ARNsi/mi :
  - Structure : courts (< 25 nt) ARN non codants, complémentaires de certains ARNm.
  - Mécanisme : identique (Dicer/RISC)
  - Conséquences/effet :
    - ✓ **Post-transcriptionnel**
      - ⇒ Dégradation de l'ARNm
      - ⇒ Inhibition de la traduction
    - ✓ **Transcriptionnel** (rare) : Modification de la chromatine (méthylation de l'ADN) d'un promoteur bloquant la transcription
- Régulation par les petits ARN **fréquente** chez les **eucaryotes**.

[https://www.youtube.com/watch?v=cK-OGBI\\_ELE](https://www.youtube.com/watch?v=cK-OGBI_ELE)



→ **Notion d'ARN interférent (ARNi) ou interférence par ARN**

# PLAN DU COURS

## I. Mise en évidence d'un contrôle de l'expression de l'information génétique

- A. Diversité du transcriptome chez les pluricellulaires
- B. L'expression du génome peut être étudiée grâce à différentes techniques de biologie moléculaire
- C. La variation du transcriptome peut être contrôlée par les facteurs environnementaux
- D. L'expression de gènes est contrôlée par des facteurs internes

## II. Le contrôle épigénétique pré-transcriptionnel agit au niveau de la compaction de la chromatine

- A. Mise en évidence
- B. Les modifications covalentes des histones
- C. Application dans le cas de la vernalisation

## III. Le contrôle épigénétique pré-transcriptionnel agit au niveau de l'ADN

- A. Modification de l'ADN par méthylation
- B. Modification à l'échelle d'un chromosome

## IV. Le contrôle de l'initiation de la transcription par les séquences CIS et facteurs TRANS

- A. Définitions
- B. Séquences enhancers et silencers
- C. Facteurs TRANS: protéines régulatrices

## V. Les petites ARN régulateurs

- A. Mise en évidence fortuite des ARNi
- B. Elucidation du mode d'action des ARNi
- C. Intérêt évolutif des ARNi

## VI. Réflexion autour de l'épigénétique

- A. Définitions
- B. Transmission des modifications épigénétiques

## VI. RÉFLEXION AUTOUR DE L'ÉPIGÉNÉTIQUE

*« L'épigénétique est la branche de la biologie qui étudie les interactions de cause à effet entre les gènes et leurs produits (les protéines), donnant naissance à un phénotype. »*

Conrad Waddington, 1942, biologiste du développement britannique

*« Les cellules qui ont le même génotype (gènes) peuvent non seulement présenter différents phénotypes, mais ces différences, dans les potentialités exprimées, peuvent perdurer indéfiniment pendant la division cellulaire, essentiellement dans le même environnement. »*

David Nanney, 1958, généticien américain

Découverte de l'ajout d'un groupe acétyl aux histones dans certaines régions du génome qui contiennent plus de gènes transcrits activement.

David Allis, 1995, biologiste du développement américain

La méthylation de l'ADN semble corrélée au « silence transcriptionnel »

Adrian Bird, 1975, généticien britannique

*« L'épigénétique crée, au fond, l'espoir que nous sommes plus que la séquence de nos gènes »* Edith Heard

## VI. RÉFLEXION AUTOUR DE L'ÉPIGÉNÉTIQUE

### A. DÉFINITIONS DE L'ÉPIGÉNÉTIQUE

- L'épigénétique :
  - « épi- » = « au-dessus de »
  - « -génétique » = science
- L'épigénétique étudie les mécanismes par lesquels l'expression des gènes peut être modifiée, **sans modification** de la **séquence** d'ADN et de façon **transmissible** à la descendance.
- L'épigénétique permet de comprendre comment **l'environnement** peut **influencer le phénotype** sans modifier le génotype.
- L'épigénétique est une forme de Lamarckisme moderne et moléculaire ( à nuancer néanmoins...)

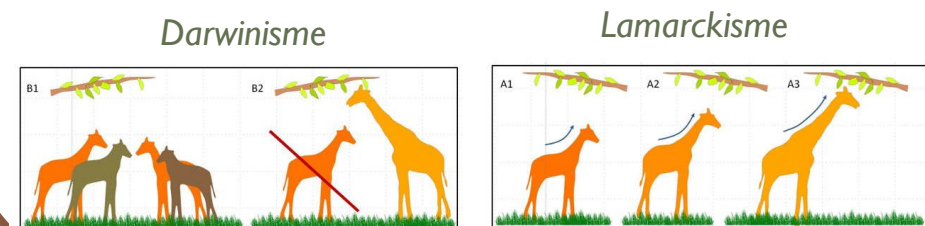
#### Lamarckisme vs. Darwinisme

Au 19<sup>e</sup>, deux grandes théories sur la transmission des caractères s'opposaient.

Le **Darwinisme** considérait que les nouveaux caractères proviennent de la sélection progressive (par sélection naturelle) de caractères préexistants. C'est la théorie de **l'Évolution**.

Le **Lamarckisme** (ou transformisme) considérait que les caractères acquis par une génération sont transmissibles à la descendance.

La théorie de l'Évolution a été largement validée depuis. Cependant, L'épigénétique montre que certains caractères acquis peuvent effectivement être transmis à la descendance.



## VI. RÉFLEXION AUTOUR DE L'ÉPIGÉNÉTIQUE

### A. DÉFINITIONS DE L'ÉPIGÉNÉTIQUE

- Il existe des modifications de l'ADN et de son accessibilité :
  - N'ayant pas de lien direct avec sa séquence
  - Jouant le rôle de marqueur moléculaire
  - Changeant au fur et à mesure de la différenciation cellulaire
  - Etant influencé par l'environnement
  - Pouvant se transmettre de génération en génération (à l'échelle cellulaire voire de l'individu)
    - ⇒ Ces éléments correspondent à des marqueurs épigénétiques.

# PLAN DU COURS

## I. Mise en évidence d'un contrôle de l'expression de l'information génétique

- A. Diversité du transcriptome chez les pluricellulaires
- B. L'expression du génome peut être étudiée grâce à différentes techniques de biologie moléculaire
- C. La variation du transcriptome peut être contrôlée par les facteurs environnementaux
- D. L'expression de gènes est contrôlée par des facteurs internes

## II. Le contrôle épigénétique pré-transcriptionnel agit au niveau de la compaction de la chromatine

- A. Mise en évidence
- B. Les modifications covalentes des histones
- C. Application dans le cas de la vernalisation

## III. Le contrôle épigénétique pré-transcriptionnel agit au niveau de l'ADN

- A. Modification de l'ADN par méthylation
- B. Modification à l'échelle d'un chromosome

## IV. Le contrôle de l'initiation de la transcription par les séquences CIS et facteurs TRANS

- A. Définitions
- B. Séquences enhancers et silencers
- C. Facteurs TRANS: protéines régulatrices

## V. Les petites ARN régulateurs

- A. Mise en évidence fortuite des ARNi
- B. Elucidation du mode d'action des ARNi
- C. Intérêt évolutif des ARNi

## VI. Réflexion autour de l'épigénétique

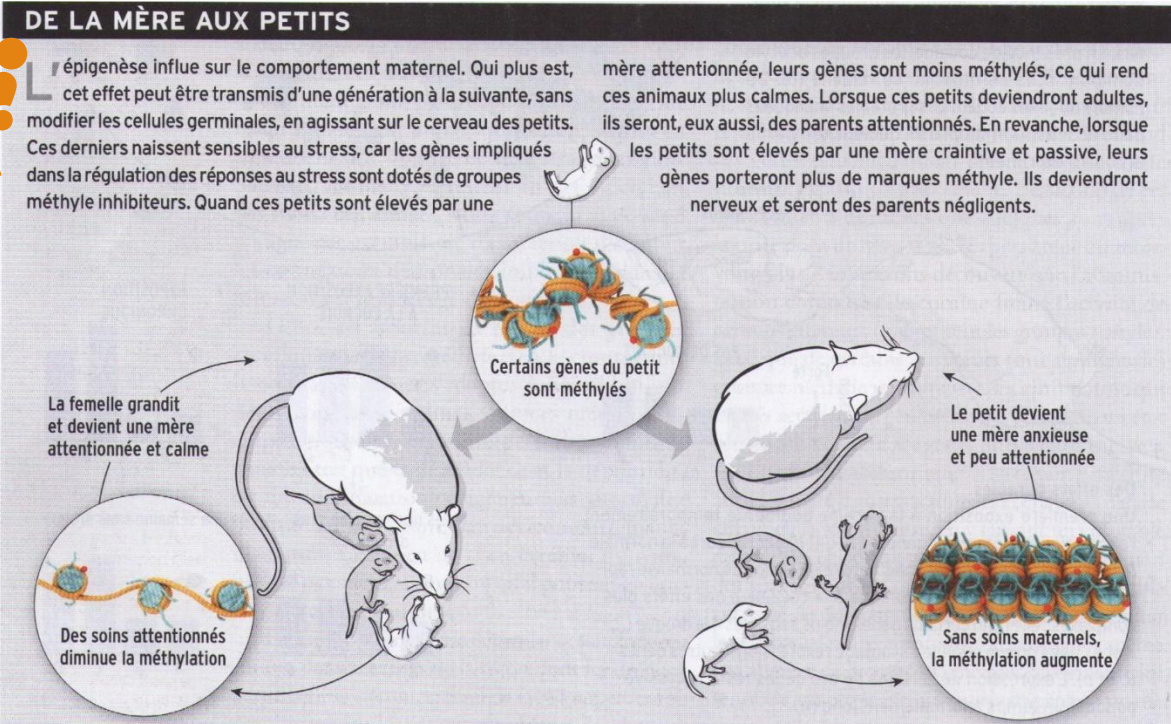
- A. Définitions
- B. Transmission des modifications épigénétiques

## VI. RÉFLEXION AUTOUR DE L'ÉPIGÉNÉTIQUE

### B. TRANSMISSION DES MODIFICATIONS ÉPIGÉNÉTIQUES

- Dogme de la génétique : seuls les caractères codés génétiquement sont transmis de génération en génération (cf. maladies génétique).
- Cependant, il existe une **transmission des modifications épigénétiques**.
  - Transmission à une lignée cellulaire  
Ex : inactivation de X, chat calico
  - Transmission à la descendance = empreinte parentale  
Ex : transmission du profil de méthylation de l'ADN
- Or les modifications épigénétiques sont influencées par l'environnement.  
→ **transmission de « caractères acquis »**

Don't blame the mother!



Exemple d'empreinte parentale chez la souris

Chez les Mammifères, tous les gènes sont en double (paires de chromosomes homologues) :

- Un des allèles est réprimé par méthylation
- L'autre allèle est exprimé

→ Transmission de l'état de méthylation à la génération suivante.

→ Transmission de l'allèle exprimé (soit celui du père, soit celui de la mère est inactivé)

pour la science / DOSSIER SCIENCE POUR LA SCIENCE

- Le bestiaire des ARN
- La mémoire des cellules
- La matière noire du génome
- Le cerveau modelé par l'expérience

vers une médecine personnalisée

Le magazine thématique de l'actualité scientifique N° 81 Octobre-Décembre 2013

# L'hérédité sans gènes

## Comment l'environnement rebat les cartes

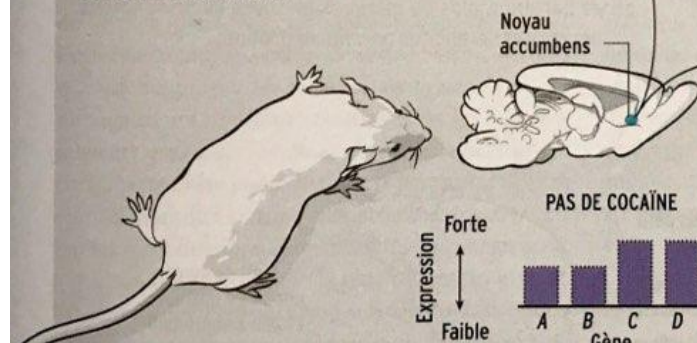
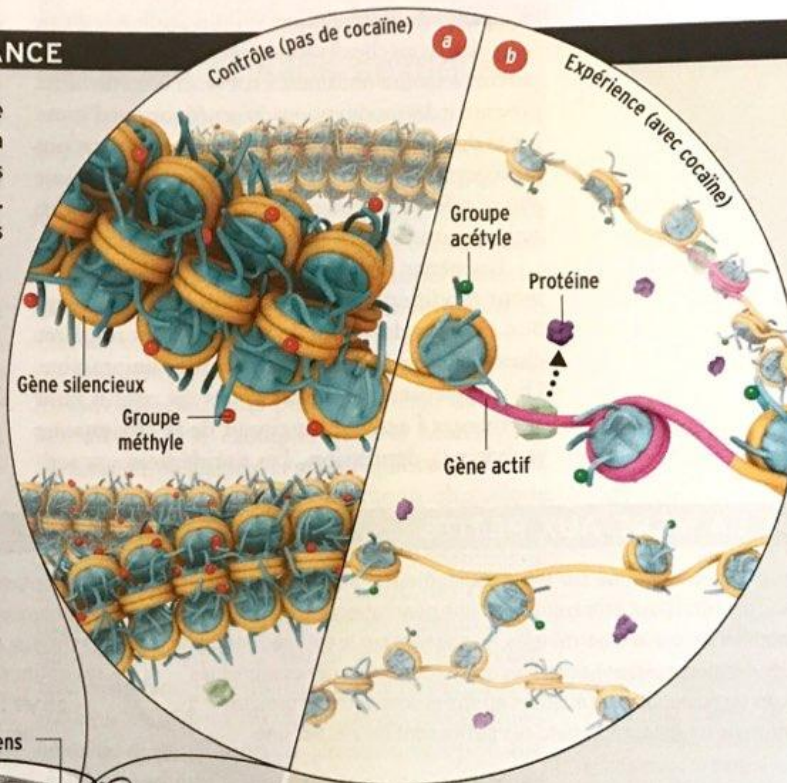
DOSSIER HORS-SÈNE  
M 01930 - F 6,95 € - RD

### L'ÉPIGÉNÉTIQUE DE LA DÉPENDANCE

Des études chez la souris ont montré qu'une exposition chronique à la cocaïne modifie la répartition des marques épigénétiques sur les gènes situés dans le circuit cérébral de la récompense. Les animaux deviennent plus sensibles aux effets de la drogue et plus enclins à la dépendance.

#### Les modifications.

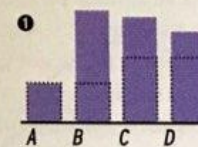
Une dose unique de cocaïne peut modifier le « paysage » épigénétique des gènes dans le noyau accumbens, un acteur du circuit de la récompense. En l'absence de drogue (a), les groupes méthyle dominant, maintenant la chromatine compactée : les gènes ne s'expriment pas. En présence de cocaïne, les groupes acétyle dominant et la chromatine se relâche (b). De nombreux gènes codant des protéines impliquées dans la sensation de plaisir déclenchée par la drogue s'expriment.



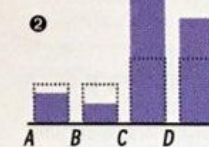
#### Des effets durables.

Une première exposition à la cocaïne augmente temporairement l'expression de nombreux gènes (1, b, c et d) par rapport à la normale (ci-dessus et en pointillés), mais cette expression se normalise rapidement (3). L'exposition chronique à la cocaïne a des effets plus complexes : elle rend certains gènes moins sensibles à la drogue (2, A et B), alors qu'elle stimule davantage l'expression d'autres gènes (C et D). L'expression de certains de ces gènes reste excessive pendant un temps anormalement long (4).

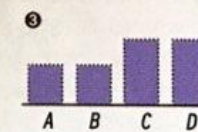
PREMIÈRE EXPOSITION À LA COCAÏNE



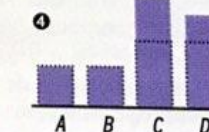
EXPOSITION CHRONIQUE

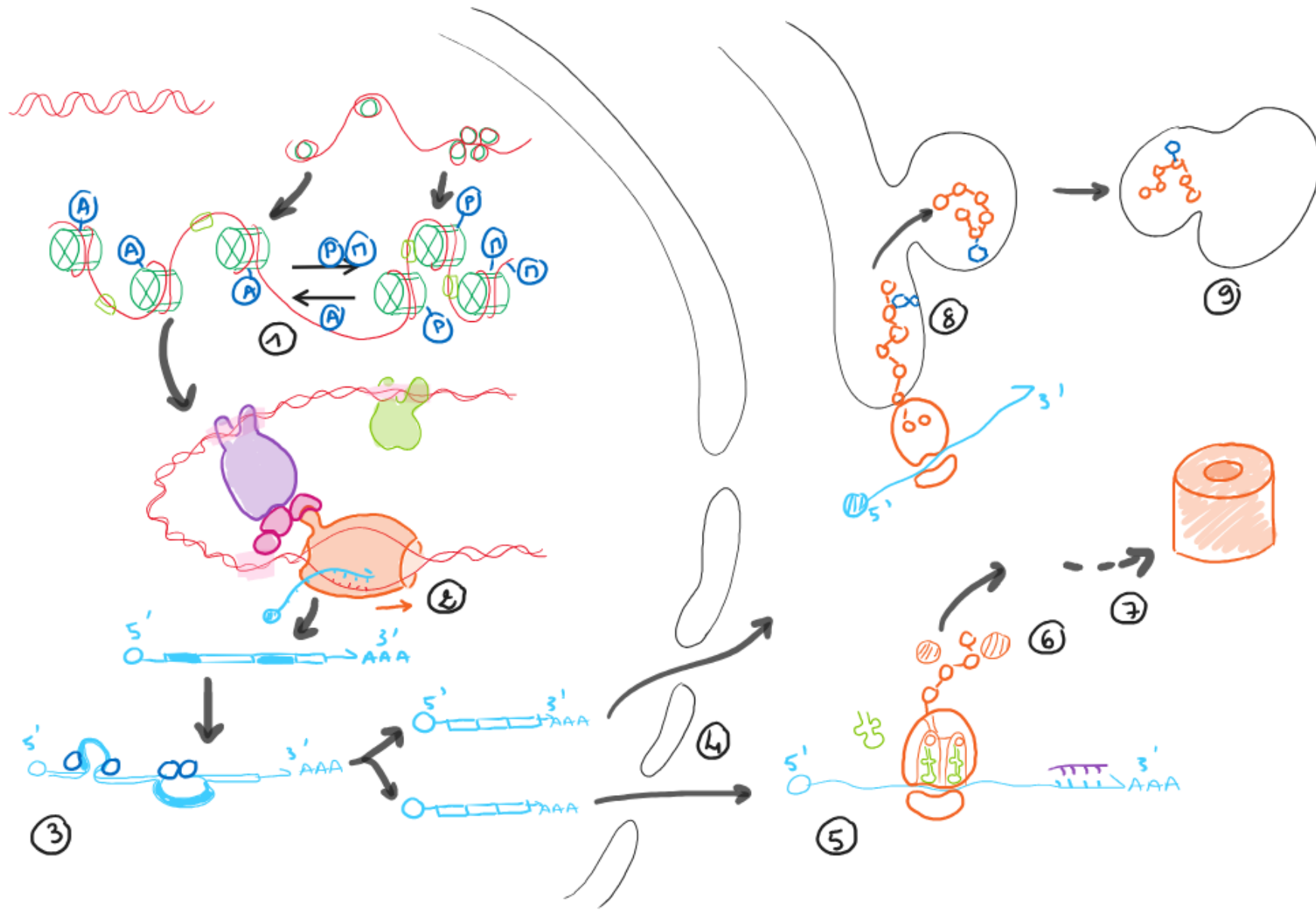


Après une semaine sans drogue.



Après une semaine sans cocaïne.

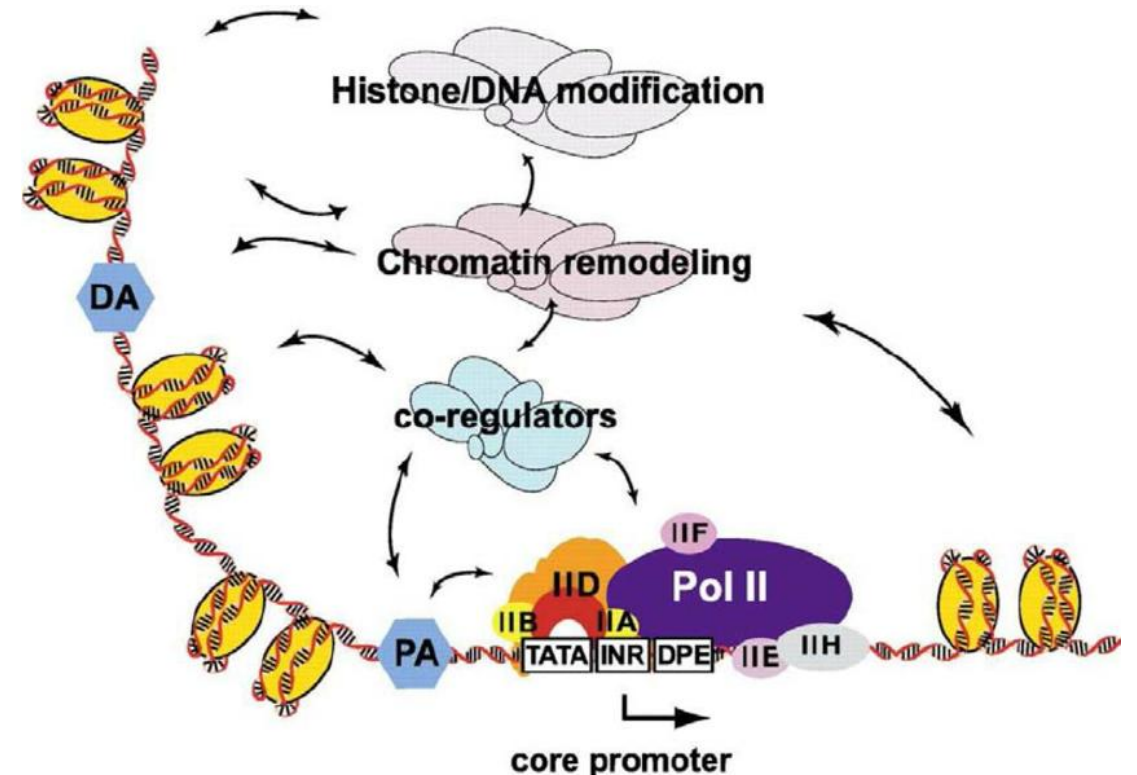






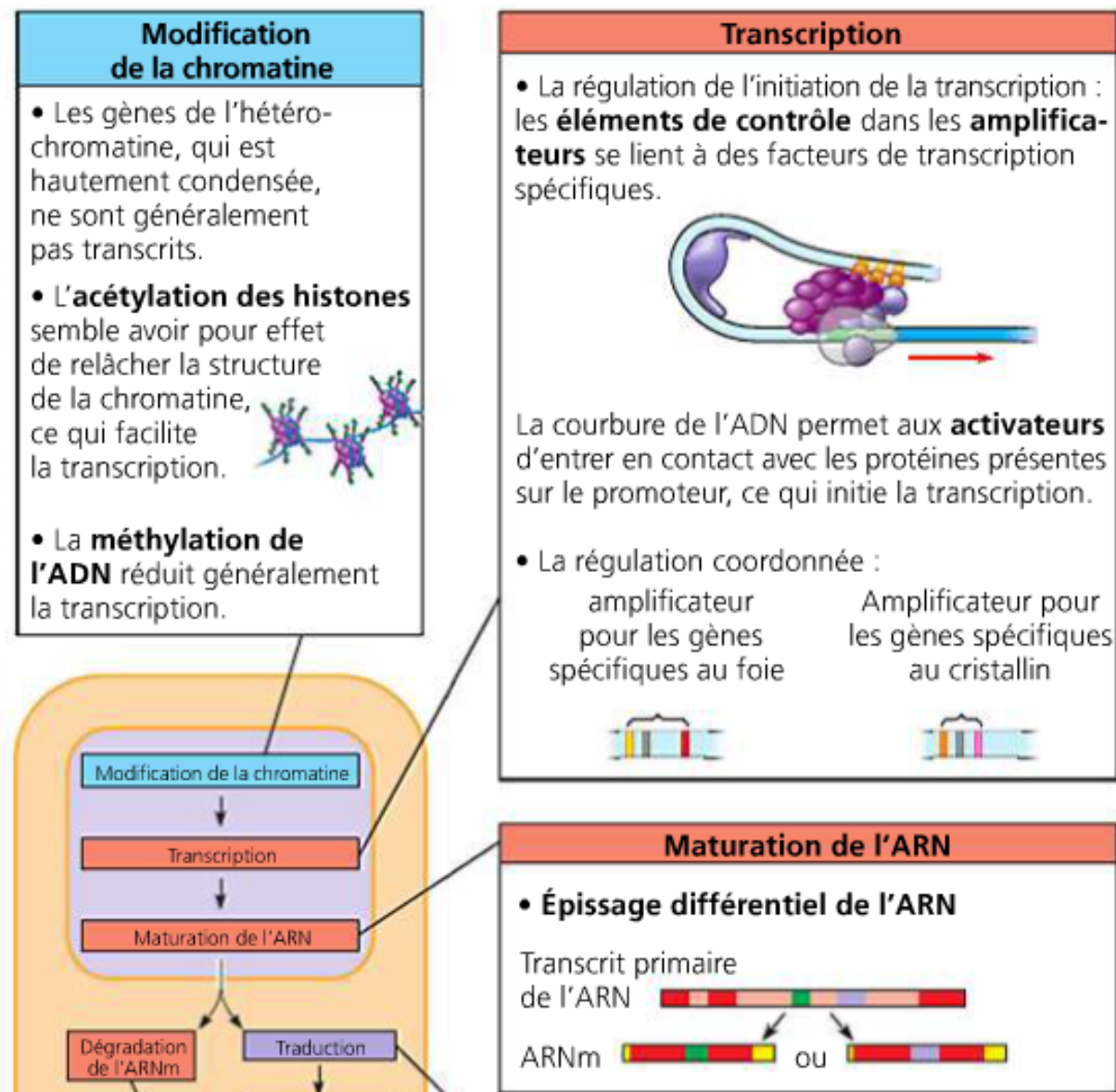
## BILAN

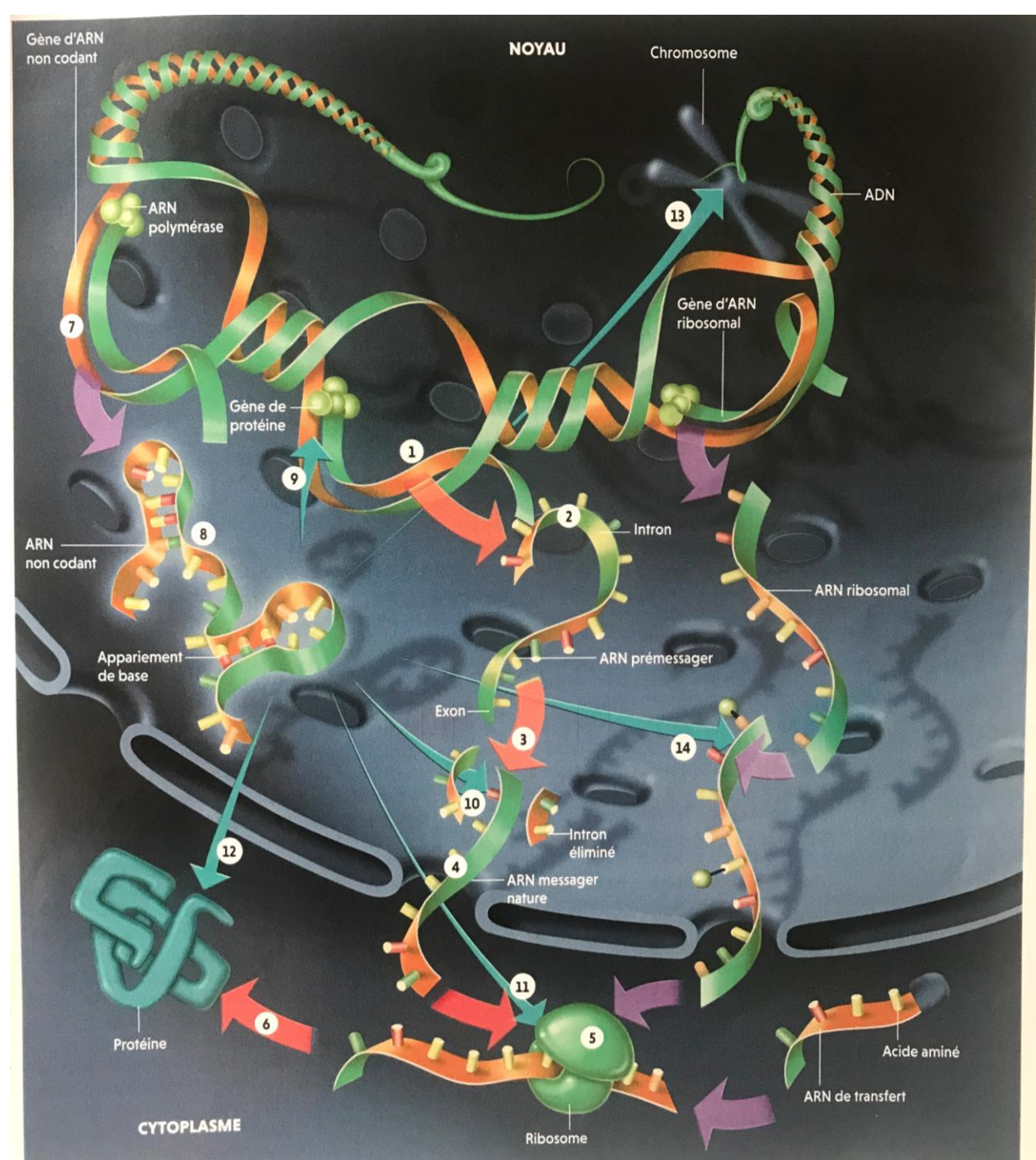
- Chez les Eucaryotes, la régulation de la transcription peut intervenir à différents niveaux :
  - Interaction entre **séquences régulatrices (cis)** et **facteurs protéiques (trans)**, activant ou inhibant l'initiation de la transcription.
  - Dégradation des ARNm produits grâce aux **micro ARN (miRNA)**.
  - Modifications **épigénétiques** par modifications covalentes de l'ADN ou du code histone.
- Ces mécanismes sont étudiés et utilisés en médecine à des fins thérapeutiques (ex : traitement des cancers).



## BILAN

- La diversité de ces modes de régulation et l'épissage alternatif conduit à une très grande **diversité des transcriptomes** au sein d'un organisme pluricellulaire.
- Diversité des transcriptomes essentielle au :
  - Développement embryonnaire
  - Différenciation cellulaire
  - Fonctionnement intégré dans l'organisme
- Par des phénomènes **épigénétiques** notamment : modification permanente de l'activité cellulaire en fonction des conditions du milieu





### QUAND UN GÈNE S'EXPRIME

P

Plusieurs types de gènes coexistent dans le génome. Selon le schéma classique (les flèches rouges), un gène codant une protéine est transcrit, c'est-à-dire copié (1), par l'ARN polymérase en un ARN pré-messager (2) constitué de séquences codantes, les exons, et non codantes, les introns. Ces derniers sont éliminés lors de l'épissage (3), tandis que les exons sont réunis en un ARN messager nature (4). Selon les exons sélectionnés, les protéines codées sont

distinctes. Dans le cytoplasme, l'ARN messager mature est traduit par les ribosomes (5) en une protéine (6). Cette étape requiert deux types d'ARN (les ARN ribosomaux et les ARN de transfert produits par des gènes non codants). D'autres ARN (7) non codants ont un rôle essentiel. Grâce à des appariements internes, ces ARN (8) adoptent une configuration leur conférant leurs propriétés. Par exemple, ils influent sur la transcription des gènes codant des protéines (9), sur l'épissage des ARN pré-messagers (10), sur la traduction en protéines (11) et sur la stabilité des protéines (12). Par ailleurs, ils modifient la structure de la chromatine (13) et de certains ARN (14).



## SUJETS D'ORAUX

- Le contrôle de l'expression de l'information génétique
- Le contrôle de l'expression des gènes chez les Eucaryotes (2023)
- Les facteurs modifiant l'expression des gènes (2023)