

# L'organisation du noyau au cours de la différenciation cellulaire dans le tissu mammaire

Clémence Kress et Ève Devinoy

INRA, UR1196 Génomique et Physiologie de la Lactation, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas, France

Auteur correspondant : Ève Devinoy, [eve.devinoy@jouy.inra.fr](mailto:eve.devinoy@jouy.inra.fr)

Reçu le 29 avril 2010

**Résumé** – Dans de nombreux tissus, les noyaux des cellules présentent des caractéristiques spécifiques, notamment en ce qui concerne la nature et la répartition des compartiments nucléaires, la position des chromosomes et des gènes. Cette organisation spatiale du noyau laisse apparaître des domaines plus ou moins permissifs pour l'expression des gènes et constituerait un mécanisme épigénétique participant au maintien des profils d'expression tissu-spécifiques. La glande mammaire est un tissu complexe dans lequel les cellules épithéliales mammaires (CEMs), qui synthétisent et secrètent les composants du lait, interagissent avec différents autres types de cellules (myoépithéliales, adipocytes) et la matrice extracellulaire. Des cultures de CEMs reproduisent partiellement la différenciation cellulaire *in vitro*. Elles ont été utilisées pour suivre la mise en place et l'importance fonctionnelle de l'organisation du noyau. Elles ont permis de montrer comment les stimulations hormonales aboutissent au remodelage des domaines nucléaires et au repositionnement de gènes spécifiques de la glande mammaire, comme par exemple, ceux des protéines du lait. Moduler les conditions de croissance des cultures afin de replacer les cellules dans un micro-environnement dont les caractéristiques sont proches de celles du tissu mammaire, devrait ensuite permettre d'étudier le rôle de cet environnement cellulaire dans l'organisation nucléaire.

**Mots clés** : Glande mammaire / différenciation / organisation nucléaire / caséines / WAP

**Abstract** – Organization of the nucleus during cell differentiation in the mammary tissue.

In many tissues, the features of cell nuclei are specific to their differentiated state, notably in terms of the nature and distribution of nuclear compartments and the position of chromosomes and genes. This spatial organization of the nucleus reveals domains that are differentially permissive for gene expression and may constitute an epigenetic mechanism that is involved in maintaining tissue-specific expression profiles. The mammary gland is a complex tissue in which mammary epithelial cells (MECs), which synthesize and secrete milk components, interact with other cell types (myoepithelial cells, adipocytes) and the extracellular matrix. MECs cultures can to some extent recreate cell differentiation *in vitro* and have been used to follow the development and functional importance of nuclear organization. They have made it possible to show how hormonal stimulation can lead to a remodeling of nuclear domains and the repositioning of genes specific to the mammary gland, such as milk protein genes. By modulating the growth conditions of culture in order to replace cells in a microenvironment similar to that of mammary gland tissue, it should be possible to study the role of this cellular microenvironment in nuclear organization.

**Key words**: Mammary gland / differentiation / nuclear organization / caseins / WAP

## Introduction

Le noyau des cellules eucaryotes contient l'ADN du génome, support de l'information génétique, mais aussi tous les composants nécessaires au fonctionnement de celui-ci, notamment au maintien de son intégrité, à son expression et à sa transmission lors de la division cellulaire. L'observation par microscopie a depuis longtemps montré que le noyau n'était pas une structure homogène en termes d'organisation interne. Comme le cytoplasme, il apparaît subdivisé en domaines que l'on nomme « compartiments » bien qu'ils ne correspondent pas à des espaces délimités par des membranes, mais plutôt à des zones où se concentrent certains facteurs (ADNs, ARNs, protéines). La description de cette organisation a mis en évidence qu'elle était liée aux grandes fonctions assurées par le noyau ; les mécanismes moléculaires de sa mise en place et de son rôle sont maintenant étudiés aussi bien chez les eucaryotes supérieurs que chez la levure.

Les expériences destinées à comprendre les mécanismes moléculaires qui sous-tendent l'organisation du noyau sont essentiellement réalisées dans des systèmes relativement simples à manipuler, comme des cellules en lignées immortalisées ou des cellules isolées des lignées hématopoïétiques ou lymphocytaires. Cependant, ces modèles ne permettent pas de reproduire des processus physiologiques complexes comme la différenciation de types cellulaires particuliers dans le contexte physiologique de leur tissu d'origine. Dans le cas de la glande mammaire, on dispose d'une gamme de types de culture qui imitent à différents degrés l'organisation tissulaire. Ces cultures sont réalisables à partir de cellules primaires fraîchement isolées de l'animal, comme à partir de cellules de lignées immortalisées. La glande mammaire est donc un modèle dans lequel il est particulièrement intéressant de regarder comment évolue l'organisation du noyau lors de différents processus naturels et pathologiques.

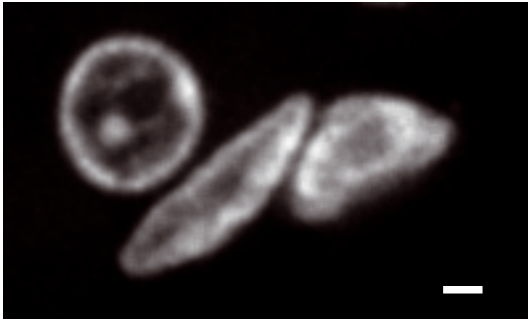
## Le modèle de la glande mammaire

La glande mammaire est constituée d'un épithélium responsable de la production du lait. Il est structuré en un ensemble d'acini et de canaux noyé dans un stroma composé, notamment, de matrice extracellulaire, de tissu conjonctif, d'adipocytes et de vaisseaux sanguins. Les CEMs se différencient à partir de cellules souches / progénitrices en deux types majeurs : les cellules épithéliales sécrétrices, situées du côté de la lumière de l'acinus et les cellules myoépithéliales, du côté basal (Chepko & Smith, 1999). Le tissu se développe grâce à la prolifération et la différenciation des cellules, notamment en réponse

à des signaux hormonaux qui contrôlent la mise en place de profils d'expression de gènes spécifiques de chaque type cellulaire. Grâce à des techniques de culture de cellules mammaires sous forme d'acini, il a été montré que les interactions entre cellules, ainsi qu'entre cellules et matrice extracellulaire, étaient également importantes pour le bon déroulement de la différenciation (Bissell *et al.*, 1999 ; Lelièvre, 2009). Lorsque la polarité cellulaire et la structure tridimensionnelle du tissu sont altérées, la croissance des cellules et leur réponse aux stimulations externes peuvent se trouver modifiées et participer ainsi à la cancérogenèse. Par ailleurs, la glande mammaire est un organe qui se développe suivant des cycles successifs gestation-lactation-involution, similaires mais non strictement identiques. Ceci permet d'observer si des événements physiologiques lors des premiers cycles ont des répercussions sur le déroulement des suivants, peut-être par l'intermédiaire de processus épigénétiques de « mémorisation » d'une régulation.

## Évolution de l'organisation de la chromatine dans le noyau lors de la différenciation des cellules épithéliales mammaires

Une réorganisation du noyau particulièrement marquée peut être associée à la différenciation cellulaire. Dans de nombreux cas, on observe un changement dans la répartition nucléaire de l'hétérochromatine, qui correspond à des régions du génome plus condensées et inactives (Grigoryev *et al.*, 2006). L'hétérochromatine peut être visualisée au microscope électronique à transmission, par marquage de l'ADN, ou par détection de modifications d'histones spécifiques des gènes réprimés (immunodétection). Dans la glande mammaire, l'observation de coupes de tissu à différents stades de développement montre que les noyaux des cellules épithéliales changent d'apparence. Chez la lapine par exemple, au stade précoce de la gestation, les noyaux présentent des formes très irrégulières et invaginées, avec une répartition de l'hétérochromatine périphérique, mais également diffuse dans le nucléoplasme. Au stade de lactation, durant lequel les CEMs apparaissent très différenciées, les noyaux sont plus ronds. L'hétérochromatine se situe majoritairement dans une large zone périphérique, en gros agrégats, dont certains peuvent aussi être au centre, en contact avec les nucléoles. Globalement, au cours de la différenciation, les compartiments nucléaires deviennent moins nombreux, plus étendus, ce qui est confirmé chez la souris notamment par l'analyse de la répartition nucléaire de modifications d'histones spécifiques de l'hétérochromatine (Kress *et al.*, 2010). Des changements quantitatifs ont



**Fig. 1.** Noyaux de cellules mammaires de lapine au stade lactation. Une cellule épithéliale sécrétrice et deux cellules myoépithéliales sont visibles. Coloration de l'ADN au DAPI, image de microscopie confocale (barre d'échelle 2  $\mu\text{m}$ ; microscope confocal de la plateforme MIMA2, INRA, Jouy en Josas)

également été décrits dans d'autres modèles biologiques : la quantité globale d'hétérochromatine tend à augmenter au cours de la différenciation (Grigoryev *et al.*, 2006). L'interprétation moléculaire est que, pour aboutir à la différenciation terminale, des gènes spécifiques du type cellulaire sont activés. Toutefois, de nombreux gènes actifs dans les phases initiales (par exemple les gènes nécessaires pour la division cellulaire) deviennent réprimés de manière permanente par condensation de leur chromatine, d'où une augmentation de la proportion d'hétérochromatine détectable dans le noyau. Des mesures plus précises sont nécessaires pour établir si c'est également le cas pour les cellules mammaires. Le travail sur un tissu complet permettra également de comparer l'aspect fonctionnel de l'organisation nucléaire des différents types cellulaires le composant (figure 1) et de comprendre comment la différenciation dans différentes voies conduit à une variété de types d'organisation nucléaire.

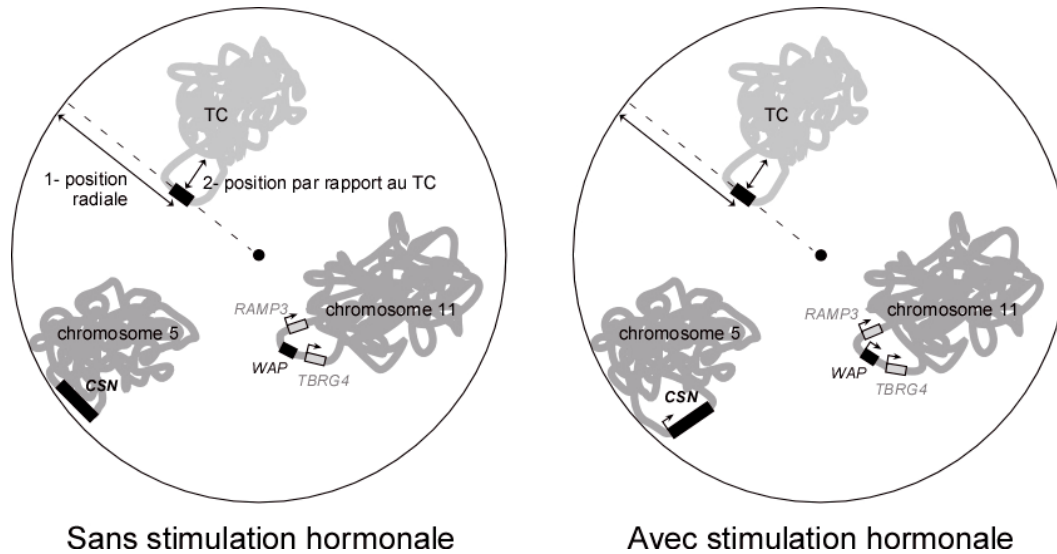
### La répartition des chromosomes et des gènes dans le noyau

L'organisation globale du noyau est radiale : l'hétérochromatine constitutive, contenant des régions du génome condensées, transcriptionnellement inactives et se répliquant tardivement, se trouve préférentiellement à la périphérie, en contact avec l'enveloppe nucléaire ou les nucléoles, alors que l'euchromatine, plus riche en gènes, plus active et répliquée plus précocement, a une position plus centrale (Sadoni *et al.*, 1999). De plus, chaque chromosome occupe en interphase un volume relativement restreint ou « territoire chromosomique » (TC), dont l'emplacement dans le noyau dépend de la nature du chromosome et du type cellulaire (Mayer *et al.*, 2005; Cremer *et al.*,

2006). Les positions des gènes eux-mêmes dans le noyau ne sont pas aléatoires, mais en relation avec leur état d'activité. En effet, il a été montré que certains gènes réprimés se trouvaient dans des zones plus inactives du noyau comme la périphérie ou les zones riches en hétérochromatine péri-centromérique (Brown *et al.*, 1997; Kosak *et al.*, 2002). Le changement d'état d'activité d'un gène peut être accompagné par sa relocalisation dans une zone différente du noyau. Ceci a été décrit notamment pour l'activation de gènes qui s'éloignent alors de l'hétérochromatine et se rapprochent de compartiments enrichis en facteurs permissifs pour l'expression (Francastel *et al.*, 2001; Osborne *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2008). Au sein du territoire chromosomique, les différentes régions du chromosome se positionnent selon leur richesse en gènes et leur activité (Goetze *et al.*, 2007; Heard & Bickmore, 2007). Les régions les plus actives se trouvent à la périphérie, parfois en boucles de chromatine qui s'étendent hors du TC (« *looping out* »), en contact avec le compartiment interchromatinien qui concentre différents facteurs nécessaires à l'expression génique comme les facteurs de transcription et de maturation des ARNs. Les changements de position des gènes entre régions répressives et régions permissives du noyau sont-ils nécessaires pour la régulation des gènes? Des expériences de ciblage de transgènes ou de chromosomes vers la périphérie nucléaire dans des cellules en culture tendent à faire penser que la position dans le noyau n'est en général pas un facteur prédominant pour le contrôle de l'expression, mais qu'elle pourrait jouer un rôle modulateur pour certains gènes (Mateos-Langerak *et al.*, 2007). Cependant, ces expériences ont été réalisées dans des systèmes modèles relativement artificiels. Il faut maintenant décrire et analyser ce qui se passe dans les cellules *in vivo*, notamment dans les tissus où d'autres éléments de régulation par le micro-environnement cellulaire pourraient entrer en ligne de compte. L'étude *in vivo* est par ailleurs indispensable pour compléter les modèles d'organisation globale du noyau établis d'après les cultures cellulaires. En effet, les règles considérées comme universelles chez les eucaryotes supérieurs peuvent être remises en question par la découverte de cas particuliers intéressants, comme l'organisation radiale chromatinienne « inversée » de certains noyaux dans la rétine des animaux nocturnes (Solovei *et al.*, 2009).

### Position des gènes des protéines du lait dans le noyau des cellules épithéliales mammaires

La localisation de gènes spécifiques dans le noyau peut être effectuée par FISH (hybridation *in situ* de sondes



**Fig. 2.** Changement de position des gènes des protéines du lait dans le noyau des cellules HC11 en réponse à la stimulation par les hormones lactogènes. La position d'un gène peut être caractérisée par : 1- sa position radiale, correspondant à une distance au centre / à la périphérie nucléaire, et 2- sa position par rapport au territoire chromosomique (TC). Le schéma illustre les positions préférentielles du gène *WAP* (situé entre deux gènes toujours exprimés) et du locus des gènes des caséines (*CSN*), qui changent de manière plus ou moins marquante avec l'activation hormonale.

fluorescentes). Cette technique étant délicate à mettre en œuvre sur un échantillon de tissu, les expériences sont souvent réalisées sur des noyaux provenant de cellules en culture. Il existe plusieurs lignées de cellules mammaires humaines ou murines qui ont gardé la plupart des caractéristiques de cellules épithéliales mammaires, comme par exemple l'expression de certains marqueurs de différenciation ou la sensibilité aux hormones. La lignée murine HC11 est ainsi capable d'exprimer des gènes des protéines du lait comme la *WAP* (*Whey Acidic Protein*) et certains gènes du *cluster* des caséines (*CSN*) en réponse à un traitement aux hormones lactogènes. Elle a été utilisée pour caractériser la position des régions du génome où se trouvent ces gènes des protéines du lait dans le noyau et pour examiner si cette position était en relation avec leur état d'activité (Ballester *et al.*, 2008). La FISH sur des cellules HC11 en conditions préservant la structure tridimensionnelle des noyaux, complétée par une analyse statistique, a montré que les deux loci, comme de nombreux autres déjà analysés dans d'autres modèles, adoptent des positions préférentielles (figure 2). Dans le noyau, le gène *WAP* se trouve plus souvent au centre alors que le *cluster CSN* est localisé en périphérie. Avec la stimulation hormonale qui conduit à l'activation des gènes, les positions radiales changent. En particulier, les gènes des caséines tendent à se dissocier de la périphérie nucléaire, qui est considérée comme une zone répressive du noyau, en dehors des zones contenant les pores nucléaires. Pour mieux comprendre ce mouvement, les positions des gènes des

protéines du lait par rapport à d'autres éléments du noyau ont aussi été analysées. Ils ne sont pas associés avec l'hétérochromatine péri-centromérique, même lorsqu'ils sont réprimés. Leurs positions dans les territoires des chromosomes qui les portent sont différentes. Le gène *WAP* se trouve fréquemment dans une boucle en dehors du TC, quelle que soit son activité. Ceci est probablement dû au fait que ce gène se trouve entre deux gènes exprimés de manière ubiquitaire, ce qui positionnerait l'ensemble des trois gènes dans les zones les plus actives du TC. La position dans le noyau ne semble donc pas déterminer pour la régulation du gène *WAP*, qui dépendrait plus de variations locales de l'organisation des boucles de chromatine. Des expériences complémentaires ont en effet montré que la méthylation et l'attachement à la matrice nucléaire de différents éléments de ce gène présentaient des profils particuliers dans la glande mammaire. En revanche, pour le locus des gènes des caséines, on observe une réponse à la stimulation hormonale en termes de position dans le noyau. La région, initialement plutôt à l'intérieur du TC, se trouve relocalisée vers l'extérieur. Un tel comportement de « *looping-out* » du TC a déjà été décrit pour plusieurs *clusters* de gènes, notamment le locus de la  $\beta$ -globine (Ragoczy *et al.*, 2003), le complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) (Volpi *et al.*, 2000), les loci *Hoxb* et *Hoxd* (Morey *et al.*, 2007). Il s'agit souvent de grandes régions où les gènes sont régulés de manière concertée au cours de la différenciation cellulaire ou du développement. Les expériences préliminaires de



FISH sur des coupes de tissu mammaire en lactation, au stade où les gènes des protéines du lait sont exprimés, confirment que la position du *cluster* des caséines varie avec son activation. Cependant, elles suggèrent également que, pour certains caractères, la lignée HC11 n'a pas une organisation nucléaire représentative de celle des CEMs *in vivo*.

## Perspectives : le noyau dans le tissu

Le rôle du micro-environnement dans le contrôle de la différenciation des cellules épithéliales mammaires est examiné dans le contexte des études sur la cancérogenèse. Des modèles à base de cellules humaines cultivées dans des conditions respectant certaines caractéristiques de l'architecture du tissu ont permis de montrer que l'organisation du noyau était sensible à des stimulations externes comme les interactions entre cellules ou entre cellules et matrice extracellulaire (Lelièvre, 2009). La nature des stimuli, mécaniques (tensions au niveau des membranes) ou chimiques (molécules d'adhésion), et les voies de transduction impliquées pourront être disséquées dans ces systèmes simplifiés. Ces voies de transduction pourraient moduler l'organisation nucléaire, et contribuer ainsi au programme de prolifération, de différenciation terminale, puis au maintien de l'identité cellulaire, mais ceci reste encore à déterminer.

Vraisemblablement, la compartimentalisation du noyau pourrait participer à stabiliser l'état d'activité des gènes en favorisant leur localisation dans des régions à rôle activateur ou répresseur. Les expériences réalisées pour l'instant dans des cellules mammaires cultivées suggèrent que la relation position nucléaire radiale/expression n'est pas très forte. En effet, nous avons montré que dans les cellules HC11, le locus des caséines s'éloignait seulement légèrement de la périphérie nucléaire lors de l'activation par les hormones. Par ailleurs, d'autres expériences ont mis en évidence des changements de positionnement des gènes lors de la différenciation tumorale par rapport à la différenciation normale, sans corrélation nette avec leur changement d'expression (Meaburn & Misteli, 2008; Meaburn *et al.*, 2009). Cependant, il est possible que les résultats soient différents si l'on observe des cellules qui effectuent une différenciation *in vivo* jusqu'au stade de production du lait, où le noyau a acquis une organisation fonctionnelle, différente de celle de cellules tumorales. Des progrès techniques devraient permettre prochainement de cibler les gènes ou portions de chromosomes vers une variété croissante de compartiments du noyau dont on souhaite tester l'influence sur l'expression des gènes. La question de l'importance du « facteur localisation nucléaire » dans la régulation des gènes devra alors être posée pour une

CEM insérée dans le tissu mammaire et soumise aux diverses conditions physiologiques auxquelles sont exposés les organismes.

## Références

- Ballester M., Kress C., Hue-Beauvais C., Kiêu K., Lehmann G., Adenot P., Devinoy E., The nuclear localization of WAP and CSN genes is modified by lactogenic hormones in HC11 cells. *J Cell Biochem*, 2008, 105, 262–270.
- Bissell M.J., Weaver V.M., Lelièvre S.A., Wang F., Petersen O.W., Schmeichel K.L., Tissue structure, nuclear organization, and gene expression in normal and malignant breast. *Cancer Res*, 1999, 59, 1757–1764.
- Brown K.E., Guest S.S., Smale S.T., Hahn K., Merkschlager M., Fisher A.G., Association of transcriptionally silent genes with Ikaros complexes at centromeric heterochromatin. *Cell*, 1997, 91, 845–854.
- Brown J.M., Green J., das Neves R.P., Wallace H.A., Smith A.J., Hughes J., Gray N., Taylor S., Wood W.G., Higgs D.R., Iborra F.J., Buckle V.J., Association between active genes occurs at nuclear speckles and is modulated by chromatin environment. *J Cell Biol*, 2008, 182, 1083–1097.
- Chepko G., Smith G.H., Mammary epithelial stem cells : our current understanding. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 1999, 4, 35–52.
- Cremer T., Cremer M., Dietzel S., Muller S., Solovei I., Fakan S., Chromosome territories – a functional nuclear landscape. *Curr Opin Cell Biol*, 2006, 18, 307–316.
- Francastel C., Magis W., Groudine M., Nuclear relocation of a transactivator subunit precedes target gene activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98, 12120–12125.
- Goetze S., Mateos-Langerak J., Gierman H.J., de Leeuw W., Giromus O., Indemans M.H., Koster J., Ondrej V., Versteeg R., van Driel R., The three-dimensional structure of human interphase chromosomes is related to the transcriptome map. *Mol Cell Biol*, 2007, 27, 4475–4487.
- Grigoryev S.A., Bulyanko Y.A., Popova E.Y., The end adjusts the means: heterochromatin remodelling during terminal cell differentiation. *Chromosome Res*, 2006, 14, 53–69.
- Heard E., Bickmore W., The ins and outs of gene regulation and chromosome territory organisation. *Curr Opin Cell Biol*, 2007, 19, 311–316.
- Kosak S.T., Skok J.A., Medina K.L., Riblet R., Le Beau M.M., Fisher A.G., Singh H., Subnuclear compartmentalization of immunoglobulin loci during lymphocyte development. *Science*, 2002, 296, 158–162.
- Kress C., Ballester M., Devinoy E., Rijnkels M., Epigenetic modifications in 3D: nuclear organization of the differentiating mammary epithelial cell. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2010, 15, 73–83.

- Lelièvre S.A., Contributions of extracellular matrix signaling and tissue architecture to nuclear mechanisms and spatial organization of gene expression control. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1790, 925–935.
- Mateos-Langerak J., Goetze S., Leonhardt H., Cremer T., van Driel R., Lanctot C., Nuclear architecture: Is it important for genome function and can we prove it? *J Cell Biochem*, 2007, 102, 1067–1075.
- Mayer R., Brero A., von Hase J., Schroeder T., Cremer T., Dietzel S., Common themes and cell type specific variations of higher order chromatin arrangements in the mouse. *BMC Cell Biol*, 2005, 6, 44.
- Meaburn K.J., Misteli T., Locus-specific and activity-independent gene repositioning during early tumorigenesis. *J Cell Biol*, 2008, 180, 39–50.
- Meaburn K.J., Gudla P.R., Khan S., Lockett S.J., Misteli T., Disease-specific gene repositioning in breast cancer. *J Cell Biol*, 2009, 187, 801–12.
- Morey C., Da Silva N.R., Perry P., Bickmore W.A., Nuclear reorganisation and chromatin decondensation are conserved, but distinct, mechanisms linked to Hox gene activation. *Development*, 2007, 134, 909–919.
- Osborne C.S., Chakalova L., Brown K.E., Carter D., Horton A., Debrand E., Goyenechea B., Mitchell J.A., Lopes S., Reik W., Fraser P., Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription. *Nat Genet*, 2004, 36, 1065–1071.
- Ragoczy T., Telling A., Sawado T., Groudine M., Kosak S.T., A genetic analysis of chromosome territory looping: diverse roles for distal regulatory elements. *Chromosome Res*, 2003, 11, 513–525.
- Sadoni N., Langer S., Fauth C., Bernardi G., Cremer T., Turner B.M., Zink D., Nuclear organization of mammalian genomes. Polar chromosome territories build up functionally distinct higher order compartments. *J Cell Biol*, 1999, 146, 1211–1226.
- Solovei I., Kreysing M., Lanctot C., Kosem S., Peichl L., Cremer T., Guck J., Joffe B., Nuclear architecture of rod photoreceptor cells adapts to vision in mammalian evolution. *Cell*, 2009, 137, 356–368.
- Volpi E.V., Chevret E., Jones T., Vatcheva R., Williamson J., Beck S., Campbell R.D., Goldsworthy M., Powis S.H., Ragoussis J., Trowsdale J., Sheer D., Large-scale chromatin organization of the major histocompatibility complex and other regions of human chromosome 6 and its response to interferon in interphase nuclei. *J Cell Sci*, 2000, 113, 1565–1576.