

Compartiments nucléaires d'hétérochromatine et répression génique : le modèle de la différenciation hématopoïétique humaine

Claire Guillemin^{1,*} et Claire Francastel²

¹ CNRS, Université Paris Diderot, UMR7216, Épигénétique et Destin Cellulaire, Paris, France

² Université Paris 7 Diderot, Bâtiment Lamarck - 4^e étage, Case Courrier 7042, 35 rue Hélène Brion, 75013 Paris, France

Auteur correspondant : Claire Francastel, claire.francastel@univ-paris-diderot.fr

Reçu le 18 mai 2010

Résumé – Il est classiquement admis que l'expression des gènes est déterminée par l'interaction de facteurs de transcription avec la structure répressive de la chromatine. Plus récemment, le contexte originel de la transcription, c'est-à-dire le noyau, a été pris en considération. De nombreuses observations soutiennent que l'organisation nucléaire, définie par le positionnement non aléatoire de gènes et de protéines régulatrices, influence l'expression du génome. La relation entre structure chromatinienne, mouvements chromosomiques et destin cellulaire est encore mal comprise. Néanmoins, l'étude de l'implication de ces aspects épigénétiques dans les changements héréditaires des programmes d'expression génique qui accompagnent la différenciation cellulaire est un domaine en plein essor. Le compartiment d'hétérochromatine péri-centromérique sera présenté comme un des exemples les mieux étudiés pour comprendre l'impact de l'organisation nucléaire et du positionnement de gènes sur leur transcription. Nous replacerons l'influence des compartiments d'hétérochromatine dans le contexte de la différenciation de progéniteurs hématopoïétiques multipotents humains.

Mots clés : Organisation nucléaire / hétérochromatine / transcription / différenciation / progéniteurs multipotents adultes

Abstract – Heterochromatin compartments and gene silencing: human hematopoietic differentiation as a model study.

In order to accomplish its differentiation program, the nucleus of a multipotent cell must be sequentially reprogrammed to acquire and maintain new gene expression patterns. When a stem cell is committed to differentiate towards a given lineage, global genome reprogramming involves both repression of non-affiliated genes and selective activation of genes involved in the establishment of the lineage. Accumulating evidence indicates that lineage specific gene expression is determined not only by the availability of specific transcription factors, but also by epigenetic modifications including both local modifications of DNA and chromatin structure, as well as global topological changes in chromosomes and genes positioning in the nucleus. Combined, these different levels of gene regulation allow for fine controls that integrate environmental and intracellular signals to establish appropriate gene expression programs, and hence ultimately determine the identity of the cell. Therefore, epigenetic modifications most likely precede gene activation and play a critical role in the choices of a stem cell to continue to self-renew or to differentiate. However, the cause-effect relationship between chromatin structure, nuclear architecture and cell-fate decisions is still a matter of debate.

* Adresse actuelle : McGill Faculty of Medicine Department of Pharmacology and Therapeutics Laboratoire de M. Szyf, Montréal, Canada.

The pericentromeric heterochromatin compartment will be presented as one of the best studied examples to understand the impact of and positioning of a gene on its transcription. We will set the influence of heterochromatin compartments in the context of hematopoietic differentiation of human multipotent progenitors.

Key words: Nuclear organization / heterochromatin / transcription / differentiation / adult multipotent progenitor

Préambule

Un des principaux buts de la biologie moderne est de comprendre comment l'expression du génome eucaryote est contrôlée dans le contexte du noyau. Alors que l'assemblage de l'ADN génomique en chromatine a fait l'objet d'études extensives, l'organisation d'ordre supérieur des chromosomes dans le noyau en interphase est encore mal comprise. Les progrès des techniques de *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH) ont permis la visualisation et l'analyse topographique de portions de chromosomes ou de gènes dans l'espace nucléaire (Manuelidis *et al.*, 1982). Depuis l'hypothèse formulée en 1985 par Günter Blobel (1985), la prise de conscience de l'influence du contexte spatial et dynamique du noyau sur l'expression du génome, notamment lors de l'orientation des cellules vers un destin spécifique et l'acquisition d'un phénotype différencié, n'a cessé de se consolider.

La différenciation cellulaire est l'ensemble des processus par lesquels une cellule acquiert un nouveau phénotype pour accomplir une fonction spécifique. Chez les eucaryotes supérieurs, la détermination des différents lignages cellulaires implique l'activation de gènes spécifiques, coordonnée à l'extinction du reste du génome. Seul un petit pourcentage du génome est actif dans une cellule différenciée donnée, la grande majorité étant maintenue dans un état inactif stable. Les mécanismes par lesquels ces gènes sont placés et maintenus dans un état silencieux ne sont pas totalement élucidés. Néanmoins, il apparaît maintenant clairement que la compartimentation du noyau, c'est-à-dire la répartition du matériel génétique et des protéines régulatrices dans des zones discrètes du noyau, a un impact sur l'expression du génome. Un nombre croissant d'études illustre en effet que les chromosomes et les gènes occupent des positions non aléatoires dans le noyau en interphase, variables avec le type cellulaire, et donc avec la mise en place de profils d'expression spécifiques d'un type cellulaire. Il en découle que la topologie précise des gènes dans l'espace nucléaire pourrait affecter l'accessibilité des gènes aux protéines régulatrices et à la machinerie transcriptionnelle, et déterminer par conséquent si une portion particulière du génome est transcriptionnellement activée ou réprimée (pour revue voir : Francastel *et al.*, 2000; Fisher & Merckenschlager, 2002; Chubb & Bickmore, 2003; Arney & Fisher, 2004; Fraser &

Bickmore, 2007; Lanctot *et al.*, 2007; Schneider & Grosschedl, 2007; Cope *et al.*, 2010).

De nombreuses données ont mis en évidence le fait que l'organisation nucléaire d'une cellule différenciée n'est pas établie de manière aléatoire, et qu'elle est corrélée à la mise en place d'un profil d'expression génique spécifique, caractéristique d'un type cellulaire et d'un stade de différenciation donnés (Manuelidis, 1984; Wansink *et al.*, 1993; van Steensel *et al.*, 1995; Sadoni *et al.*, 1999; Hendzel *et al.*, 2001; Verschure *et al.*, 2002). Un exemple de dynamique de l'architecture nucléaire au cours de la différenciation cellulaire a d'abord été visible sur des clichés de microscopie électronique, où une accumulation progressive de chromatine nucléaire dense aux électrons, alors appelée hétérochromatine, est clairement visible (voir revue de Francastel *et al.*, 2000). De manière intéressante, ce genre de cliché montre également que la distribution et la quantité d'hétérochromatine sont similaires dans des cellules différenciées d'un même lignage, tandis qu'elles varient dans le noyau de cellules matures de types cellulaires différents. Un autre exemple particulièrement évident de réorganisation nucléaire lors de la différenciation est l'agrégation d'hétérochromatine, à différents degrés selon le type cellulaire, dans des foyers distincts appelés chromocentres (Alcobia *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2006). Comme mentionné dans les chapitres suivants, les chromocentres semblent être une structure nucléaire où les protéines répressives pour la transcription se concentrent (Craig *et al.*, 2003). Combinées aux observations montrant que les gènes réprimés sont également colocalisés avec les foyers d'hétérochromatine (Brown *et al.*, 1997; Francastel *et al.*, 1999; Schubeler *et al.*, 2000; Kosak *et al.*, 2002; Delaire *et al.*, 2004; Merckenschlager *et al.*, 2004), ces données placent l'hétérochromatine au centre des régulations épigénétiques de l'expression des gènes.

Notre hypothèse de travail propose qu'une architecture nucléaire « tissu spécifique » pourrait servir à l'établissement ou au maintien de profils d'expression caractéristiques d'un état différencié donné. S'il existe en effet des mécanismes spécifiques qui placent et maintiennent des gènes dans un état silencieux à proximité des compartiments d'hétérochromatine, par opposition, le stade actif ou potentiellement actif d'un gène serait déterminé par son positionnement dans un compartiment du noyau dans lequel

sa transcription serait favorisée. Nous donnerons des exemples de l'influence de la localisation sub-nucléaire de gènes sur leur activité transcriptionnelle et de l'influence d'éléments *cis*-régulateurs auxquels ils sont liés sur leur position dans l'espace nucléaire. Les facteurs transcriptionnels qui se fixent sur ces éléments de contrôle pourraient donc agir en empêchant leur gène cible d'être incorporé dans l'hétérochromatine qui s'accumule lors de la différenciation, ou favoriser leur localisation dans un compartiment permissif pour la transcription, permettant donc à ce gène d'être exprimé dans le lignage approprié. Nous prendrons comme modèle la différenciation hématopoïétique, au cours de laquelle nous avons entrepris l'analyse du positionnement sub-nucléaire et des marques chromatiniennes de marqueurs de différenciation, dans différents progéniteurs multipotents ou engagés, précurseurs et cellules matures (Maes *et al.*, 2008; Guillemin *et al.*, 2009). Cette étude nous a permis d'évaluer la notion de causalité entre organisation nucléaire, structure chromatinienne et régulation de l'expression génique associées au choix des progéniteurs à s'engager dans la différenciation vers un lignage particulier.

Différents niveaux de régulation de l'expression des gènes

Le génome des organismes eucaryotes possède de 5000 à 50 000 gènes (30 000 chez l'Homme). Alors que chaque cellule d'un même organisme possède le même potentiel génétique, chaque type cellulaire présente un profil d'expression génique spécifique associé à une fonction cellulaire précise. En effet, certains gènes sont transcrits dans plusieurs types cellulaires voire dans l'ensemble des cellules, comme les gènes dont le produit est indispensable à leur métabolisme, alors que d'autres ne seront exprimés que dans un type cellulaire donné et réprimés dans tout autre lignage. Il en découle que seul un petit pourcentage du génome est actif dans une cellule spécialisée donnée, la grande majorité étant maintenue dans un état inactif stable. Les mécanismes par lesquels l'expression de ces dizaines de milliers de gènes est orchestrée dans la cellule eucaryote reste une question fondamentale de la biologie dont nous commençons tout juste à comprendre les différents niveaux de complexité (pour une revue : van Driel *et al.*, 2003).

L'organisation linéaire des séquences d'ADN est le premier niveau de régulation à avoir fait l'objet d'études extensives, et a permis l'identification d'éléments de contrôle en position *cis* des gènes ainsi que des protéines régulatrices qui s'y fixent en *trans*. L'interaction des facteurs transcriptionnels avec des séquences ou combinaisons de séquences

spécifiques au niveau des régions *cis*-régulatrices de leurs gènes cibles permettrait notamment d'influencer la fréquence avec laquelle le complexe d'initiation de la transcription s'assemble sur le promoteur d'un gène, et par conséquent, son niveau de transcription (Mitchell & Tjian, 1989; Kadonaga, 2004).

Ce premier niveau de régulation s'inclut dans un niveau de complexité supérieur résultant de la nécessité de compacter l'ADN, qui atteint jusqu'à deux mètres par cellule eucaryote, dans un noyau qui ne fait que dix microns de diamètre en moyenne. L'ADN se retrouve enroulé autour de nucléosomes, unités de base de la chromatine composées d'octamères de petites protéines basiques, les histones. La nature précise de la chromatine, bien que basée sur l'enroulement de l'ADN autour des nucléosomes, varie largement avec la localisation sur le chromosome et avec le contexte cellulaire. Alors qu'elle est souvent classée en « euchromatine » et « hétérochromatine », ce sont en fait des termes cytologiques ayant des définitions imprécises. La chromatine peut exister sous différentes conformations plus ou moins accessibles aux différentes machineries enzymatiques (Wolffe, 2001; Cosma, 2002). Par conséquent, cette structure n'est pas homogène pour l'activité transcriptionnelle. Par exemple, les télomères et les centromères sont associés à une structure de chromatine d'ordre supérieur plus dense, réputée répressive pour la transcription (Perrod & Gasser, 2003). Ce second niveau de régulation de la transcription implique également que la chromatine n'est pas une structure inerte. Les histones et l'ADN, les composants de base du nucléosome, sont la cible de modifications effectuées par différentes enzymes capables d'altérer les propriétés du nucléosome et son assemblage en chromatine plus ou moins compacte, donc plus ou moins permissive pour la transcription (Geiman & Robertson, 2002; Khorasanizadeh, 2004). Les modifications amino-terminales des histones conditionnent des affinités variables pour les protéines associées à la chromatine, générant des interactions synergiques ou antagonistes, influençant donc les transitions dynamiques entre chromatine transcriptionnellement active ou inactive (Jenuwein & Allis, 2001; Kouzarides, 2007). La combinaison de ces diverses modifications a conduit à la notion de « code des histones » qui étend de manière considérable le potentiel d'information porté par le code génétique (Turner, 2002). L'accessibilité de la chromatine apparaît donc comme un élément clé dans l'activité de facteurs transcriptionnels, et par conséquent, de la destinée d'une cellule.

Plus récemment, un troisième niveau de régulation de la transcription a été envisagé. Il s'agit du « niveau nucléaire » qui inclut l'organisation spatiale et dynamique du génome au sein du noyau en interphase. Comme évoqué en préambule, le noyau apparaît

structurellement et fonctionnellement compartimenté. En particulier, la transcription active semble se produire dans des zones discrètes du noyau (Wansink *et al.*, 1993). De même, les régulateurs transcriptionnels ne sont pas répartis uniformément dans l'espace nucléaire (Stein *et al.*, 2003). La régulation de l'expression des gènes pourrait donc nécessiter des changements de positionnement de loci génétiques et de facteurs régulateurs dans le volume nucléaire. Il existe maintenant de nombreux exemples dans lesquels des régions actives ou inactives du génome, ainsi que des facteurs impliqués dans l'activation ou la répression de l'expression des gènes, sont répartis de manière non aléatoire dans le noyau. L'enjeu des études actuelles est de réfuter l'argumentaire d'une organisation nucléaire dédiée au stockage organisé des gènes et des protéines régulatrices, et d'élucider la relation fonctionnelle entre architecture nucléaire et régulation de l'expression du génome.

En résumé, il s'avère que l'expression d'un gène est contrôlée non seulement par la disponibilité de combinaisons de facteurs de transcription, mais également par la modulation de sa structure locale de chromatine et, comme observé plus récemment, par son positionnement dans le noyau par rapport à des compartiments « permissifs » ou « non-permissifs » pour la transcription. La relation entre structure chromatinienne, mouvements chromosomiques et destin cellulaire reste à élucider. Néanmoins, de nombreux arguments s'accumulent encore pour dire que ces aspects épigénétiques sont impliqués dans les changements héréditaires des programmes d'expression génique qui accompagnent la différenciation des cellules.

Hétérochromatine constitutive et répression génique

En 1928, Emil Heitz (1928) est le premier à avoir décrit un type de chromatine particulier, appelé hétérochromatine, qui reste condensé tout au long du cycle cellulaire, quel que soit le type cellulaire. Cette hétérochromatine dite « constitutive » contraste avec l'euchromatine ou la « vraie chromatine » qui connaît des cycles de condensation et de décondensation à différentes étapes du cycle cellulaire ou de la différenciation. Il est le premier à avoir émis l'idée importante que le niveau de compaction de la chromatine varie le long des chromosomes. En effet, de larges domaines d'hétérochromatine constitutive entourent les centromères et les télomères, structures spécialisées assurant respectivement la transmission fidèle des chromosomes durant la méiose et la mitose et la protection des extrémités des chromosomes contre la dégradation. Il existe un second type d'hétérochromatine dite « facultative », qui correspond

à la condensation de certaines séquences génomiques euchromatiques qui doivent être rendues transcriptionnellement inactives au cours du développement. L'hétérochromatine facultative est donc variable d'un type cellulaire à un autre.

L'effet PEV

Le lien entre hétérochromatine et répression transcriptionnelle des gènes a été clairement établi par des analyses détaillées du phénomène d'effet de position (PEV pour *Position Effect Variegation*). L'exemple le plus connu est celui du locus *white* sur le chromosome X, essentiel à la pigmentation rouge des yeux de la Drosophile. Sa localisation anormale, transloquée à proximité de l'hétérochromatine centromérique, conduit à des yeux composés de facettes rouges (gène *white* actif) et de facettes allant du blanc à l'orange (gène *white* complètement ou partiellement inactivé, respectivement) (Henikoff, 1992). Ainsi, au sein d'un même tissu, le gène *white* est rendu transcriptionnellement inactif dans certaines cellules alors qu'il échappe au *silencing* dans des cellules voisines. Cette répression en « mosaïque » est spécifique de l'effet PEV. Les transgènes chez la souris, par exemple, sont soumis au même phénomène de répression dû à la structure répressive de la chromatine entourant le site d'insertion (Robertson *et al.*, 1995).

L'hétérochromatine péricentromérique

Des études sur la distribution spatiale des centromères dans différents types cellulaires et dans différentes espèces ont montré que l'organisation des centromères apparaît comme spécifique d'un type cellulaire (Manuelidis, 1984; Alcobia *et al.*, 2000). Dans le noyau en interphase, les centromères sont souvent localisés autour des nucléoles ou proches de la périphérie du noyau (Haaf & Schmid, 1991). Il a également été montré que la localisation des centromères change au cours du cycle cellulaire, pendant la différenciation ou avec la transformation cellulaire (Manuelidis, 1985; Vourc'h *et al.*, 1993). Dans les cellules de Mammifères, les centromères ont tendance à se regrouper dans des structures appelées « chromocentres » (figure 1), dont le nombre, la taille et la composition varient suivant le type cellulaire. Par exemple, la composition des chromocentres d'une cellule hématopoïétique est différente de celle d'un fibroblaste. De plus, cette composition varie avec le lignage hématopoïétique (Alcobia *et al.*, 2000). Si l'arrangement spatial des centromères dans le noyau en interphase forme des compartiments d'hétérochromatine dont la composition est spécifique d'un type cellulaire, alors ces compartiments d'hétérochromatine jouent

probablement un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes spécifiques de ce type cellulaire.

Les chromocentres de souris : des zones du noyau enrichies en facteurs répresseurs

Certaines protéines, plus précisément des répresseurs de la transcription n'ayant à priori aucun rôle direct dans l'architecture ou la fonction du centromère, se retrouvent concentrées au niveau des chromocentres en interphase (figure 1B). Plusieurs hypothèses sont envisagées quant à la fonction du ciblage centromérique de ces protéines répressives pour la transcription. Les chromocentres pourraient servir à « stocker » ces répresseurs et co-répresseurs de la transcription, afin de réguler leur concentration nucléoplasmique et de moduler leur activité qui est ailleurs dans le noyau. Deux exemples intéressants en désaccord avec un stockage passif montrent que le ciblage centromérique des répresseurs transcriptionnels Ikaros et NF-E2p18/MafK est corrélé au positionnement de leurs gènes cibles à proximité des chromocentres et avec la répression transcriptionnelle de ces gènes (Brown *et al.*, 1997; Francastel *et al.*, 2001). La co-localisation de protéines répresseurs de la transcription avec des gènes dans leur état silencieux suggère fortement que les chromocentres, compartiments d'hétérochromatine d'où les protéines de la machinerie transcriptionnelle et les facteurs transactivateurs sont pratiquement exclus, représentent effectivement un compartiment du noyau où la transcription est activement réprimée.

Compartiments d'hétérochromatine et répression stable de l'expression génique

L'objectif de nombreux travaux consiste à lier topologie nucléaire et expression génique pour mettre en évidence l'importance de cette dimension topologique pour la régulation de la transcription dans le contexte de la différenciation cellulaire. Les études exposées ci-dessous ont envisagé l'association de gènes avec le compartiment d'hétérochromatine.

Tout d'abord, le noyau eucaryote apparaît divisé en compartiments d'hétérochromatine répressifs pour la transcription, et en compartiments dans lesquels la transcription serait favorisée. Il existe en effet plusieurs exemples dans lesquels des régions actives et inactives du génome, ainsi que les facteurs impliqués dans l'activation ou la répression de l'expression génique, occupent des localisations distinctes dans le noyau. Une fraction significative de sites actifs de transcription est co-localisée avec l'ARN polymérase II, des facteurs de la machinerie basale de transcription ou avec des facteurs d'épissage (Osborne

et al., 2004, 2007; Chakalova *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2006; Ragozy *et al.*, 2006; Schoenfelder *et al.*, 2010), tandis que les gènes silencieux et des facteurs impliqués dans la répression des gènes sont associés à l'hétérochromatine constitutive, principalement liée aux régions péri-centromériques du génome (Brown *et al.*, 1997, 1999; Francastel *et al.*, 1999; Schubeler *et al.*, 2000; Francastel *et al.*, 2001; Skok *et al.*, 2001; Kosak *et al.*, 2002; Merckenschlager *et al.*, 2004).

Il en découle que l'extinction de l'expression d'un gène pourrait résulter d'un repositionnement, dans le noyau en interphase, vers un compartiment nucléaire défavorable à la transcription, le compartiment d'hétérochromatine. En d'autres termes, l'expression d'un gène peut être modifiée en *trans* si ce gène se retrouve localisé à proximité de compartiments d'hétérochromatine (figure 2). Chez la Drosophile, l'insertion d'un bloc d'hétérochromatine dans un des allèles du gène *Brown* a pour résultat l'association des deux allèles avec l'hétérochromatine centromérique, conduisant à l'inactivation des deux allèles, y compris l'allèle sauvage situé sur le chromosome homologue et ne portant pas d'insertion (Csink & Henikoff, 1996; Dernburg *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1999). Dans des lymphocytes B murins, les gènes transcriptionnellement actifs sont en général localisés à distance des compartiments d'hétérochromatine, alors que leur extinction au cours de la maturation des lymphocytes B est corrélée à leur repositionnement à proximité de ces compartiments (Brown *et al.*, 1997; Skok *et al.*, 2001). Il en est de même pour l'extinction des gènes *CD4* ou *CD8* lors de la détermination du lignage des thymocytes simples positifs (Merckenschlager *et al.*, 2004). Par opposition, l'activation du locus β -globine au cours de la différenciation érythroïde de lignées murines est corrélée à son changement de positionnement dans le noyau, à distance du compartiment d'hétérochromatine péri-centromérique (Francastel *et al.*, 2001).

Dans tous les cas, il y a association entre un gène silencieux et l'hétérochromatine, mais la question de la relation de cause à effet entre proximité de l'hétérochromatine et répression de la transcription reste à démontrer. Des indices suggèrent qu'il existe un lien entre le recrutement des gènes vers l'hétérochromatine et leur extinction stable et héritable. L'inactivation stable des gènes *Rag* et *TdT*, au cours de la différenciation de thymocytes primaires, est accompagnée par leur repositionnement à proximité de compartiments d'hétérochromatine péri-centromérique (Brown *et al.*, 1997). Par contre, dans une lignée cellulaire T, l'inactivation réversible des gènes *Rag* et *TdT* ne s'accompagne pas de changement de positionnement subnucléaire (Brown *et al.*, 1999). De manière similaire, un transgène localisé à proximité de compartiments d'hétérochromatine

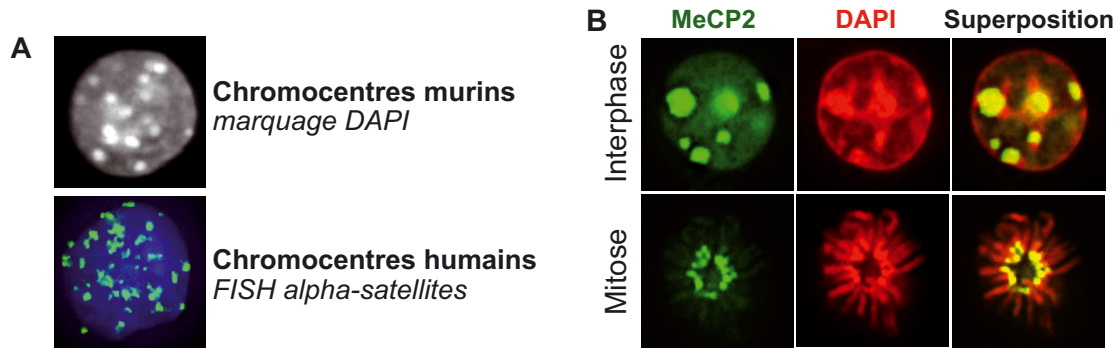
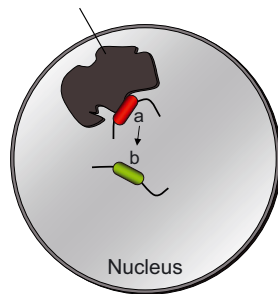


Fig. 1. Les chromocentres forment un compartiment nucléaire d'hétérochromatine constitutive. (A) Exemples de détection des chromocentres, par marquage au DAPI dans les cellules murines, ou par expérience de FISH dans les cellules humaines pour détecter les régions répétées péri-centromériques (alpha-satellites en vert). (B) Exemple de co-localisation entre un répresseur transcriptionnel (ici MeCP2 en vert) et les chromocentres murins (en rouge), dans un noyau en interphase ou sur les centromères des chromosomes pro-métaphasiques. La co-localisation apparaît en jaune.

A Compartiment d'hétérochromatine

Chromatine condensée, répressive pour la transcription
(hétérochromatine constitutive péri-centromérique)



a : Répression stable

Localisation à proximité des compartiments d'hétérochromatine

b : Activation stable

Localisation à distance des compartiments d'hétérochromatine

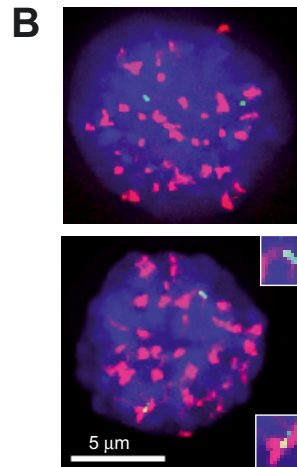


Fig. 2. Le positionnement d'un gène par rapport aux compartiments d'hétérochromatine constitutive influence la stabilité de son expression ou de sa répression. (A) Schéma illustrant les deux états transcriptionnels du même gène, actif (en vert) ou réprimé (en rouge) et son positionnement par rapport aux compartiments d'hétérochromatine constitutive (blocs gris), respectivement à distance ou à proximité de ce compartiment répresseur. (B) Exemples d'expériences de FISH dans lesquelles l'ADN est détecté par un marquage au DAPI (bleu), le compartiment d'hétérochromatine constitutive par la détection des répétitions satellites péri-centromériques (en rouge) et le locus β -globine par une sonde génomique spécifique (en vert). L'exemple du bas montre un noyau où les deux allèles sont associés à l'hétérochromatine dans une cellule dans laquelle ils sont réprimés, et l'exemple du haut montre un noyau où les deux allèles sont dissociés dans une cellule dans laquelle ils sont activés.

péricentromérique peut être transcriptionnellement actif mais, dans ce cas, son expression et sa structure chromatinienne ouverte sont instables à cette position et rapidement perdues au cours des générations (Francastel *et al.*, 1999). Le maintien de l'expression du transgène au cours des divisions nécessite son repositionnement loin du compartiment répresseur pour la transcription (Francastel *et al.*, 1999). De même, la transmission stable d'une structure de chromatine ouverte au niveau du locus β -globine, à son locus endogène cette fois, nécessite le positionnement

du locus loin des compartiments d'hétérochromatine (Schubeler *et al.*, 2000; Francastel *et al.*, 2001). Avec l'observation montrant que la suppression de l'extinction d'un transgène (Francastel *et al.*, 1999) et le maintien d'une structure ouverte de chromatine (Schubeler *et al.*, 2000) requièrent un positionnement à distance du compartiment d'hétérochromatine, l'ensemble de ces données suggère que la transmission stable d'une structure chromatinienne ouverte au niveau d'un gène, et son activation transcriptionnelle proprement dite, seraient favorisées par sa « séquestration » dans un

compartiment *ad hoc*, c'est-à-dire à distance du compartiment d'hétérochromatine (figure 2).

Rôles des éléments *cis*- et *trans*-actifs

Une fois établi, l'état silencieux est transmis de manière stable, mais il peut être outrepassé par des activateurs transcriptionnels (Aparicio & Gottschling, 1994; Farkas *et al.*, 1994). De plus, l'extinction de l'expression de transgènes dans des cellules de mammifères en culture peut être empêchée par l'inclusion d'un *enhancer* dans le transgène. Au contraire, la délétion d'éléments *cis*-régulateurs d'une construction intégrée dans le génome conduit à une perte rapide de l'expression de cette unité de transcription (Walters *et al.*, 1996). Ces données, combinées aux observations exposées précédemment, établissant le lien fonctionnel entre le positionnement sub-nucléaire d'un gène et le maintien d'une structure chromatinienne/activité transcriptionnelle données, suggèrent que des éléments *cis*-régulateurs pourraient maintenir l'expression du gène lié en favorisant sa localisation dans un compartiment du noyau permissif pour la transcription. Ainsi, le positionnement d'un gène serait dicté par les éléments *cis*-actifs auxquels il est lié. Par exemple, la re-localisation des loci *β -globine* au cours de la différenciation des cellules murines est sous la dépendance de leur région de contrôle du locus (LCR pour *Locus Control Region*) (Ragoczy *et al.*, 2006). La fixation d'activateurs transcriptionnels sur ces éléments empêcherait son incorporation dans la chromatine facultative qui se forme au cours de la différenciation, lui permettant ainsi d'être actif dans le lignage approprié, jusqu'aux derniers stades de la différenciation.

Néanmoins, les mécanismes qui favorisent la localisation de loci génétiques dans des compartiments nucléaires précis restent très peu élucidés. La re-localisation de la membrane nucléaire vers le centre du noyau d'un transgène inductible est dictée par la liaison d'un facteur transcriptionnel (VP16) à des séquences spécifiques du transgène (Tumbar & Belmont, 2001). De la même manière, la re-localisation de transgènes à distance de l'hétérochromatine péricentromérique nécessite la liaison de facteurs transcriptionnels spécifiques sur l'*enhancer* du transgène (Francastel *et al.*, 1999; Lundgren *et al.*, 2000). À l'inverse, le ciblage de la protéine HP1 au niveau d'un transgène conduit à la répression stable et héréditaire de son expression et son recrutement vers l'hétérochromatine péricentromérique (Ayyanathan *et al.*, 2003).

Les facteurs transcriptionnels Ikaros et NF-E2p18/MafK ont été précédemment impliqués dans le recrutement de leurs gènes cibles à proximité des compartiments d'hétérochromatine, favorisant ainsi

leur répression transcriptionnelle (Brown *et al.*, 1997; Francastel *et al.*, 1999). Ikaros serait également impliqué dans l'exclusion allélique des immunoglobulines, en recrutant l'allèle inactif des chaînes lourde ou légère à proximité de l'hétérochromatine péricentromérique (Cobb *et al.*, 2000; Skok *et al.*, 2001).

Ces études mettent en avant un nouvel aspect des mécanismes de régulation de l'expression génique, *via* le ciblage de loci génétiques dans des compartiments distincts du noyau dicté par la fixation de facteurs régulateurs sur leurs séquences *cis*-régulatrices.

La différenciation hématopoïétique comme modèle

Toutes les cellules sanguines sont issues d'un groupe de cellules multipotentes dites « souches », capables de reconstituer l'hématopoïèse à long terme. L'engagement de ces cellules à se différencier vers un lignage donné requiert la mise en place de nouveaux programmes d'expression génique, transmis de manière fidèle aux générations suivantes. Comme illustré précédemment, des modifications épigénétiques sont impliquées dans les changements héréditaires des programmes d'expression génique qui accompagnent la différenciation normale de cellules multipotentes en progéniteurs engagés puis précurseurs et cellules matures (Francastel *et al.*, 2000; Fisher & Merkenschlager, 2002; Mohn & Schübeler, 2009). Néanmoins, la relation entre structure chromatinienne, mouvements chromosomiques, et destin cellulaire demeure peu élucidée.

Nos travaux antérieurs ont permis de montrer que le maintien de l'expression stable d'un gène et sa configuration chromatinienne ouverte nécessitent à la fois, la liaison du gène à un *enhancer* intact, et son positionnement à distance de l'hétérochromatine péricentromérique (Francastel *et al.*, 1999). Ces données ont révélé que les éléments *cis*-régulateurs d'un gène pouvaient favoriser la localisation du gène lié dans des compartiments favorables à leur transcription, à distance des compartiments répressifs d'hétérochromatine. L'hypothèse qui en découle prédit que la liaison de *trans*-activateurs sur les séquences *cis*-régulatrices permettrait d'établir et/ou de maintenir l'expression d'un gène dans le lignage approprié jusqu'aux phases finales de la différenciation, en favorisant le positionnement du gène lié dans un compartiment permissif pour la transcription, empêchant ainsi son incorporation dans l'hétérochromatine nucléaire facultative qui se forme au cours de la différenciation cellulaire. La configuration de la structure chromatinienne dans une cellule souche multipotente n'est pas claire, mais l'engagement de ces cellules dans un lignage donné pourrait être caractérisé par

une étape de pré-activation dans laquelle les gènes spécifiques de ce lignage seraient localisés à distance de l'hétérochromatine centromérique, rendant le locus accessible à des facteurs transcriptionnels. La différenciation terminale mènerait, dans un deuxième temps, à l'activation transcriptionnelle proprement dite du gène (Francastel *et al.*, 2000). Ce schéma d'activation suggère que les loci affiliés à un lignage donné occupent des compartiments nucléaires distincts en fonction du stade de différenciation des cellules.

L'analyse des changements dynamiques de structure chromatinienne et de localisation nucléaire de gènes spécifiques d'un lignage donné, entre progéniteurs multipotents, progéniteurs engagés, puis précurseurs et cellules matures, nous a permis d'évaluer le rapport de causalité entre changements d'organisation nucléaire et changements de structure chromatinienne associés à l'engagement de cellules multipotentes à se différencier vers un lignage donné (Maes *et al.*, 2008; Guillemain *et al.*, 2009).

Modèle cellulaire et approche expérimentale

Nous avons choisi de travailler avec des progéniteurs hématopoïétiques primaires humains isolés de sang de cordons ombilicaux ou de moelle osseuse. Chez l'Homme, la cellule souche hématopoïétique n'est pas totalement définie, mais on considère que les cellules CD34⁺/CD38⁻ sont largement enrichies en cellules immatures pluripotentes ayant une capacité d'auto-renouvellement et de reconstitution de l'hématopoïèse à long terme. Les cellules CD34⁺/38⁻ et les progéniteurs engagés (CD34⁺/lin⁺) sont triés à partir de la population de cellules CD34⁺ isolées du sang de cordons ombilicaux sur colonne magnétique. Les précurseurs et cellules matures (CD34⁻/lin⁺) sont directement triés à partir des cellules mono-nucléées du sang de cordons ombilicaux.

L'évolution de la position de loci tissus spécifiques au cours de la différenciation de progéniteurs hématopoïétiques dans divers lignages, par rapport aux compartiments répresseurs d'hétérochromatine, est suivie par *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH). Les séquences péricentromériques des chromosomes humains sont détectées par un mélange d'oligonucléotides couvrant entièrement la séquence des répétitions α -satellites péricentromériques, et les loci tissus spécifiques sont détectés par des sondes génomiques couvrant tout ou partie du gène et de ses séquences régulatrices connues. La structure locale de la chromatine, au niveau des promoteurs et de séquences régulatrices de gènes spécifiques d'un lignage, et son évolution au cours de la différenciation dans les différents lignages hématopoïétiques sont déterminées par analyse des

modifications d'histones par *Chromatin Immunoprecipitation* (ChIP). L'acétylation de l'histone H4 et de l'histone H3 est généralement associée à une conformation chromatinienne ouverte, tandis que la triméthylation des lysines 9 ou 27 de l'histone H3 est souvent associée à des structures chromatiniennes réprimées. Nous avons donc analysé le profil de méthylation et d'acétylation des histones H3 et H4 en utilisant des anticorps contre les formes acétylées ou méthylées des résidus lysines (Maes *et al.*, 2001). La présence de segments de gènes dans la fraction immuno-précipitée (contenant la chromatine modifiée) est ensuite quantifiée par PCR en temps réel.

Changements de localisation sub-nucléaire au cours de la différenciation et maintien des programmes d'expression génique

Comme évoqué précédemment, de nombreuses études liant topologie nucléaire et expression génique ont envisagé l'association de gènes avec le compartiment d'hétérochromatine et/ou la périphérie nucléaire, où l'hétérochromatine est souvent concentrée chez les eucaryotes supérieurs.

Nous avons dans un premier temps étudié les loci β -globine et *Igk*, dont la régulation a déjà été liée dans d'autres systèmes à leur changement de localisation (Francastel *et al.*, 2001; Kosak *et al.*, 2002), comme modèles pour déterminer l'ordre dans lequel les changements chromatiniens et de positionnement sub-nucléaire s'opèrent au cours de la différenciation hématopoïétique humaine normale. Nos résultats montrent que l'engagement de progéniteurs hématopoïétiques multipotents vers un lignage donné est associé à l'augmentation progressive des marques de chromatine active au niveau des gènes spécifiques de ce lignage. Ces changements sont détectables dès le stade progéniteur engagé, et sont concomitants avec l'activation transcriptionnelle des loci à ce stade de la différenciation (Maes *et al.*, 2008; Guillemain *et al.*, 2009).

D'autre part, nos données montrent que, pendant la différenciation érythroïde, une fraction des loci spécifiquement érythroïdes β -globine et *Rhésus* est relocalisée à distance des compartiments d'hétérochromatine péricentromérique, tandis que ces loci sont « recrutés » vers les compartiments d'hétérochromatine dans les précurseurs d'autres lignées. Cette « re-localisation » est observée spécifiquement lors de la différenciation érythroïde, puisque l'association aux compartiments d'hétérochromatine demeure inchangée dans des précurseurs engagés dans la lignée lymphocytaire B par exemple. Une situation totalement symétrique est observée pour le locus *Igk* relocalisé à distance des

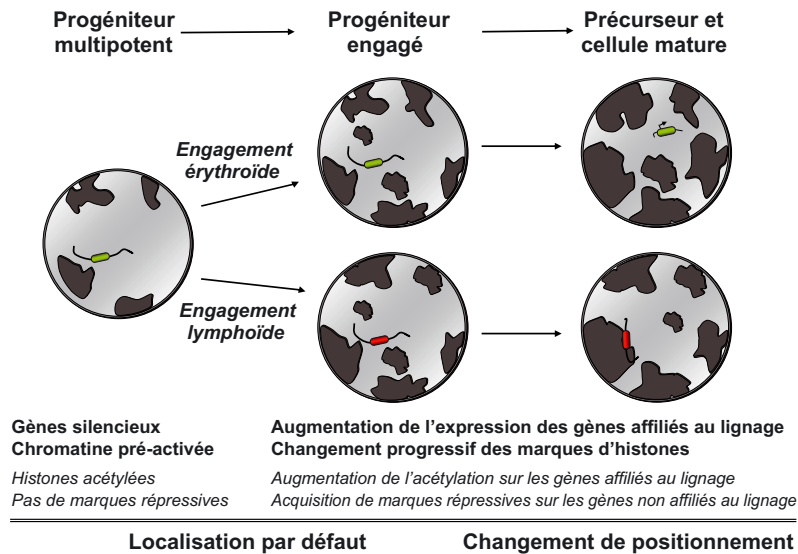


Fig. 3. Les changements de marques chromatinienne précèdent les changements de positionnement subnucléaire au cours de la différenciation hématopoïétique humaine. Dans les cellules hématopoïétiques multipotentes, les marques de chromatine active sont déjà en place au niveau des programmes myéloïdes et lymphoïdes (en vert). Après engagement de ces cellules à se différencier vers le lignage érythroïde ou lymphoïde, on observe une augmentation progressive des marques actives au niveau des gènes affiliés au programme, et l'acquisition de marques répressives au niveau des gènes d'autres lignages (en rouge), à partir du stade progéniteur engagé. Dans une deuxième étape, au niveau des précurseurs et cellules matures, le maintien d'un état actif (gène érythroïde dans la lignée érythroïde, en haut) est associé à un changement de localisation qui place le gène à distance de l'hétérochromatine constitutive (blocs gris). De même, le maintien d'un état inactif (gène érythroïde dans la lignée lymphoïde, en bas) est associé à un changement de localisation qui place le gène à proximité de l'hétérochromatine constitutive.

compartiments d'hétérochromatine péri-centromérique lors de la différenciation lymphocytaire B et « recruté » vers les compartiments d'hétérochromatine dans les précurseurs érythroïdes. De manière surprenante, les changements de distribution que nous avons observés apparaissent dans les cellules précurseurs, c'est-à-dire bien après la décision d'engagement des cellules multipotentes à se différencier vers un lignage donné, et après les changements de marques de chromatine. Comme suggéré par d'autres études sur d'autres loci ou dans d'autres systèmes cellulaires, il n'est pas exclu que l'établissement d'un état transcriptionnellement actif et d'une chromatine ouverte au niveau des loci *β -globine* et *Ig κ* pourrait nécessiter leur positionnement dans des compartiments du noyau enrichis en protéines de la machinerie transcriptionnelle (Osborne *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2006; Ragozy *et al.*, 2006). Par contre, notre étude suggère que le maintien de leur état actif jusqu'aux étapes finales de la différenciation nécessite le positionnement du gène à distance des compartiments d'hétérochromatine, alors que le maintien de leur état réprimé dans les lignages dans lesquels ils ne doivent pas être exprimés nécessite leur positionnement à proximité de ces compartiments (figure 3).

Ainsi, la première étape lors de l'engagement des progéniteurs hématopoïétiques multipotents vers un

lignage donné serait associée à une augmentation progressive de marques de chromatine active au niveau des gènes spécifiques de ce lignage et de marques répressives au niveau des gènes d'autres lignages, d'une manière indépendante de leur positionnement dans le noyau par rapport à l'hétérochromatine. À des stades plus tardifs, c'est-à-dire dans des cellules précurseurs ou dans les cellules matures, le maintien de l'état activé ou réprimé est associé à un positionnement dans un compartiment du noyau, respectivement permissif ou non permissif pour la transcription.

En substance, nos données indiquent que les changements de localisation sub-nucléaire d'un gène au cours de la différenciation hématopoïétique humaine sont dictés par la nécessité d'activer ou de réprimer ce gène de manière permanente, plutôt que d'être un facteur décisif ou prédictif de l'engagement des cellules souches vers un lignage donné.

Caractérisation épigénétique des cellules souches adultes et plasticité des programmes d'expression génique

Un autre objectif important de notre étude était également de définir la structure de la chromatine

et l'organisation nucléaire associées au potentiel de différenciation multiple des cellules hématopoïétiques primitives.

La structure particulière de la chromatine dans des cellules souches embryonnaires commence à être bien caractérisée. Dans les cellules ES, les gènes codants des régulateurs clés du développement embryonnaire portent des marques bivalentes (Azuara *et al.*, 2006 ; Bernstein *et al.*, 2006). Ces gènes sont silencieux dans les cellules ES, mais ils présentent des marques de chromatine active contrebalancées par la présence de marques répressives au niveau des mêmes régions. Au cours de la différenciation des cellules ES, ces domaines bivalents sont résolus, les marques de chromatine répressive sont éliminées des promoteurs des gènes activés dans le lignage choisi alors que les marques activatrices sont éliminées des promoteurs qui seront réprimés de façon stable (Mikkelsen *et al.*, 2007).

En revanche, la question de l'organisation nucléaire et de la structure chromatinienne des cellules multipotentes adultes reste encore très ouverte. Un de nos objectifs était de pouvoir trancher entre deux hypothèses couramment proposées : (i) les cellules multipotentes maintiennent une structure chromatinienne ouverte au niveau des programmes spécifiques d'un lignage, le choix de différenciation dans un lignage donné conduisant au maintien du programme affilié à ce lignage et à la répression graduelle des autres programmes ou (ii) les gènes spécifiques d'un lignage sont sélectivement ouverts et activés au cours de l'engagement des cellules multipotentes et maintenus au cours de la différenciation.

Nous avons observé que de nombreux gènes spécifiques des lignages lymphoïde et myéloïde étaient déjà associés à des marques de chromatine active dans les progéniteurs hématopoïétiques multipotents, à des niveaux comparables à ceux qui sont atteints lors de l'activation sélective de ces gènes lors de la différenciation (Maes *et al.*, 2008). Il est à noter que ces gènes sont silencieux dans les cellules multipotentes alors qu'ils sont pratiquement dépourvus de modifications d'histones répressives. Les cellules multipotentes adultes présentent donc une structure de chromatine différente de celle des cellules pluripotentes embryonnaires. Une hypothèse à confirmer serait que les cellules multipotentes adultes ont résolu les domaines bivalents caractéristiques des cellules embryonnaires pour présenter des marques de chromatine active au niveau des gènes des différents programmes hématopoïétiques et des marques répressives au niveau des gènes d'autres programmes. Ces résultats suggèrent néanmoins que les modifications d'histones associées à une structure de chromatine permissive sont déjà en place au niveau des gènes spécifiques des différents lignages dans les cellules multipotentes adultes, avant même que l'expression de ces gènes soit

activée à la suite de l'engagement des cellules dans une voie de différenciation donnée.

De manière intéressante, nos travaux indiquent que, dans les progéniteurs hématopoïétiques multipotents, l'état silencieux des gènes spécifiques des lignages lymphoïde et myéloïde n'est pas nécessairement associé à un positionnement à proximité des compartiments d'hétérochromatine (Guillemin *et al.*, 2009). D'autre part, nous avons observé que leur positionnement sub-nucléaire n'était pas non plus significativement différent de celui qui est observé dans des cellules multipotentes d'autres origines (hématopoïétique, musculaire ou mésenchymateuse) ni même dans des progéniteurs hématopoïétiques déjà engagés. Puisque ces gènes portent des marques caractéristiques de chromatine active dans des progéniteurs hématopoïétiques et des marques répressives dans des progéniteurs d'origine autre qu'hématopoïétique (cellules satellites musculaires, cellules souches mésenchymateuses), le positionnement de ces gènes pourrait donc représenter une localisation « par défaut », intrinsèque au locus, plutôt que d'être impliqué dans la mise en place de marques chromatinienne particulières (figure 3). D'autre part, dans la population totale de ces progéniteurs engagés CD34⁺, le profil des modifications d'histones est similaire à celui des cellules multipotentes CD34⁺/CD38⁻. Si, comme nous l'avons mentionné précédemment, la localisation subnucléaire d'un gène est associée au maintien d'un statut chromatinien particulier, ces observations suggèrent que les progéniteurs CD34⁺, bien que déjà engagés dans un lignage donné, conservent une certaine plasticité de leurs programmes d'expression. Il est alors tentant de spéculer que le compartiment des progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ pourrait représenter une population de cellules épigénétiquement dynamiques. Ces cellules perdent graduellement leur potentiel de différenciation multiple au fur et à mesure de leur différenciation, mais pourraient conserver, jusqu'à un certain stade, une capacité de se différencier en des types cellulaires variés en réponse à des signaux intrinsèques ou extrinsèques. Ces cellules, plus abondantes et plus faciles à isoler que les cellules « souches » multipotentes, pourraient se révéler être des outils de choix dans des expériences de trans-différenciation visant à identifier les facteurs conférant au noyau cellulaire de cellules différenciées une certaine plasticité.

Conclusion, perspectives

En conclusion, nos travaux ont permis d'associer l'état multipotent de progéniteurs hématopoïétiques à des marques de chromatine permissive au niveau de gènes spécifiquement hématopoïétiques, en absence de

marques répressives, bien qu'ils soient transcriptionnellement silencieux dans ces cellules. Cet état chromatinien est associé à une localisation subnucléaire par défaut, c'est-à-dire intrinsèque au locus. De plus, l'engagement de ces progéniteurs vers un lignage donné est associé à l'acquisition progressive de marques de chromatine active au niveau des gènes spécifiques de ce lignage et de marques répressives au niveau des autres gènes, sans impliquer de changement de localisation subnucléaire. À des stades plus tardifs, c'est-à-dire dans des cellules précurseurs, le maintien de l'état activé ou réprimé est associé à un positionnement dans un compartiment du noyau, respectivement permissif ou non permissif pour la transcription.

Si le potentiel multiple des cellules souches adultes est caractérisé par une structure chromatinienne permissive au niveau des gènes potentiellement actifs, et par une localisation sub-nucléaire par défaut, alors la cartographie précise de la structure chromatinienne et de l'architecture nucléaire des cellules multipotentes adultes et des cellules progénitrices pourrait être un outil important pour évaluer les potentiels de différenciation et de trans-différenciation de ces cellules, ou l'efficacité de molécules notamment utilisées dans des protocoles de trans-différenciation.

Références

- Alcobia I., Dilao R., Parreira L., Spatial associations of centromeres in the nuclei of hematopoietic cells: evidence for cell-type-specific organizational patterns. *Blood*, 2000, 95, 1608–1615.
- Aparicio O.M., Gottschling D.E., Overcoming telomeric silencing: a trans-activator competes to establish gene expression in a cell cycle-dependent way. *Genes Dev*, 1994, 8, 1133–1146.
- Arney K.L., Fisher A.G., Epigenetic aspects of differentiation. *J Cell Sci*, 2004, 117, 4355–4363.
- Ayyanathan K., Lechner M.S., Bell P., Maul G.G., Schultz D.C., Yamada Y., Tanaka K., Torigoe K., Rauscher F.J.3rd., Regulated recruitment of HP1 to a euchromatic gene induces mitotically heritable, epigenetic gene silencing: a mammalian cell culture model of gene variegation. *Genes Dev*, 2003, 17, 1855–1869.
- Azuara V., Perry P., Sauer S., Spivakov M., Jørgensen H.F., John R.M., Gouti M., Casanova M., Warnes G., Merkenschlager M., Fisher A.G., Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nat Cell Biol*, 2006, 8, 532–538.
- Bernstein B.E., Mikkelsen T.S., Xie X., Kamal M., Huebert D.J., Cuff J., Fry B., Meissner A., Wernig M., Plath K., Jaenisch R., Wagschal A., Feil R., Schreiber S.L., Lander E.S., A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*, 2006, 125, 315–326.
- Blobel G., Gene gating: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82, 8527–8529.
- Brown K.E., Guest S.S., Smale S.T., Hahm K., Merkenschlager M., Fisher A.G., Association of transcriptionally silent genes with Ikaros complexes at centromeric heterochromatin. *Cell*, 1997, 91, 845–854.
- Brown K.E., Baxter J., Graf D., Merkenschlager M., Fisher A.G., Dynamic repositioning of genes in the nucleus of lymphocytes preparing for cell division. *Mol Cell*, 1999, 3, 207–217.
- Brown J.M., Leach J., Reittie J.E., Atzberger A., Lee-Prudhoe J., Wood W.G., Higgs D.R., Iborra F.J., Buckle V.J., Coregulated human globin genes are frequently in spatial proximity when active. *J Cell Biol*, 2006, 172, 177–187.
- Chakalova L., Debrand E., Mitchell J.A., Osborne C.S., Fraser P., Replication and transcription: shaping the landscape of the genome. *Nat Rev Genet*, 2005, 6, 669–677.
- Chubb J.R., Bickmore W.A., Considering nuclear compartmentalization in the light of nuclear dynamics. *Cell*, 2003, 112, 403–406.
- Cobb B.S., Morales-Alcayal S., Kleiger G., Brown K.E., Fisher A.G., Smale S.T., Targeting of Ikaros to pericentromeric heterochromatin by direct DNA binding. *Genes Dev*, 2000, 14, 2146–2160.
- Cope N.F., Fraser P., Eskiw C.H., The yin and yang of chromatin spatial organization. *Genome Biol*, 2010, 11, 8.
- Cosma M.P., Ordered recruitment: gene-specific mechanism of transcription activation. *Mol Cell*, 2002, 10, 227–236.
- Craig J.M., Earle E., Canham P., Wong L.H., Anderson M., Choo K.H., Analysis of mammalian proteins involved in chromatin modification reveals new metaphase centromeric proteins and distinct chromosomal distribution patterns. *Hum Mol Genet*, 2003, 12, 3109–3121.
- Csink A.K., Henikoff S., Genetic modification of heterochromatic association and nuclear organization in *Drosophila*. *Nature*, 1996, 381, 529–531.
- Delaire S., Huang Y.H., Chan S.W., Robey E.A., Dynamic repositioning of CD4 and CD8 genes during T cell development. *J Exp Med*, 2004, 200, 1427–1435.
- Dernburg A.F., Broman K.W., Fung J.C., Marshall W.F., Philips J., Agard D.A., Sedat J.W., Perturbation of nuclear architecture by long-distance chromosome interactions. *Cell*, 1996, 85, 745–759.
- Farkas G., Gausz J., Galloni M., Reuter G., Gyurkovics H., Karch F., The Trithorax-like gene encodes the *Drosophila* GAGA factor. *Nature*, 1994, 371, 806–808.
- Fisher A.G., Merkenschlager M., Gene silencing, cell fate and nuclear organisation. *Curr Opin Genet Dev*, 2002, 12, 193–197.
- Francastel C., Walters M.C., Groudine M., Martin D.I., A functional enhancer suppresses silencing of a transgene and prevents its localization close to centromeric heterochromatin. *Cell*, 1999, 99, 259–269.
- Francastel C., Schubeler D., Martin D.I., Groudine M., Nuclear compartmentalization and gene activity. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000, 1, 137–143.

- 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.
- Fraser P., Bickmore W., Nuclear organization of the genome and the potential for gene regulation. *Nature*, 2007, 447, 413–417.
- Geiman T.M., Robertson K.D., Chromatin remodeling, histone modifications, and DNA methylation—how does it all fit together? *J Cell Biochem*, 2002, 87, 117–125.
- Guillemain C., Maleszewska M., Guais A., Maës J., Rouyez M.C., Yacia A., Fichelson S., Goodhardt M., Francastel C., Chromatin modifications in hematopoietic multipotent and committed progenitors are independent of gene subnuclear positioning relative to repressive compartments. *Stem Cells*, 2009, 27, 108–115.
- Haaf T., Schmid M., Chromosome topology in mammalian interphase nuclei. *Exp Cell Res*, 1991, 192, 325–332.
- Heitz E., Das Heterochromatin der Moose. *Jb Wiss Bot*, 1928, 69, 728.
- Hendzel M.J., Krullak M.J., MacLean N.A., Boisvert F., Lever M.A., Bazett-Jones D.P., Compartmentalization of regulatory proteins in the cell nucleus. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2001, 76, 9–21.
- Henikoff S., Position effect and related phenomena. *Curr Opin Genetics Dev*, 1992, 2, 907–912.
- Jenuwein T., Allis C.D., Translating the histone code. *Science*, 2001, 293, 1074–1080.
- Kadonaga J.T., Regulation of RNA polymerase II transcription by sequence-specific DNA binding factors. *Cell*, 2004, 116, 247–257.
- Khorasanizadeh S., The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell*, 2004, 116, 259–272.
- 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.
- Kouzarides T., Chromatin modifications and their function. *Cell*, 2007, 128, 693–705.
- Lanctot C., Cheutin T., Cremer M., Cavalli G., Cremer T., Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nat Rev Genet*, 2007, 8, 104–115.
- Lundgren M., Chow C.M., Sabbattini P., Georgiou A., Minaee S., Dillon N., Transcription factor dosage affects changes in higher order chromatin structure associated with activation of a heterochromatic gene. *Cell*, 2000, 103, 733–743.
- Maes J., O'Neill L.P., Cavellier P., Turner B.M., Rougeon F., Goodhardt M., Chromatin remodeling at the Ig loci prior to V(D)J recombination. *J Immunol*, 2001, 167, 866–874.
- Maes J., Maleszewska M., Guillemain C., Pflumio F., Six E., Andre-Schmutz I., Cavazzana-Calvo M., Charron D., Francastel C., Goodhardt M., Lymphoid-affiliated genes are associated with active histone modifications in human hematopoietic stem cells. *Blood*, 2008, 112, 2722–2729.
- Manuelidis L., Indications of centromere movement during interphase and differentiation. *Ann NY Acad Sci*, 1985, 450, 205–221.
- Manuelidis L., Langer-Safer P.R., Ward D.C., High-resolution mapping of satellite DNA using biotin-labeled DNA probes. *J Cell Biol*, 1982, 95, 619–625.
- Manuelidis L., Different central nervous system cell types display distinct and nonrandom arrangements of satellite DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81, 3123–3127.
- Martin C., Beaujean N., Brochard V., Audouard C., Zink D., Debey P., Genome restructuring in mouse embryos during reprogramming and early development. *Dev Biol*, 2006, 292, 317–332.
- Merkenschlager M., Amoils S., Roldan E., Rahemtulla A., O'Connor E., Fisher A.G., Brown K.E., Centromeric repositioning of coreceptor loci predicts their stable silencing and the CD4/CD8 lineage choice. *J Exp Med*, 2004, 200, 1437–1444.
- Mikkelsen T.S., Ku M., Jaffe D.B., Issac B., Lieberman E., Giannoukos G., Alvarez P., Brockman W., Kim T.K., Koche R.P., Lee W., Mendenhall E., O'Donovan A., Presser A., Russ C., Xie X., Meissner A., Wernig M., Jaenisch R., Nusbaum C., Lander E.S., Bernstein B.E., Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature*, 2007, 448, 553–560.
- Mitchell P.J., Tjian R., Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science*, 1989, 245, 371–378.
- Mohn F., Schübeler D., Genetics and epigenetics: stability and plasticity during cellular differentiation. *Trends Genet*, 2009, 25, 129–136.
- 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.
- Osborne C.S., Chakalova L., Mitchell J.A., Horton A., Wood A.L., Bolland D.J., Corcoran A.E., Fraser P., Myc dynamically and preferentially relocates to a transcription factory occupied by Igh. *PLoS Biol*, 2007, 5, e192.
- Perrod S., Gasser S.M., Long-range silencing and position effects at telomeres and centromeres: parallels and differences. *Cell Mol Life Sci*, 2003, 60, 2303–2318.
- Ragoczy T., Bender M.A., Telling A., Byron R., Groudine M., The locus control region is required for association of the murine beta-globin locus with engaged transcription factories during erythroid maturation. *Genes Dev*, 2006, 20, 1447–1457.
- Robertson G., Garrick D., Wu W., Kearns M., Martin D., Whitelaw E., Position-dependent variegation of globin transgene expression in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92, 5371–5375.
- 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.
- Schneider R., Grosschedl R., Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression. *Genes Dev*, 2007, 21, 3027–3043.

- Schoenfelder S., Sexton T., Chakalova L., Cope N.F., Horton A., Andrews S., Kurukuti S., Mitchell J.A., Umlauf D., Dimitrova D.S., Eskiw C.H., Luo Y., Wei C.L., Ruan Y., Bieker J.J., Fraser P., Preferential associations between co-regulated genes reveal a transcriptional interactome in erythroid cells. *Nat Genet*, 2010, 42, 53–61.
- Schubeler D., Francastel C., Cimbara D.M., Reik A., Martin D.I., Groudine M., Nuclear localization and histone acetylation: a pathway for chromatin opening and transcriptional activation of the human beta-globin locus. *Genes Dev*, 2000, 14, 940–950.
- Skok J.A., Brown K.E., Azuara V., Caparros M.L., Baxter J., Takacs K., Dillon N., Gray D., Perry R.P., Merkenschlager M., Fisher A.G., Nonequivalent nuclear location of immunoglobulin alleles in B lymphocytes. *Nat Immunol*, 2001, 2, 848–854.
- Stein G., Sabbattini P., Zaidi S.K., Braastad C.D., Montecino M., van Wijnen A.J., Choi J.Y., Stein J.L., Lian J.B., Javed A., Functional architecture of the nucleus: organizing the regulatory machinery for gene expression, replication and repair. *Trends Cell Biol*, 2003, 13, 584–592.
- Tumbar T., Belmont A.S., Interphase movements of a DNA chromosome region modulated by VP16 transcriptional activator. *Nat Cell Biol*, 2001, 3, 134–139.
- Turner B.M., Cellular memory and the histone code. *Cell*, 2002, 111, 285–291.
- van Driel R., Fransz P.F., Verschure P.J., The eukaryotic genome: a system regulated at different hierarchical levels. *J Cell Sci*, 2003, 116, 4067–4075.
- van Steensel B., Brink M., van der Meulen K., van Binnendijk E.P., Wansink D.G., de Jong L., de Kloet E.R., van Driel R., Localization of the glucocorticoid receptor in discrete clusters in the cell nucleus. *J Cell Sci*, 1995, 108, 3003–3011.
- Verschure P.J., van der Kraan I., Enserink J.M., Mone M.J., Manders E.M., van Driel R., Large-scale chromatin organization and the localization of proteins involved in gene expression in human cells. *J Histochem Cytochem*, 2002, 50, 1303–1312.
- Vourc'h C., Taruscio D., Boyle A.L., Ward D.C., Cell cycle-dependent distribution of telomeres, centromeres, and chromosome-specific subsatellite domains in the interphase nucleus of mouse lymphocytes. *Exp Cell Res*, 1993, 205, 142–151.
- Walters M.C., Magis W., Fiering S., Eidemiller J., Scalzo D., Groudine M., Martin D.I., Transcriptional enhancers act in cis to suppress position-effect variegation. *Genes Dev*, 1996, 10, 185–195.
- Wansink D.G., Schul W., van der Kraan I., van Steensel B., van Driel R., de Jong L., Fluorescent labeling of nascent RNA reveals transcription by RNA polymerase II in domains scattered throughout the nucleus. *J Cell Biol*, 1993, 122, 283–293.
- Wolffe A.P., Transcriptional regulation in the context of chromatin structure. *Essays Biochem*, 2001, 37, 45–57.