UNIVERSITÉ D'ORLÉANS

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Centre de Biophysique Moléculaire

THÈSE présentée par :

Olivier LAMIABLE

soutenue le : **3 Mars 2010**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**

Discipline : Biologie Cellulaire et moléculaire

Identification et caractérisation des partenaires protéiques de DSP1 chez *Drosophila melanogaster*.

THÈSE dirigée par :

Martine DECOVILLE	Dr, Université d'Orléans
Daniel LOCKER	Pr, Université d'Orléans

RAPPORTEURS :

Bernard MALFOY	Dr, Institut Curie
Laurent THEODORE	Pr, Université Versailles Saint Quentin en Yvelines

---

JURY :

Franck BRIGNOLAS	Professeur, Université d'Orléans, Président de jury
Véronique BLANQUET	Professeur, Université de Limoges
Martine DECOVILLE	Maître de conférences, Université d'Orléans
Daniel LOCKER	Professeur, Université d'Orléans
Bernard MALFOY	Directeur de recherche, Institut Curie
Laurent THEODORE	Professeur, Université de Versailles

Ce travail de thèse a été réalisé au Centre de Biophysique Moléculaire (CNRS-Orléans) dirigé par Jean-Claude Beloeil.

Je tiens à remercier chaleuresement Daniel Locker et Martine Decoville de m'avoir accueilli dans leur équipe et encadré tout au long de ce travail ainsi que de m'avoir prodigué leurs nombreux conseils et critiques.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance à Monsieur Bernard Malfoy, Directeur de recherche à l'Institut Curie, et à Monsieur Laurent Théodore, Professeur à l'Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.

Je tiens également à adresser mes remerciements à Madame Véronique Blanquet, Professeur à l'Université de Limoges, et à Monsieur Franck Brignolas, Professeur à l'Université d'Orléans pour avoir accepté d'être membres du jury.

Je remercie toutes les personnes de l'équipe « Epigénétique et neurotoxiques chez les insectes » : Andrée Soulas pour sa précieuse aide, Makhlouf Rabhi pour sa participation aux travaux sur DSP1 lors de son stage de master 2, Patrice Robert pour son aide technique.

Un grand merci à tous les membres du Centre de Biophysique Moléculaire particulièrement les « vieux sages » Yann Bilbille, Yann-Vai Le Bihan, François Orange et Chrystelle Derache pour les nombreux conseils, les camarades doctorants Ibai Valverde, Romy Honorine et Lucie Jaquillard pour leur bonne humeur et leur soutien tout au long de cette thèse.

Un grand merci aux doctorants moniteurs avec qui j'ai partagé de nombreuses heures de travail et de camaraderie : Mélanie Cavalheiro, Rémy Mevel, Guillaume Voisin et Bruno Lopez.

Je suis très heureux de remercier toutes les personnes qui me sont chères et qui m'ont soutenu au cours de ces quatre ans de thèse contribuant à la réalisation de ce travail dans les meilleures conditions. Je remercie plus particulièrement ma mère, Josianne Lamiable, pour son soutien moral et matériel et ses nombreuses heures passées à la relecture du manuscrit.

Je dédie cette thèse à tous ceux qui m'ont soutenu et qui m'ont permis de continuer après la disparition de mon père survenue lors de cette thèse.

Sommaire

ABREVIATIONS **6**

AVANT PROPOS **7**

INTRODUCTION **9**

I. MAINTIEN DE L'EXPRESSION DES GENES PAR LES PROTEINES DES GROUPES POLYCOMB ET TRITHORAX. **10**

A. LES GENES HOMEOTIQUES CONTROLENT L'IDENTITE DES SEGMENTS. **10**
B. MISE EN PLACE DU PROFIL D'EXPRESSION DES GENES HOMEOTIQUES **14**
C. LES GENES PCG ET TRXG MAINTIENNENT L'EXPRESSION DES GENES HOX. **16**
1. LES GENES DU GROUPE POLYCOMB. 16
2. LES GENES *TRXG*. 19
D. CARACTERISATION DES PROTEINES PCG ET TRXG **21**
1. LA CHROMATINE 21
a) Le nucléosome 21
b) Euchromatine et hétérochromatine 22
c) La variégation par effet de position 23
d) Les modificateurs de PEV. 24
e) La régulation de la structure de la chromatine. 25
2. LES PROTEINES PCG ET TRXG REMODELENT LA CHROMATINE. 26
E. LES COMPLEXES PCG ET TRXG. **29**
1. LES COMPLEXES PCG. 29
a) Le complexe PRC1 29
b) Le complexe dRAF 30
c) Le complexe PRC2 31
d) Le complexe PHORC. 31
2. LES COMPLEXES TRXG 31
a) Le complexe BRM 31
b) Le complexe TAC1 32
c) Le complexe GAF-FACT 32
d) Autres complexes TrxG 33
3. AUTRES COMPLEXES AIDANT LES PCG ET TRXG. 33
F. LES ACTIVATEURS DES POLYCOMB ET TRITHORAX. **34**
1. LE RECRUTEMENT DES PROTEINES PCG ET TRXG PAR LES ETP. 35
a) Les PRE/TRE 36
b) Le comité de recrutement des complexes PcG et TrxG. 38
c) Fixation des protéines PcG et TrxG sur le génome 41
2. CHOIX ENTRE LA REPRESSION ET L'ACTIVATION. 43
a) Marque épigénétique et recrutement des PcG et TrxG. 43
b) Le recrutement des PcG et des TrxG dépend de l'activité transcriptionnelle. 44
G. LES PROTEINES PCG/TRXG ET LES ARNS NON CODANTS **47**
1. LES PROTEINES PCG ET TRXG SONT CAPABLES DE SE LIER A L'ARN. 49
2. ARNNC DANS LE RECRUTEMENT DES PCG ET TRXG. 50
3. RNAI ET COMPARTIMENTATION NUCLEAIRE DES PCG. 51
H. GLYCOSYLATION DES PCG ET TRXG. **52**
I. MODE D'ACTION DES PCG ET TRXG. **53**
1. MODE D'ACTION DES PCG. 53

2. MAINTIEN DE L'ACTIVATION PAR LES TRXG. 56
J. MEMOIRE CELLULAIRE AU COURS DES DIVISONS. 57
1. LORS DE LA REPLICATION. 58
2. LORS DE LA MITOSE. 61
K. LES GENES CIBLES DES PROTEINES PCG ET TRXG. 61
L. EVOLUTION DES POLYCOMB ET TRITHORAX. 63
1. CONSERVATION DES PROTEINES PCG ET TRXG 63
2. LES PRE/TRE CHEZ LES VERTEBRES. 65

II. LES ROLES BIOLOGIQUES DE LA PROTEINE DSP1. 66

A. PRESENTATION DE LA PROTEINE DSP1 66
1. LA STRUCTURE PRIMAIRE DE DSP1. 66
2. LA FAMILLE DES PROTEINES HMGB. 67
3. *EXPRESSION DE LA PROTEINE DSP1* CHEZ DROSOPHILA MELANOGASTER. 70
B. LE ROLE DE LA PROTEINE DSP1 DANS LA REGULATION DES GENES. 71
1. DSP1 PARTICIPE A LA REGULATION DES GENES HOMEOTIQUES. 71
a) *dsp1* est un *ETP*. 71
b) La protéine DSP1 participe au remodelage de la chromatine. 73
c) DSP1 régule le gène *Scr* agissant comme une protéine TrxG. 73
d) DSP1 permet le recrutement des protéines du groupe PcG. 74
e) Recherche des séquences cibles de la protéine DSP1. 75
2. LES AUTRES FONCTIONS REGULEES PAR LA PROTEINE DSP1. 78
a) DSP1 régule l'expression de *knirps*. 78
b) DSP1 intervient dans la régulation des peptides antimicrobiens. 78

III. SUJET DE RECHERCHE 79

A. IDENTIFICATION DES PARTENAIRES DE LA PROTEINE DSP1. 79
B. CONTRIBUTION A L'ETUDE STRUCTURALE DE LA PROTEINE DSP1. 80

RESULTATS 81

I. PURIFICATION DES PARTENAIRES DE LA PROTEINE DSP1. 82

A. ETUDES DES PROTEINES DSP1 ETIQUETEES. 82
1. LOCALISATION DES TRANSGENES. 83
2. VERIFICATION DE L'EXPRESSION DE LA PROTEINE DSP1 SIMPLE ET DOUBLE ETIQUETEE. 86
a) Principe de l'expression de Gal4 dans la souche 4442. 86
b) La protéine simple étiquetée $DSP1^{3FLAG}$ 87
c) La protéine DSP1 double étiquetée 87
3. LA PROTEINE DSP1 DOUBLE ETIQUETEE EST CAPABLE DE SE FIXER SUR LA CHROMATINE. 88
4. LA PROTEINE DSP1 DOUBLE ETIQUETEE SE TROUVE DANS DES COMPLEXES. 89
5. MISE AU POINT DU PROTOCOLE D'IMMUNOPURIFICATION DES PROTEINES DSP1 ETIQUETEES. 91
6. CONSTRUCTION DE LIGNEES DE DROSOPHILES EXPRIMANT LES PROTEINES DSP1 ETIQUETEES DE MANIERE CONSTITUTIVE. 94
B. IMMUNOPURIFICATION A L'AIDE D'ANTICORPS ANTI-DSP1. 96
1. MISE AU POINT. 96
2. IDENTIFICATION DES PARTENAIRES PUTATIFS DE LA PROTEINE DSP1. 98
C. ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE DSP1 ET SES PARTENAIRES. 101
1. INTERACTION GENETIQUE. 101

a) Interaction entre *dsp1* et *nurf-38*. 103
b) Interaction entre *dsp1* et *HSC70-4*. 103
c) Interaction entre *dsp1* et *modulo*. 104
d) Interaction entre *dsp1* et *RpLP0*. 104
e) Interaction entre *dsp1* et *Rm62*. 104
f) Conclusion. 105
2. CARACTERISATION DES INTERACTIONS ENTRE DSP1 ET SES PARTENAIRES. 105
a) DSP1 et ses partenaires dans les complexes. 106
b) Avec la protéine Rm62. 110

II. CONTRIBUTION A L'ETUDE STRUCTURALE DE LA PROTEINE DSP1. 139

A. CLONAGE DE L'ADNC DSP1 DANS LE VECTEUR PET31B AFIN DE PRODUIRE LA PROTEINE DSP1 ETIQUETEE SIX HISTIDINES EN C-TERMINALE. 139
B. EXPRESSION DE LA PROTEINE DSP1-6 HIS. 140
C. PURIFICATION DE LA PROTEINE DSP1-6 HIS SUR UNE RESINE DE NICKEL. 141
D. PURIFICATION DE LA PROTEINE DSP1 6 HISTIDINES SUR CHROMATOGRAPHIE ECHANGEUSE D'IONS. 142
E. DIMERISATION DE LA PROTEINE DSP1. 144
1. PURIFICATION DE LA PROTEINE DSP1 6 HISTIDINES PAR TAMISAGE MOLECULAIRE. 144
2. DIFFUSION DYNAMIQUE DE LUMIERE DE LA PROTEINE DSP1-6 HIS. 146
3. OLIGOMERISATION DE LA PROTEINE DSP1. 147
F. ETUDE STRUCTURALE DE LA PROTEINE DSP1-6 HIS EN DICHROÏSME CIRCULAIRE (CD). 148
G. ETUDE DE LA STABILITE DE LA PROTEINE DSP1-6 HIS. 148

DISCUSSION 150

I. CARACTERISTIQUES DE LA PROTEINE DSP1 : IMPLICATIONS FONCTIONNELLES. 151

A. DSP1 EST SOUS FORME DIMERIQUE. 151
B. STABILITE DE LA PROTEINE DSP1. 152

II. LES PARTENAIRES DE LA PROTEINE DSP1. 155

A. LES COMPLEXES CONTENANT LA PROTEINE DSP1 EVOLUENT AU COURS DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE. 155
B. LES PARTENAIRES DE LA PROTEINE DSP1 DANS L'EMBRYON. 156
1. DSP1 ET LES PROTEINES PCG ET TRXG. 156
2. LES ETP DSP1 ET RM62 INTERAGISSENT AU SEIN D'UN COMPLEXE DANS L'EMBRYON. 159
a) Interaction entre DSP1 et Rm62. 159
b) Rm62 participe à la régulation des gènes avec les protéines Pc et trx. 160
3. CONCLUSION 161

MATERIELS ET METHODES 162

BIBLIOGRAPHIE 174

Abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

ATP : Adénosine Triphosphate

ATPase : Adénosine Triphosphatase

BSA : Bovine serum albumine

ChIP : Immunoprécipitation de la Chromatine Pontée

Da : Dalton

DNase I : Désoxyribonucléase I

DTT : Dithiothréitol

EDTA: acide éthylène diamine tétra acétique

EGTA : acide éthylène glycol- bis [β-amino-éthyléther]-N,N,N',N' tetracyclique

HA : Hemagglutinin

HAT : Histone Acétyl Transférase

HDAC : Histone Désacétylase

HEPES : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HMG : High Mobility Group

HMT : Histone Méthyl Transférase

kb : kilobase

kDa : kilo Dalton

lacZ : Bêta-Galactosidase

MDa : Méga Dalton

PBS : Phosphate Buffer Saline

PCR : Polymérase Chain Reaction

PMSF : phényl méthyl sulfonyl fluoride

PRE/TRE :Polycomb/Trithorax Response Element

rpm : rotation par minute

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

TBS : Tris Buffer Saline

TBST : Tris Buffer Saline Tween 0.5%

Tris : Tri-hydroxy méthyl-amino-méthane

Tween 20 : Polysorbate 20

UAS : Upstream Activation Sequence

Avant Propos

Dans les années 1940, Conrad Waddington introduit la notion d'épigénétique comme la branche de la biologie qui étudie les mécanismes par lesquels le génotype (la séquence d'ADN) engendre le phénotype (les caractéristiques de l'organisme). Les nombreuses découvertes sur l'ADN et la transcription font apparaître de nouveaux problèmes, ce qui amène à reconsidérer le terme « épigénétique ». Depuis les années 70, il désigne l'étude des processus de l'hérédité nucléaire non fondés sur des différences dans la séquence d'ADN. Ces nombreux processus correspondent à :

- La modification chimique de l'ADN tel que la méthylation de la cytosine.
- Les modifications des composants de la chromatine notamment des histones (code histone) et des protéines non histones.
- La transcription d'ARN non codants.

Tous ces mécanismes intercèdent dans le maintien de l'expression des gènes au cours des divisions cellulaires. Pendant le développement, des signaux moléculaires permettent la différenciation des cellules en activant et réprimant certains gènes. Malgré la disparition de ces signaux, les gènes continuent à être exprimés selon l'état déterminé auparavant. Ce phénomène, appelé mémoire cellulaire, amène à se poser une question fondamentale en biologie : comment sont maintenus les profils d'expression des gènes au cours des divisons cellulaires ?

Un modèle d'étude de la mémoire cellulaire s'est imposé chez *Drosophila melanogaster*. Les gènes homéotiques, impliqués dans l'identité des cellules le long de l'axe antéropostérieur, sont d'abord activés ou réprimés par les produits des gènes de segmentation lors de l'embryogénèse précoce. Bien que ces stimuli disparaissent, les profils d'expression des gènes homéotiques restent identiques au cours des divisions cellulaires car d'autres gènes prennent le relais : les gènes du groupe *Polycomb* (*PcG*) vont maintenir réprimés les gènes homéotiques tandis que les gènes du groupe *trithorax* (*trxG*) les maintiennent actifs. En agissant en complexes multi-protéiques, les facteurs de remodelage de la chromatine codés par les gènes *PcG* et *trxG* vont altérer l'environnement chromatinien afin de maintenir l'expression de leurs gènes cibles notamment des gènes homéotiques. Le mécanisme d'action des complexes PcG et TrxG est encore mal connu mais fait intervenir de nombreux partenaires. Il a été montré qu'ils agissent notamment sur les modifications post-traductionnelles des histones et la séquestration des complexes de remodelage de la chromatine.

Notre équipe s'intéresse au rôle biologique d'une protéine chromosomique non histone de *Drosophila melanogaster* : Dorsal Switch Protein 1 (DSP1). DSP1 est une protéine à boîtes HMG (High Mobility Group) ce qui lui confère la capacité de se fixer sur l'ADN en reconnaissant non pas des séquences spécifiques mais des structures particulières telles que l'ADN courbé. L'étude d'un mutant nul pour le gène *dsp1* (appelé *dsp1*^{1}) généré au laboratoire, a permis de révéler l'implication de DSP1 dans la régulation des gènes au cours du développement embryonnaire. Il a été montré que la protéine DSP1 régule les gènes homéotiques en agissant, selon le locus considéré, en synergie avec les protéines TrxG ou PcG. Le mode d'action des PcG et TrxG suggère que DSP1 est probablement associée à un ou plusieurs complexes protéiques. Jusqu'à maintenant, la protéine DSP1 n'a été mise en évidence dans aucun complexe connu alors que celle-ci est présente, dans l'embryon, dans des complexes multimériques de taille comprise entre 100 kDa et 1MDa. L'objectif du travail de thèse présenté ici est de mieux comprendre le mode d'action moléculaire de la protéine DSP1 en déterminant les partenaires de la protéine DSP1 au cours du développement embryonnaire. Dans ce but, nous avons, dans un premier temps, mis en place au laboratoire des techniques d'immunopurification des complexes contenant la protéine DSP1. Ces approches nous ont permis d'identifier les partenaires de DSP1 au cours du développement embryonnaire. Dans un deuxième temps, nous avons caractérisé les relations biologiques entre DSP1 et un certain nombre de partenaires plus particulièrement la protéine Rm62. Enfin, le mode d'action de la protéine DSP1 étant peu connu, nous avons déterminé, par une approche biochimique, de nouvelles caractéristiques physico-chimiques de la protéine DSP1.

INTRODUCTION

I. Maintien de l'expression des gènes par les protéines des groupes Polycomb et Trithorax.

A. Les gènes homéotiques contrôlent l'identité des segments.

Le corps de la drosophile est composé de segments ou métamères. Mise en place au cours de l'embryogénèse, l'identité des segments, conservée de la larve jusqu'à l'adulte survivant aux différentes mues et à une métamorphose, est déterminée par les gènes homéotiques (ou gènes *Hox*). Une mauvaise expression de ces gènes change l'identité d'un ou plusieurs segments sans altérer leur nombre provoquant une transformation homéotique (Lewis, 1978). Les mutations dans un gène homéotique produisent une homéose, c'est-à-dire l'apparition d'un organe bien formé, mais à un mauvais emplacement du corps (exemple Figure 1).

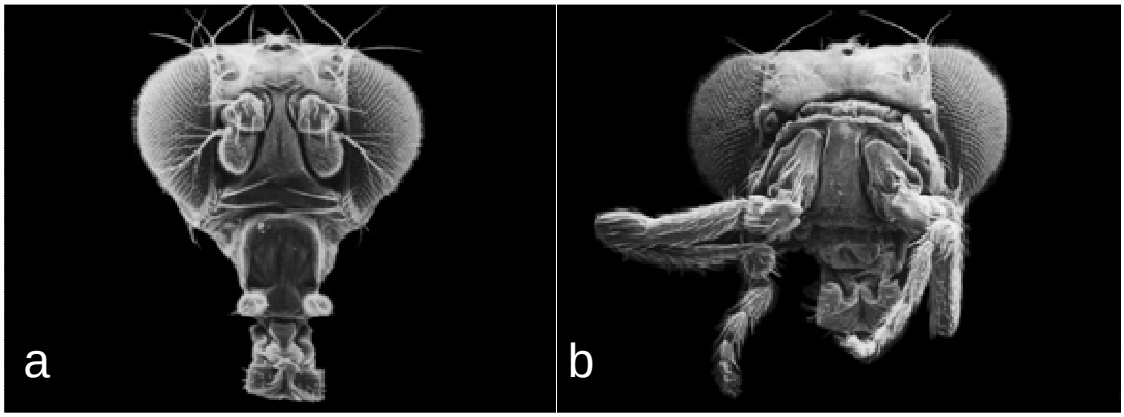


Figure 1: ***Exemple d'une transformation homéotique****. Tête de drosophile sauvage (a) et mutante pour le gène homéotique Antennapedia (b) qui a développé à la place des antennes des pattes. Ces images de microscopie électronique provenant du site The Interactive Fly ont été prises par le Dr. Rudi Turner.*

Chez *Drosophila melanogaster*, les premières transformations homéotiques identifiées dans les années 1910 furent des drosophiles ayant leur segment T3 transformé en segment T2 c'est-à-dire les haltères (appelées aussi balancier, elles servent au maintien de l'équilibre lors du vol) transformées en ailes. La mutation létale à l'état homozygote et portée par ces mutants a été appelée *bithorax* (*bx*). Une autre mutation ayant le même phénotype fut appelée *bithoraxoid* (*bxd*). La complémentation entre *bx* et *bxd* indiquait qu'il s'agissait de deux « gènes » différents. Après la seconde guerre mondiale, E.B Lewis reprit l'étude de ces mutations. Par des études génétiques, il identifia un certain nombre de nouvelles mutations

ayant des phénotypes similaires à *bx* et affectant le thorax et l'abdomen telles que la mutation *Ultrabithorax* (*Ubx*) ou les mutations *infra-abdominal* (*iab*) numérotées de 2 à 9. Les travaux de Lewis posèrent la base des études sur les gènes homéotiques chez la drosophile (pour revue voir Lewis, 1998). D'une part, Lewis a montré, en établissant la carte génétique de mutants homéotiques, que ces mutations étaient toutes localisées sur le fragment du chromosome 3 et formaient un complexe de gènes, qu'il a appelé complexe Bithorax (Bx-C). Il a identifié que ces gènes codent des produits responsables de l'identité des segments abdominaux et thoraciques. D'autre part, il a découvert que l'ordre des gènes homéotiques du complexe Bx-C sur le chromosome 3 correspond à l'ordre dans lequel ils sont activés le long de l'axe antéropostérieur du corps (Figure 2). Il définit la règle de la colinéarité. Ainsi, les gènes situés en 3' sur le chromosome s'expriment les premiers dans la région antérieure. A l'inverse, les gènes situés en 5' s'expriment dans les régions les plus postérieures de l'embryon. Génétiquement, une mutation perte de fonction pour un gène homéotique entraîne l'antériorisation des segments, alors qu'une mutation gain de fonction entraîne la postériorisation des segments. De plus, ces gènes sont exprimés de façon additive.

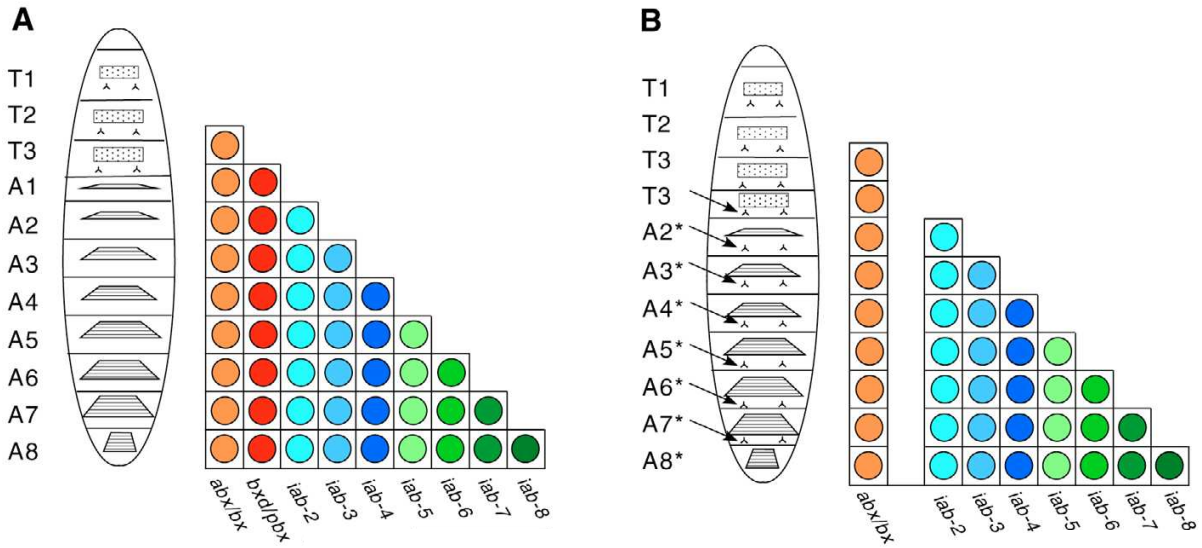


Figure 2 : ***Modèle d'expression des « gènes » du complexe Bithorax dans la larve par Lewis****. Le diagramme à coté des larves représente l'expression des « gènes » requis afin de déterminer l'identité des segments. (A) Larve sauvage. (B) larve portant les mutations bxd/pbx (bithoraxoid et postbithorax) nécessaires à la spécification du segment A1. Ces larves présentent des segments A1 transformés en T3. De plus, les creux ventraux (caratéristiques des segments thoraciques/signalés par une flèche) sont présents sur tous les segments posterieurs indiquant que la fonction de bxd/pbx est requise dans les segments posterieurs (astérisque) Extrait de Maeda et Karch, (2006).*

L'analyse moléculaire des gènes homéotiques a confirmé les résultats génétiques obtenus par Lewis. Les gènes *Hox*, codant des facteurs de transcription à homéodomaine, s'organisent en deux complexes distincts s'étendant sur plus de 300 kb chacun sur le bras R du chromosome 3: le complexe Antennapedia (Antp-C) et le complexe Bx-C (McGinnis et Krumlauf, 1992) (Figure 3).

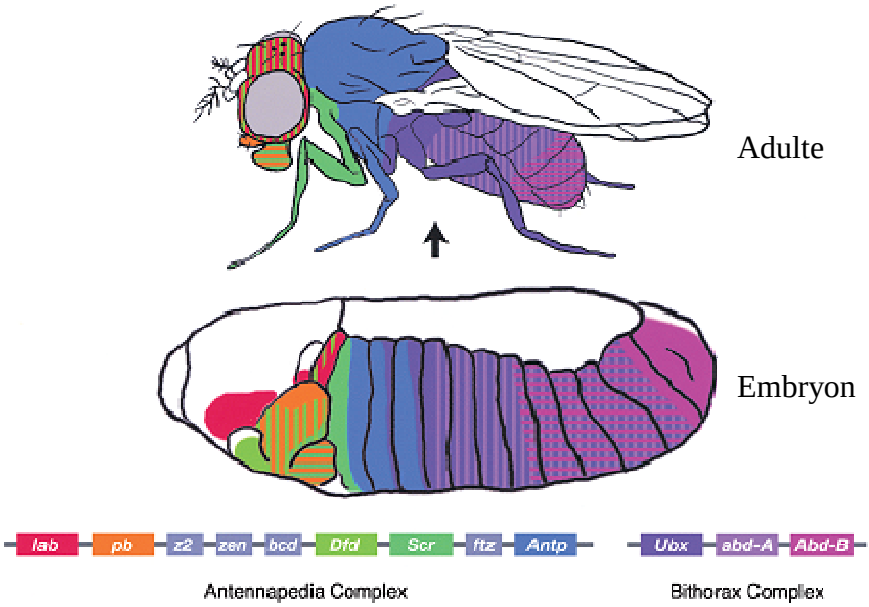


Figure 3. ***Les gènes homéotiques chez Drosophila melanogaster****. Chez la drosophile, les gènes homéotiques sont séparés en deux complexes distincts : le complexe Antennapedia et le complexe Bithorax. La figure montre l'expression des gènes homéotiques dans l'embryon et l'adulte. labial* (*lab*)*, proboscipedia* (*pb*)*, Deformed* (*Dfd*)*, Sex combs reduced* (*Scr*) et *Antennapedia* (*Antp*)*, Ultrabithorax* (*Ubx*)*, abdominal-A* (*abd-A*) et *Abdominal-B* (*Abd-B*)*. A noter que les gènes zerknullt-related (z2), zerknullt (zen), bicoïd (bcd) et fushi tarazu (ftz) sont présents dans le complexe Antennapedia mais ils ne sont pas classés parmi les gènes homéotiques. Figure extraite de Hughes et Kaufman, (2002).*

Le complexe Bithorax sur lequel porte les travaux de Lewis est composé de trois gènes : *Ultrabithorax* (*Ubx*), *abdominal-A* (*abd-A*) et *Abdominal-B* (*Abd-B*). Ceux-ci déterminent l'identité du troisième segment thoracique et des segments abdominaux. Chaque gène homéotique s'exprime dans une région précise de l'embryon selon la règle de colinéarité (Duboule et Morata, 1994). Les gènes homéotiques ont des séquences de régulation complexes permettant d'exprimer ces gènes de manière différente dans chaque segment (Maeda et Karch, 2006) (Figure 4).

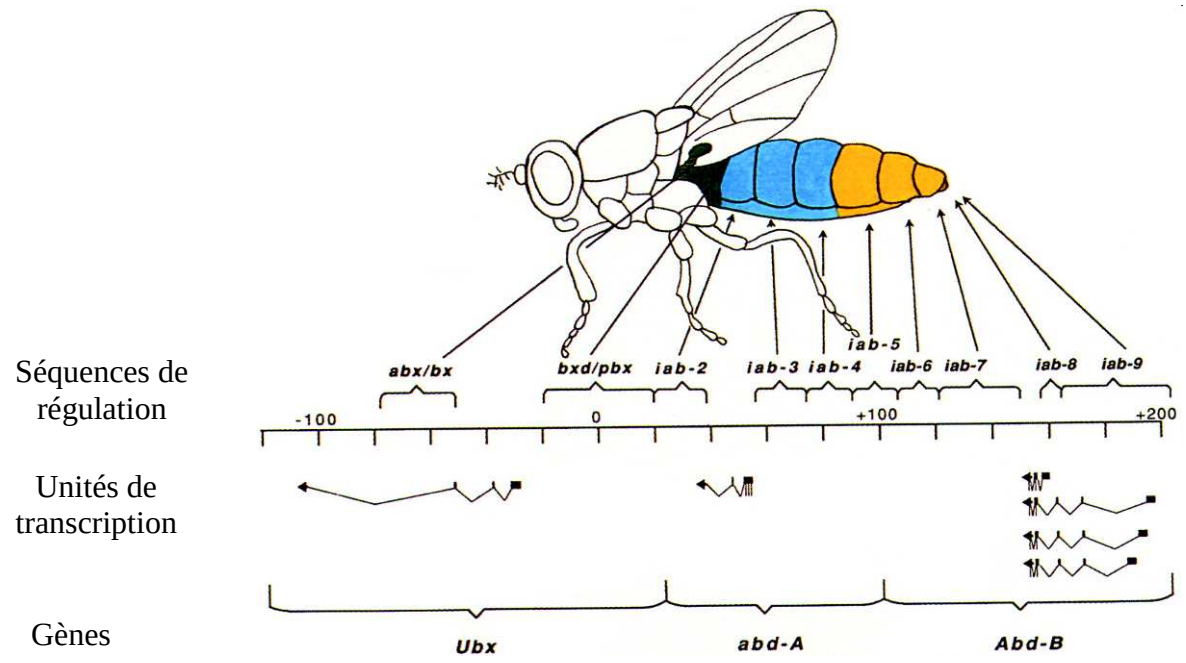


Figure 4. ***Schéma montrant l'organisation du complexe Bithorax (Bx-C)****. Sous le dessin de la drosophile sont indiquées les unités de transcription et les séquences de régulation du complexe Bx-C (représenté par une échelle). Sur la drosophile, les segments colorés sont contrôlés par les gènes Ultrabithorax (Ubx en noir), addominal-A (abd-A en bleu) et abdominal-B (abd-B en jaune). Au dessus de l'échelle, les séquences régulatrices mises en évidence par des expériences génétiques sont représentées par des accolades: abx (anterobithorax), bx (bithorax), bxd (bithoraxoïd), pbx (postbithorax), iab (infra-abdominal). Extrait de Duncan et Montgomery, (2002).*

Les régions régulatrices du complexes Bx-C sont des unités autonomes qui ont été d'abord identifiées génétiquement par Lewis. Elles sont au nombre de neuf : *abx*/*bx*, *bxd*/*pbx* et *iab 2* à *iab 9*. Chacune d'entre elles définit l'identité d'un parasegment (au nombre de 14, les parasegments sont des compartiments génétiques qui définissent la segmentation de l'embryon) en activant spécifiquement l'un des gènes homéotiques du complexe Bx-C. Par exemple, les régions *abd/bx* et *bxd/pbx* régulent l'expression du gène *Ubx* dans les parasegments 5 et 6 correspondant respectivement aux segments thoracique T3 et abdominal A1 (Beachy *et al*., 1985; Little *et al*., 1990; White et Wilcox, 1985b). De la même manière, *iab 2*, *iab 3* et *iab 4* permettent l'expression du gène *abd-A* dans les parasegments 7, 8 et 9 correspondant aux segments A2 à A4 (Karch *et al*., 1990; Macias *et al*., 1990; Sánchez-Herrero, 1991). Une mutation dans un de ces éléments de régulation altère l'expression de leur gène cible et change l'identité des segments. Par exemple, les drosophiles homozygotes pour la mutation *iab* 7^{Sz} ont leur segment A7 transformé en segment A6 (Galloni *et al*., 1993).

Le complexe Antennapedia (Antp-C) est constitué de cinq gènes homéotiques : *labial* (*lab*), *proboscipedia* (*pb*), *Deformed* (*Dfd*), *Sex combs reduced* (*Scr*) et *Antennapedia* (*Antp*) (Kaufman *et al*., 1990) (Figure 3). Ces gènes déterminent les différentes structures de la tête et du thorax. Cependant d'autres gènes tels que *bicoïd* (*bcd*) ou *fushi tarazu* (*ftz*) sont localisés dans ce complexe mais ils ne sont pas exprimés de la même façon que les gènes homéotiques. Bien qu'ils ne jouent pas le rôle de gènes homéotiques chez la drosophile, il semble qu'ils aient des fonctions de gènes Hox chez d'autres arthropodes tels que les mites (Gibson, 2000). La régulation du complexe Antp-C a été beaucoup moins étudiée que celle du complexe Bx-C. Néanmoins, certaines études ont permis de définir quelques zones de régulation comme pour le gène *Scr* (Gindhart *et al*., 1995).

B. Mise en place du profil d'expression des gènes homéotiques

Au cours de l'embryogénèse précoce, un ensemble de morphogènes (un morphogène est une substance dont le gradient de concentration va déterminer le positionnement et l'identité des cellules lors de la morphogènese (Wolpert, 1999)) agissant de manière hiérarchique va établir les profils d'expression des gènes homéotiques (pour revue Lawrence, 1992) (Figure 5). Les premiers facteurs intervenant dans cette cascade sont les produits d'origine maternelle déposés dans l'œuf. Les ARN messagers des gènes maternels *bicoïd, nanos*, *hunchback (hb)* et *caudal (cad)* définissent la polarité embryonnaire. Une fois traduits, ces facteurs de transcription initient l'expression de morphogènes d'origine zygotique codés par les gènes lacunaires (*Gap* gene). Les mutations perte de fonction de l'un de ces gènes provoquent la disparition de segments contigus faisant apparaître une lacune dans la morphologie de l'embryon. Les gènes *hb, cad* zygotiques et les gènes *giant, Krüppel* et *knirps* sont exprimés sous la forme de large domaine d'expression le long de l'axe antéropostérieur. Ils délimitent des frontières déterminant les grandes régions du corps. L'expression des gènes lacunaires guide l'expression d'une troisième classe de gènes : les gènes de parité de segment. Ces gènes déterminent le nombre exact de parasegments. Les gènes de parité de segments définissent les frontières des parasegments et ils sont exprimés sous la forme de 7 bandes transversales en raies successives le long de l'embryon. L'expression du gène *evenskipped* (*eve*) définit les parasegments impairs tandis que le produit du gène *fushi tarazu* (*ftz*) définit les parasegments pairs. En réponse aux activités des facteurs de transcription codés par les gènes de parité de segments, les gènes de polarité de segments affinent et stabilisent les frontières de chaque parasegment.

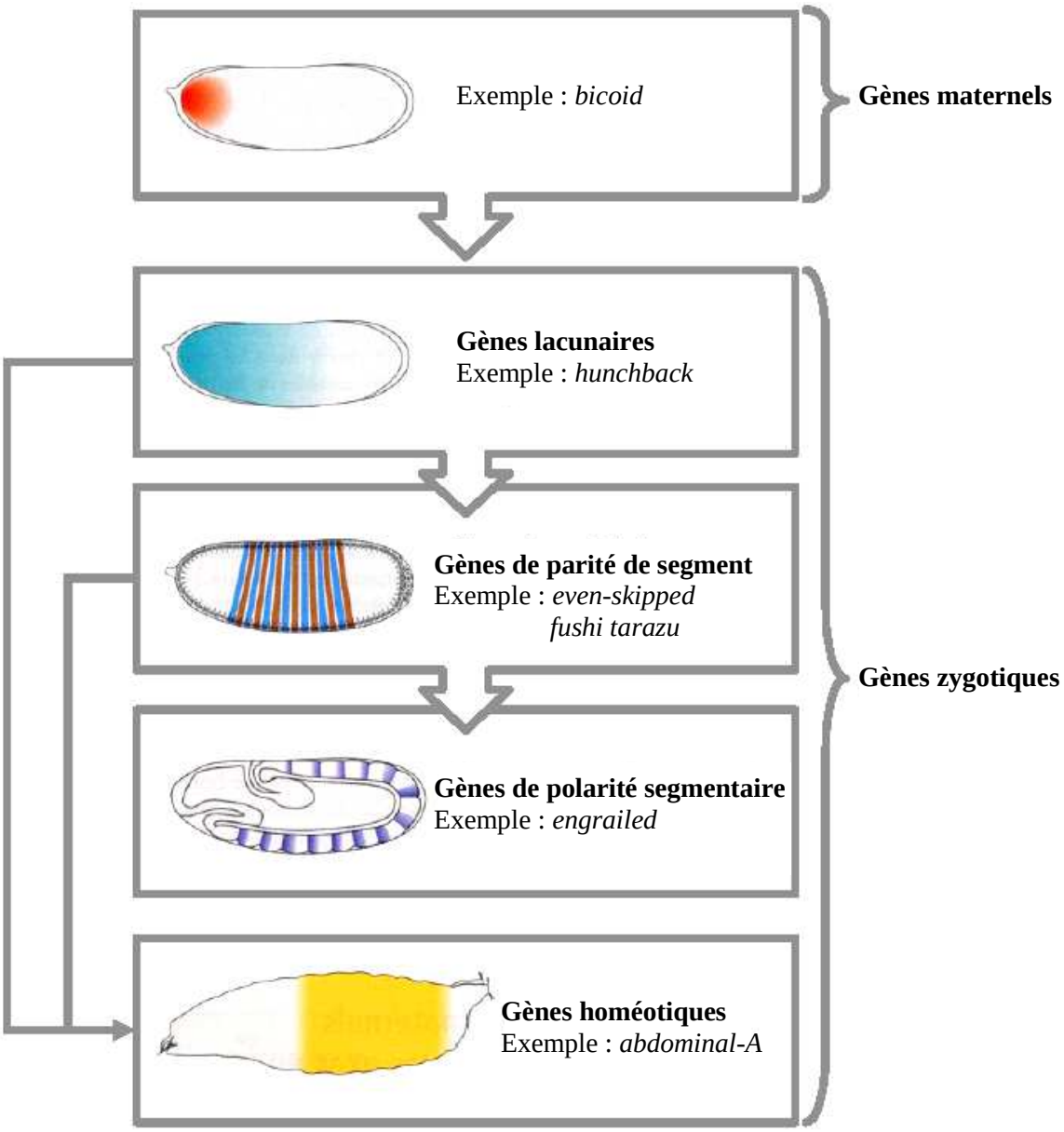


Figure 5 ***: Cascade de régulation des gènes de segmentation de l'axe antéropostérieur chez Drosophila melanogaster****. Chaque gène de cette cascade exprimé de manière régionalisée permet la segmentation du corps de la drosophile. Les produits maternels déposés dans l'œuf activent ou répriment l'expression des gènes lacunaires. Les produits des gènes lacunaires régulent l'expression des gènes de parité de segments. A leur tour, les produits des gènes de parité de segments mettent en place le profil d'expression des gènes de polarité de segments. Ce système permet de segmenter l'embryon de drosophile. En fin de cascade, l'expression des gènes homéotiques est contrôlée par les produits des gènes lacunaires et de parité de segments. Extrait de Wolpert, (1999).*

Les gènes de polarité de segments tels qu'*engrailed* (*en*) ou *wingless* (*wg*) vont permettre d'établir un plan d'organisation selon des territoires physiques appelés segments. Dans le même temps, les produits des gènes lacunaires et des gènes parité de segments établissent les domaines d'expression des gènes homéotiques (Figure 3). Mais l'expression des gènes lacunaires et des gènes de parité de segments est transitoire au cours du développement. Alors qu'après quatre heures de développement, les produits de ces gènes disparaissent, les gènes homéotiques continuent d'être exprimés pendant la vie larvaire et pupale. (White et Wilcox, 1985a; Brower, 1987). L'intervention des produits des gènes des groupes *Polycomb* (*PcG*) et *trithorax* (*trxG*) va permettre de maintenir l'expression des gènes homéotiques en prenant le relais des gènes de segmentation précoce. Les gènes des groupes *Polycomb* maintiennent les gènes *Hox* dans un état réprimé tandis que les gènes des groupes *trxG* maintiennent l'état activé des gènes homéotiques.

C. Les gènes PcG et trxG *maintiennent l'expression des gènes Hox.*

1. Les gènes du groupe Polycomb.

Les premiers gènes identifiés comme régulant les gènes homéotiques ont été les gènes de type *PcG*. Dans les années 40, E.H. Slifer a trouvé des drosophiles mâles ayant des peignes sexuels supplémentaires sur les pattes T2 et T3 où les peignes sexuels sont absents chez les drosophiles sauvages. Désignant ce phénotype par le terme « extra sex combs », elle a isolé la première mutation de type *PcG* dans le gène du même nom *extra sex combs* (*esc*) (Slifer, 1942). Quelques années plus tard, un second mutant ayant des peignes sexuels supplémentaires était identifié par P. Lewis : le mutant *Polycomb* (*Pc*) (Lewis, 1947). Par la suite, d'autres études ont permis d'isoler des mutations dominantes ou récessives induisant un phénotype similaire (Jurgens, 1985; Paro, 1990). L'ensemble des gènes mutés en dehors des complexes homéotiques Antennapedia et Bithorax et présentant un phénotype similaire aux mutants *esc* et *Pc* constitue le groupe des gènes *Polycomb* (Figure 6).

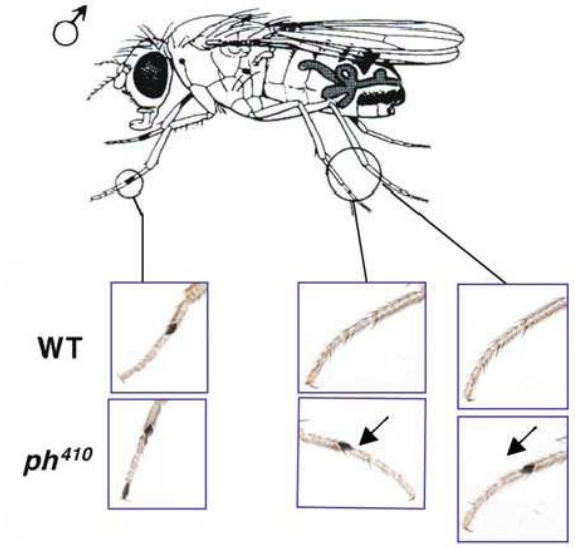


Figure 6 : ***Pattes de drosophiles mâles sauvage et mutant hémizygote pour le gène PcG Polyhomeotic (Ph)****. La présence de peigne sexuel additionnel sur la seconde et la troisième patte est indiquée par une flèche. Ce phénotype est corrélé à une mauvaise expression du gène Scr. Extrait de Grimaud et al., (2006).*

Des analyses de mutants perte de fonction des gènes *PcG* ont montré qu'ils présentaient d'autres phénotypes. Les drosophiles homozygotes pour une mutation dans le gène *Pc* meurent lors de l'embryogénèse. E.B Lewis a montré que ces embryons présentent un phénotype extrême où tous les segments se sont transformés en dernier segment abdominal A8 (Lewis, 1978). Ce phénotype est caractéristique d'un mutant gain de fonction des gènes homéotiques. En se basant sur ces observations, il proposait un modèle où les protéines PcG répriment l'expression des gènes homéotiques. Les mutations dans les gènes *PcG* provoquent des transformations homéotiques dues à l'expression ectopique des gènes des complexes Bx-C et Antp-C ressemblant à des mutants gain de fonction des gènes des complexes Bx-C et Antp-C. En étudiant le profil d'expression des gènes homéotiques dans les mutants perte de fonction des gènes *PcG*, il a été montré que les protéines PcG n'ont pas d'effet sur le profil d'expression initial des gènes *Hox* mais qu'elles affectent ces profils plus tardivement au cours de l'embryogénèse (McKeon et Brock, 1991; Simon *et al*., 1992; Struhl et Akam, 1985). Les produits des gènes *PcG* n'induisent pas l'expression des gènes homéotiques mais ils maintiennent à l'état réprimé les gènes homéotiques au cours du développement embryonnaire. Aujourd'hui, une vingtaine de gènes *PcG* ont été identifiés (Tableau 1).

Tableau 1 : ***Liste des gènes PcG, de leurs protéines ainsi que de leurs activités biochimiques chez Drosophila melanogaster.***

Gènes	Protéines	Domaines Protéiques	Activités Biochimiques	Références
Additionnal sex combs	ASX	Domaine PHD		(Jurgens, 1985)
Cramped	CRM	Domaine PEST		(Yamamoto *et al*., 1997)
dKDM2 (CG11033)	dKDM2	Doigt de zinc, domaine PHD	Déméthyle H3K36	(Lagarou *et al*., 2008)
dMi-2	dMi-2	Chromodomaine		(Kehle *et al*., 1998)
Enhancers of Polycomb	E(Pc)	Leucine Zipper		(Sato *et al*., 1983)
Enhancers of Zeste	E(Z)	Domaine SET	Méthyle H3K9 et H3K27	(Jones et Gelbart, 1990)
Extra Sex Combs	ESC	Répétition WD40	Liaison avec l'histone H3	(Struhl, 1981)
ESC-Like	ESCL	Répétition WD40		(Wang *et al*., 2006)
Heat Shock Protein Cognate 4	HSC70-4		Proteine Chaperonne	(Mollaaghababa *et al*., 2001)
Multi sex combs				(Santamaría et Randsholt, 1995)
Pleihomeotic	Pho	Doigt de zinc	Liaison à l'ADN	(Simon *et al*., 1992)
Pleiohomeotic like	PhoL	Doigt de zinc	Liaison à l'ADN	(Brown *et al*., 2003)
Polycomb	Pc	Chromodomaine	Liaison à H3K27me3	(Lewis, 1978)
Polycomb-like	PCL	domaine RING, domaine PHD		(Duncan, 1982)
Polyhomeotic Distal	PHD	domaine SAM		(Dura *et al*., 1985)
Polyhomeotic Proximal	PHP	domaine SAM		(Dura *et al*., 1985)
Posterior sex combs	PSC	Doigt RING	Cofacteur de dRING	(Jurgens, 1985)
Scm-related gene containing four mbt domains	SFMBT	Répétition MBT, domaine SAM	Liaison à H3K9me1/2 et H4K20me1/2	(Klymenko *et al*., 2006)
Sex Combs Extra/dRing	dRING	Doigt RING	Ubiquitinilation de H2AK119	(Breen et Duncan, 1986)
Sex Comb on Midleg	SCM	Répétition MBT, domaine SAM	Liaison aux histones methylés	(Jurgens, 1985)
Sir2	SIR2			(Furuyama *et al*., 2004)
RPD3			Déacétylation des histones	(Tie *et al*., 2001)
Supressor of zeste 2	Su(z)2	Doigt RING		(Jurgens, 1985)
Supressor of zeste 12	Su(z)12	Doigt de zinc	Cofacteur de E(Z)	(Birve *et al*., 2001)

2. Les gènes *trxG*.

Les gènes régulant positivement les gènes homéotiques sont appelés les gènes *trxG*. Le gène *trithorax* (*trx*) a été le premier gène identifié du groupe auquel il donne son nom. Les mutants homozygotes pour l'allèle perte de fonction trx^1 présentent un phénotype caractéristique des premières mutations homéotiques identifiées: les haltères sont transformées en ailes (Ingham, 1998) (Figure 7). Ce phénotype correspond à une diminution de l'expression du gène homéotique *Ubx*. En effet, l'expression des gènes homéotiques est grandement réduite dans les mutant *trx* (Mazo *et al*., 1990; Breen et Harte, 1993).

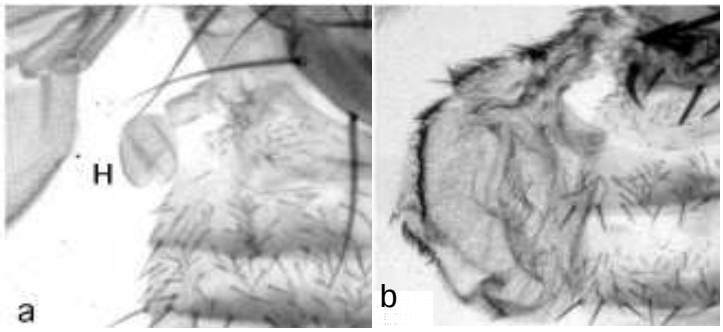


Figure 7 : ***Exemple d'une transformation homéotique d'haltères en ailes due à une mutation dans le gène trx.*** *(a) Haltères (H) de drosophile sauvage et (b) mutante homozygote pour l'allèle trithorax*[1]*. Chez les mutants trx*[1]*, on observe des haltères transformées en ailes. Ce phénotype est dû à une mauvaise expression du gène homéotique Ultrabithorax (Ubx). Extrait d'Ingham, (1998).*

Les produits des gènes *trxG* maintiennent active la transcription dans les gènes homéotiques. Actuellement, une vingtaine de gènes sont classés comme membres du groupe *trxG* (Tableau 2). Plusieurs critères ont permis d'identifier les gènes *trxG*

- Premièrement, les mutants perte de fonction des *trxG* montrent des transformations de segments dont l'identité est changée en segment plus antérieur. Les mutations dans les gènes *trxG* provoquent des transformations homéotiques similaires à des mutants perte de fonction des gènes Bx-C et Antp-C dues à un défaut dans le maintien de l'expression de ces gènes.
- Dans un second temps, certains gènes *trxG* ont été identifiés par des interactions génétiques avec le mutant *trithorax*. Ces doubles mutants présentaient des phénotypes où les transformations homéotiques sont aggravées par rapport au mutant simple. Par exemple, si on combine des mutations dans les gènes *absent, small, or homeotic discs 1* (*ash1*) *et ash2* avec la mutation *trx*, on observe une augmentation de la force et de la fréquence des transformations haltères en ailes (Shearn, 1989).

- D'autres membres du groupe *trxG* ont été identifiés par leur effet antagoniste vis-à-vis des mutants *PcG*. Les allèles perte de fonction des gènes *trxG* suppriment l'apparition de peignes sexuels supplémentaires due à la mutation perte de fonction *Pc*. C'est le cas du gène *brahma* (*brm*) (Kennison et Tamkun, 1988).
- Toutes les mutations perte de fonction *trxG* réduisent l'expression des gènes homéotiques.

Tableau 2 : ***Liste des gènes trxG, de leurs protéines et de leurs activités biochimiques chez Drosophila melanogaster***.

Gènes	Protéines	Domaines Protéiques	Activités Biochimiques	Références
Absent, small, or homeotic discs 1 (ash1)	ASH1	Domaine SET	Méthyle histone H3	(Shearn, 1989)
Absent, small, or homeotic discs 2 (ash2)	ASH2	Domaine PHD	-	(Shearn, 1989)
brahma (brm)	BRM	Bromodomaine, domaine ATPase	Déplace le nucléosome	(Kennison et Tamkun, 1988)
nejire (nej)	CBP	Bromodomaine, Doigt de zinc	Transfère de groupement acétyle sur les histones	(Bantignies *et al*., 2000)
devenir/breathless (dev/btl)	Dev/Btl	-	-	(Maixner *et al*., 1998)
kismet (kis)	Kis	chromodomaine, Domaine ATPase	-	(Daubresse *et al*., 1999)
kohtalo (kto)	Kto	-	Sous unité du complexe MEDIATOR	(Kennison et Tamkun, 1988)
little imaginal disc (lid)	Lid	Domaine ARID, Doigt RING, domaine PHD	Déméthyle H3K27, inhibe les histones déacétylase	(Gildea *et al*., 2000)
moira (mor)	MOR	Domaine SANT, leucine zipper		(Kennison et Tamkun, 1988)
osa	OSA	domaine ARID		(Kennison et Tamkun, 1988)
sallimus (sls)	-			(Kennison et Tamkun, 1988)
SBF1	SBF1		Antiphosphatase	(Petruk et al., 2001)
skuld (skd)	Skd		Sous unité du complexe MEDIATOR	(Kennison et Tamkun, 1988)
Snf5 related 1 (snr1)	SNR1			(Dingwall *et al*., 1995)
taranis (tara)	TARA	Domaine SERTA	-	(Calgaro *et al*., 2002)
tonalli (tna)	TNA	Doigt RING, doigt de zinc.	-	(Gutiérrez *et al*., 2003)
trithorax (trx)	TRX	Domaine SET, Domaine PHD	Méthyle H3K4	(Ingham, 1985)
trithorax-like	Trl/GAF	Domaine BTB-POZ		(Farkas et al., 1994)
urdur (urd)	-	-	-	(Kennison et Tamkun, 1988)
verthandi (vtd)	Rad21	Cohesin, Rad21/Rec8 like protein	-	(Kennison et Tamkun, 1988)
zeste (z)	Z		-	(Shannon et al., 1972)

D. Caractérisation des protéines PcG et TrxG

Par des expériences génétiques, les gènes *PcG* et *trxG* ont été identifiés comme régulant les gènes *Hox*. Afin de préciser les fonctions des gènes *PcG* et *trxG*, il a été nécessaire de s'intéresser aux produits de ces gènes, les protéines PcG et TrxG. Par des expériences d'immunolocalisation, les protéines Pc et Trx ont été retrouvées au niveau du noyau. De plus, la localisation des protéines Pc et Trx sur les chromosomes polyténiques de glandes salivaires de larves de 3ème stade au niveau des complexes Bx-C et Antp-C a confirmé que les produits des gènes *Pc* et *trx* régulent directement et physiquement les gènes *Hox* (Zink et Paro, 1989; Zink *et al*., 1991; Kuzin *et al*., 1994). Ces expériences ont montré que les protéines PcG et TrxG interagissent avec les chromosomes dont la structure de base est la chromatine.

1. La chromatine

Chez les organismes eucaryotes, la taille du génome est importante. Par exemple, une cellule humaine possède environ 2 m d'ADN (6,6 x 10^9 pb) contenu dans un noyau de 6 µm de diamètre. C'est pourquoi l'ADN est condensé dans une structure appelée chromatine. La chromatine a deux fonctions essentielles :

1. Elle permet à l'ADN de tenir dans le noyau.
2. Elle participe à la régulation des gènes notamment à la transcription.

a) Le nucléosome

Le nucléosome est la structure fondamentale de la chromatine (Figure 8). Il est composé de protéines appelées histones autour desquelles 147 paires de bases de l'ADN vont s'enrouler. Les histones présentes par paire dans le nucléosome sont les protéines H2A, H2B, H3 et H4 qui se regroupent pour former un octamère. Les histones sont des protéines basiques de petite taille (entre 11 et 28 kDa). Elles sont constituées d'un domaine globulaire impliqué dans les interactions avec l'ADN. Leur extrémité N-terminale flexible, appelée queue des histones, interagit avec des protéines régulatrices et l'ADN (Luger *et al*., 1997). L'assemblage de la chromatine comprend plusieurs étapes. La première est l'assemblage du nucléosome. Une histone H3 s'associe avec une histone H4 pour former un dimère (H3-H4). Deux dimères (H3-H4) s'assemblent et forment un tétramère $(H3\text{-}H4)_2$. L'ADN va se lier avec celui-ci formant un complexe stable. Parallèlement, les histones H2A et H2B s'associent en dimère. Ensuite le tétramère $(H3\text{-}H4)_2$ s'associe à deux dimères (H2A-H2B). L'ADN s'enroule autour de cet octamère pour former un nucléosome de 11 nm de diamètre. Un cinquième type de

protéines, l'histone H1, vient s'insérer dans l'ADN entre les nucléosomes. Celle-ci joue un rôle dans la compaction de la chromatine notamment en stabilisant la structure en hélice de 30 nm de diamètre appelée solénoïde. La chromatine peut adopter des niveaux d'organisation plus compacts, le niveau de condensation le plus élevé étant atteint au sein du chromosome lors de la mitose.



Figure 8 : ***Structure tridimensionnelle du nucléosome****. La figure montre que l'ADN (en brun et turquoise) s'enroule autour des quatres dimères composés des histones H2A (jaunes), H2B (rouge), H3 (bleu) et H4 (vert) et situés au centre de la structure. Le nucléosome est vu de face à gauche et de profil à droite. Extrait de Luger et al., (1997).*

b) Euchromatine et hétérochromatine

L'observation des noyaux des cellules eucaryotes révèle deux types d'organisation de la chromatine (Passarge, 1979). La première appelée hétérochromatine reste très foncée et très condensée pendant l'interphase. Chez la drosophile, l'hétérochromatine contient 30% du génome et elle est principalement localisée au niveau des centromères et des télomères (Gatti et Pimpinelli, 1992). Cette structure, condensée avec un arrangement de nucléosomes régulier où l'ADN est peu accessible (Sun *et al*., 2001), est composée principalement de séquences non codantes et contient peu de gènes. La seconde organisation, nommée euchromatine, est la portion chromatinienne plus claire et plus diffuse pendant l'interphase. Elle est composée de

séquences d'ADN uniques où se trouve la majorité des gènes. L'arrangement des nucléosomes est irrégulier ce qui permet à la machinerie transcriptionnelle d'accéder à l'ADN. L'essentiel de la transcription se déroule dans l'euchromatine. Par des expériences de digestion de la chromatine par différentes nucléases (notamment la DNase I), il a été montré que les régions promotrices des gènes activement transcrits présentaient des sites d'hypersensibilité à la DNase I (Elgin, 1988). Ces résultats indiquent que la transcription est couplée avec une déplétion en nucléosomes impliquant une structure de la chromatine ouverte. A l'inverse, l'hétérochromatine possède peu de sites d'hypersensibilité à la DNase I car sa structure condensée laisse l'ADN peu accessible.

c) La variégation par effet de position

La structure de la chromatine est un des éléments de la régulation de la transcription des gènes. L'un des premiers arguments en faveur d'une influence de la structure chromatienne sur l'expression du génome fut donné par H. Muller. Dans les années 1930, il décrit le phénomène de variégation par effet de position (PEV) (Figure 9). En travaillant sur les effets des rayons X sur les drosophiles, il isole un mutant du gène *white* (*w*). Le gène *w* contrôle la pigmentation de l'œil. Normalement rouge, l'œil devient blanc lorsque le gène *w* est muté. Mais le mutant obtenu par Muller présente un œil bigarré rouge et blanc. Plus tard, les analyses de ce mutant ont montré que les rayons X avaient provoqué une inversion sur le chromosome X. Le locus du gène *w* situé dans l'euchromatine s'est retrouvé près d'une région d'hétérochromatine. Il en résulte que le gène *w* est réprimé ou activé selon que l'hétérochromatine s'étend ou non jusqu'à ce locus. Dans les cellules des facettes de couleur blanche, le gène *w* est réprimé tandis qu'il est activé dans les cellules des facettes de couleur rouge. Le phénotype observé n'est pas dû à une mutation dans le gène *w* mais à un changement de position du locus *w* près de l'hétérochromatine. Le phénomène de PEV résulte de la transmission d'une structure hétérochromatinienne à un gène euchromatique. L'étude de ce phénomène a permis de mieux comprendre la régulation des gènes par la structure de la chromatine notamment grâce à la recherche de gènes pouvant influencer le phénomène de PEV.

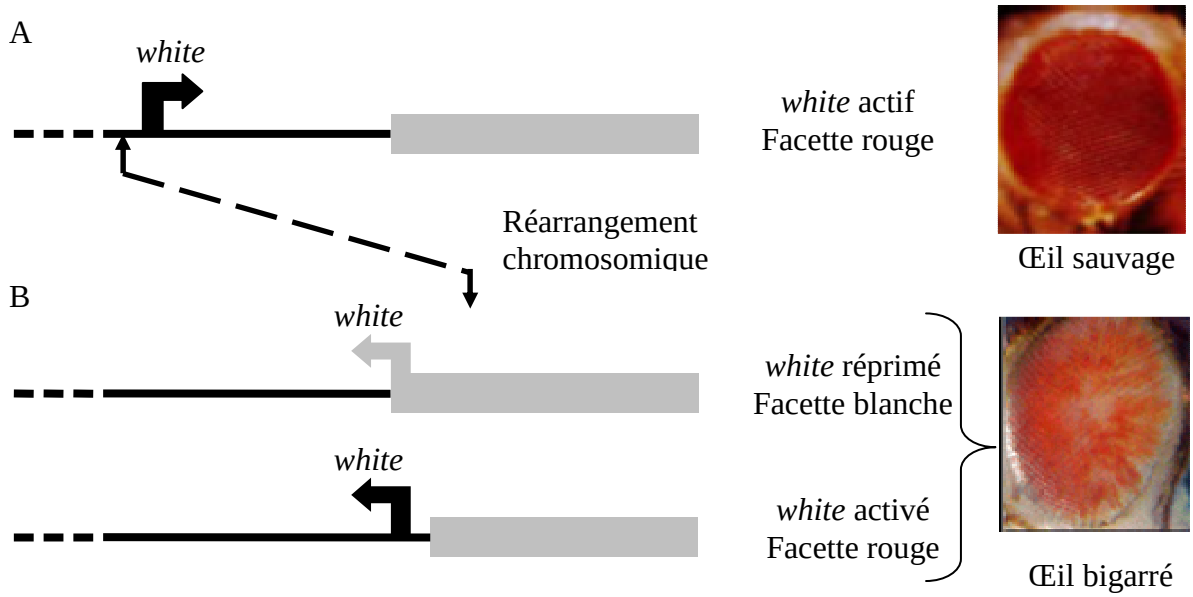


Figure 9. ***Exemple de variégation par effet de position (PEV) chez Drosophila melanogaster.*** *(A) Situé sur le chromosome X, le gène white est localisé dans l'euchromatine (noir). L'œil est entièrement de couleur rouge. (B) Suite à une inversion chromosomique, le locus white se retrouve à proximité de l'hétérochromatine (gris). Dans certaines cellules, l'hétérochromatine se propage jusqu'au gène white qui va être réprimé. Dans les autres cellules, white est exprimé car il se situe toujours dans l'euchromatine. L'œil est de couleur blanche et rouge. D'après Grewal et Elgin, (2002).*

d) Les modificateurs de PEV.

La recherche de mutations modifiant l'intensité du phénomène de PEV du gène *w* a permis d'identifier deux types de régulateurs : les mutations diminuant le phénomène de PEV appelées *Suppressor of variegation* (*Su(var)*) et les mutations augmentant ce phénomène désignées *Enhancer of variegation* (*E(var)*). Le fait que les mutations dans les gènes identifiés comme *Su(var)* et *E(var)* altèrent le phénomène de PEV et que l'hétérochromatine est impliquée dans le phénomène de PEV, suggère que ces gènes ont un rôle dans l'établissement, le maintien ou la modification de la structure de la chromatine. Ainsi, la plupart des produits des gènes modifiant le phénomène de PEV sont des composants structuraux de l'hétérochromatine. Par exemple, le gène *Su(var) 205* code une protéine appelée Heterochromatin-associated protéin 1 (HP1) qui est impliquée dans la propagation de l'hétérochromatine (James et Elgin, 1986; Eissenberg *et al*., 1990). Le produit du gène *Su(var)3-7* est une protéine structurale de l'hétérochromatine associée physiquement à HP1 (Cléard *et al*., 1997).

e) La régulation de la structure de la chromatine.

L'étude des produits des gènes *Su(var)* et *E(var)* a permis de mieux comprendre la régulation des gènes par la structure de la chromatine. Différents éléments interviennent pour réguler la structure de la chromatine :

- Les modifications covalentes de l'ADN comme la méthylation des cytosines.
- Certaines histones possèdent des isoformes s'incorporant de façon identique au nucléosome. Ces isoformes appelées « variants » permettent de moduler l'accessibilité à l'ADN aux différents facteurs capables de se lier au nucléosome.
- Certaines protéines sont capables de modifier les histones de manière post-traductionnelle sur leur partie N-terminale non structurée et appelée queue des histones. Des méthylations, acétylations, phosphorylations, ubiquitinations de la queue des histones sont possibles (Figure.10).
- Le nucléosome possède un rôle central dans la régulation de l'expression des gènes. Sa mobilité est nécessaire au remodelage de la chromatine accompagnant les étapes de transcription. A l'inverse, le maintien d'un arrangement régulier de nucléosomes empêche les facteurs impliqués dans la transcription d'accéder à l'ADN, assurant ainsi un état répressif de la chromatine. Des protéines sont capables de déplacer les nucléosomes pour rendre l'ADN accessible grâce à leur activité ATPasique. Ce sont les facteurs de remodelage de la chromatine.

Les différentes modifications des histones déposées par un ensemble de protéines forment un code qui est interprété par d'autres protéines afin de réguler les processus liés à la structure de la chromatine : c'est l'hypothèse du code histone (Jenuwein et Allis, 2001). Par exemple, les protéines SU(VAR)3-9 et HP1 qui sont impliquées dans la propagation de l'hétérochromatine, possèdent des activités biochimiques liées au nucléosome. Ainsi, la protéine SU(VAR)3-9 fait partie des protéines dites Histone Methyl Transferase (HMT) qui sont capables de transférer des groupements méthyles sur la queue des histones. SU(VAR)3-9 méthyle la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me) (Czermin *et al*., 2001). Cette marque est ensuite reconnue par un domaine protéique particulier de la protéine HP1 appelé chromodomaine (pour Chromatin Modifier Organisation). Sans la marque H3K9me, il n'y a pas de fixation de la protéine HP1 sur le nucléosome et la propagation de l'hétérochromatine est abolie (Bannister *et al*., 2001).

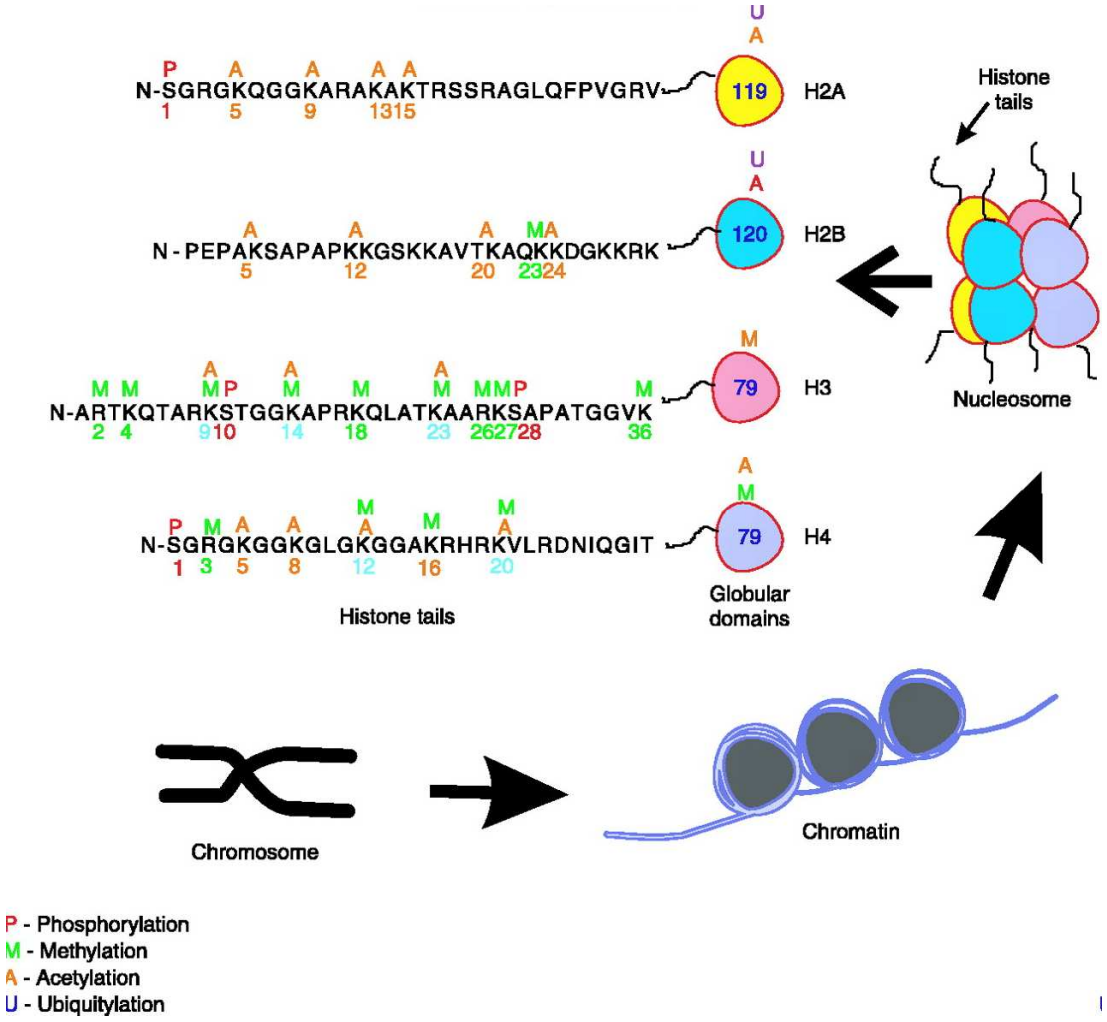


Figure 10 : ***Les différentes modifications post-traductionnelles des histones****. Extrait de Zamudio et al., (2008).*

2. Les protéines PcG et TrxG remodèlent la chromatine.

L'analyse de l'activité biochimique des protéines PcG et TrxG a montré qu'elles étaient similaires à celles des produits des gènes *Su(var)* et *E(var)* (Tableau 1 et 2). L'une des premières protéines dont le rôle a été étudié est la protéine Pc. La séquence de la protéine Pc possède un chromodomaine similaire à 58% au chromodomaine de la protéine HP1 (Paro et Hogness, 1991). Il a été montré que le rôle du chromodomaine est de cibler les protéines Pc et HP1 sur la chromatine. Tandis que la protéine HP1 est localisée sur l'hétérochromatine, la protéine Pc est présente sur l'euchromatine (Messmer *et al.*, 1992; Platero *et al.*, 1995). L'identification du chromodomaine de Pc conduit Paro et ses collaborateurs à proposer une parenté fonctionnelle entre HP1 et Pc dans la mise en place d'une structure de la chromatine imperméable à la transcription.

Les protéines Enhancer of zeste (E(z)), Trx et ASH1 possèdent à un domaine SET (pour SU(VAR)3-9, Enhancer of Zeste, Trithorax) similaire à la protéine SU(VAR)3-9, qui permet de déposer des groupement méthyles sur la queue de l'histone H3. Appartenant au PcG, E(z) méthyle la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me) (Czermin *et al*., 2002; Müller *et al*., 2002; Cao *et al*., 2002) avec l'aide de la protéine Su(z)12. En l'absence de cette dernière, il n'y a plus de marque H3K27me3 (Chen *et al*., 2008). La protéine Trx méthyle la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me) (Roguev *et al*., 2001; Nagy *et al*., 2002). La protéine ASH1 méthyle l'histone H3 sur les lysines 3,4 et 9 (Beisel *et al*., 2002; Byrd et Shearn, 2003).

Il existe d'autres modifications de la queue des histones qui sont déposées par les protéines PcG et TrxG telles que l'acétylation ou l'ubiquitination. La protéine CREB Binding Protein (CBP) possède une activité de transfert de groupement acétyle sur les histones notamment sur la lysine 8 de l'histone H4 (H4K8Ac) et la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27Ac) (Ludlam *et al*., 2002; Tie *et al*., 2009). La protéine PcG dRING possède une activité E3 ubiquitine ligase capable de déposer l'Ubiquitine sur la lysine 119 de l'histone H2A (H2AK119ub) (Cao *et al*., 2005; de Napoles *et al*., 2004; Wang *et al*., 2004a) et utilisant la protéine PSC comme un cofacteur (Lavigne *et al*., 2004).

Si toutes ces protéines citées déposent des groupements chimiques sur les histones, d'autres sont capables d'enlever ces groupements. C'est le cas des histones déacétylases (HDAC) RPD3 et SIR2 faisant partie des PcG (Tie *et al*., 2003; Furuyama *et al*., 2004). Dans le cas des histones déméthylases, la protéine Little imaginal discs (Lid) enlève la méthylation H3K4me (Secombe *et al*., 2007) et la protéine UTX déméthyle la méthylation H3K27me (Smith *et al*., 2008).

Les modifications des histones citées ont des effets répressifs ou activateurs de la transcription. Ainsi les modifications H3K27me3 et H2AK119ub sont associées à la répression des gènes *Hox* imposée par les protéines PcG (Wang *et al*., 2004a; Cao *et al*., 2002). A l'inverse, l'acétylation des histones et la modification H3K4me3 sont associées au maintien de l'activation des gènes par les TrxG (Tie *et al*., 2009; Kim *et al*., 2005) (Voir Figure 10). L'analyse des profils des méthylations H3K27me3 et H3K4me3 sur le génome de la drosophile montre qu'elles sont quasiment exclusives (Schuettengruber *et al*., 2009). Papp et Müller ont analysé la relation entre H3K27me3 et H3K4me3 sur le gène homéotique *Ubx* à l'état activé et réprimé (Papp et Müller, 2006). A l'état réprimé, l'ensemble du gène *Ubx* est triméthylé sur l'H3K27 tandis qu'à l'état activé, H3K27me3 est présente en amont du gène mais pas sur le promoteur et les régions codantes. L'absence de H3K27me3 est confirmée par le fait que la protéine ASH1, responsable de la méthylation H3K4me3, puisse se fixer sur le

promoteur du gène *Ubx*. De plus, le fait que la protéine déméthylase UTX soit associée avec l'ARN Polymérase II (ARN Pol II) sur les gènes activement transcrits, confirme le fait que la méthylation H3K27me3 est strictement associée à la répression des gènes (Smith *et al*., 2008).

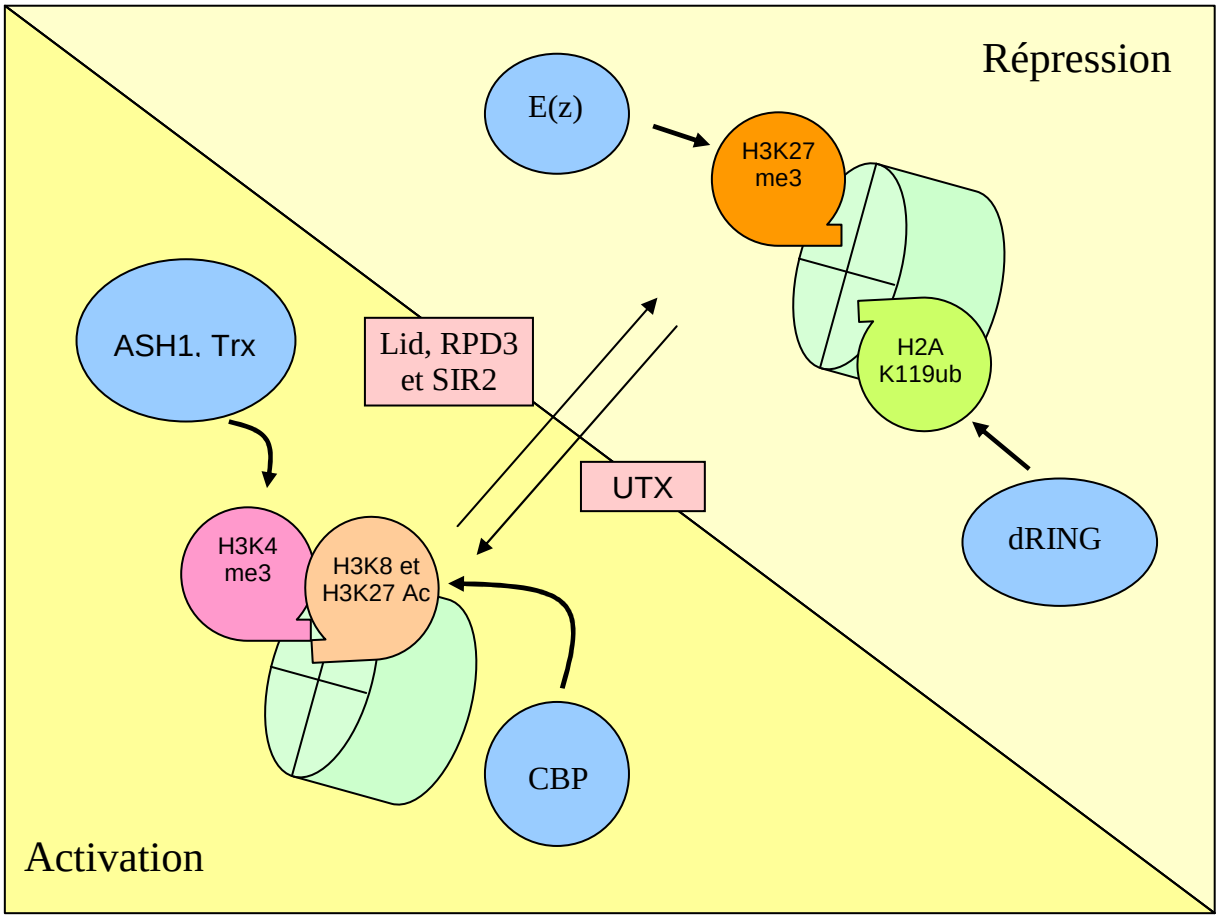


Figure 11. ***Les modifications post-traductionnelles des histones associées au PcG et TrxG***. *Les protéines PcG et TrxG (en bleu) vont déposer des modifications sur les histones (en vert). Inspiré de Schuettengruber et al., (2007).*

Ces marques apposées sur les histones vont être interprétées par d'autres protéines PcG et TrxG. Le chromodomaine de la protéine Pc va reconnaître spécifiquement la marque H3K27me3 (Fischle *et al*., 2003). La protéine Extra Sex Combs (ESC) reconnaît également les méthylations en position H3K27 (Tie *et al*., 2007). Grâce à leur domaine Malignant Brain Tumour (MBT), les protéines Sex Comb on Midleg (SCM) et *Scm*-related gene containing four MBT domains (SFMBT) vont reconnaître les histones dont les lysines sont mono et di méthylées notamment en position H3K9 et H4K20 (Grimm *et al*., 2007, 2009). Les protéines Brahma (BRM), Polybromo et CBP possèdent un Bromodomaine qui permet la reconnaissance des histones acétylées (Mujtaba *et al*., 2007). Les protéines PcG et TrxG

présentent également des activités ATPase nécessaires au remodelage de la chromatine. Par exemple, la protéine PcG dMi-2 est une ATPase de type CHD (Brehm *et al*., 2000) tandis que la protéine TrxG BRM est une ATPase de type SWI2/SNF2 (Tamkun *et al*., 1992).

E. Les complexes PcG et TrxG.

1. Les complexes PcG.

Plusieurs données génétiques suggèrent que les protéines PcG forment des complexes multimériques. Premièrement, la forte augmentation du nombre de transformations homéotiques chez un double mutant perte de fonction PcG par rapport au mutant simple indique une action synergique des protéines PcG (Jurgens, 1985). De plus, les protéines PcG , notamment PC et Polyhomeotic (PH), possèdent de nombreux sites de fixation en commun sur les chromosomes polyténiques des glandes salivaires de larves de drosophile (DeCamillis *et al*., 1992). Les premières études biochimiques ont renforcé l'idée que les protéines PcG agissaient en complexes multiprotéiques. Par co-immunoprécipitation, il a été démontré que les protéines PC et PH interagissaient physiquement en faisant partie d'un même complexe (Franke *et al*., 1992). La purification des complexes PcG a confirmé ces premières études (pour revue (Grimaud *et al*., 2006b; Schwartz et Pirrotta, 2007). On connaît quatre complexes PcG : PRC1, dRAF, PRC2 et PHORC (Figure 12).

a) Le complexe PRC1

Le premier complexe identifié, nommé Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1), a une taille de 1 à 2 MDa (Shao *et al*., 1999). Le cœur du complexe est formé par les protéines PC, PH, Posterior Sex Combs (PSC) et dRING/Sex Combs Extra (Francis *et al*., 2001). Une trentaine d'autres protéines sont présentes dans le complexe PRC1 (Saurin *et al*., 2001). Parmi ces protéines, on peut citer le facteur de transcription spécifique Zeste (Z). Classé initialement comme une protéine TrxG, il est associé avec certaines protéines PcG sur des sites où la transcription est réprimée dans les glandes salivaires de larves (Laney et Biggin, 1992; Rastelli *et al*., 1993). Les protéines TATA Binding Protein Associated Factor (TAF) ont été également purifiées avec PRC1. Ce sont des sous-unités du facteur de transcription général TFIID. Elles sont présentes dans des complexes ayant une activité d'acétylation des histones (Albright et Tjian, 2000). Dans des cellules de drosophile en culture, les protéines PC et PH sont associées avec des facteurs de transcription généraux tel que la TATA Binding Protein (TBP) sur les promoteurs des gènes homéotiques (Breiling *et al*., 2001). Des expériences

montrent que la polymérase II (pol II) est en pause sur les promoteurs lorsque les gènes Hox sont à l'état réprimé. L'association entre PRC1 et les TAF aurait pour but de maintenir la pol II en pause (Chopra *et al*., 2009). La protéine chaperonne Heat shock protein cognate 4 (HSC70-4) est aussi associée avec le complexe PRC1. Des mutations perte de fonction dans le gène *Hsc70-4* augmentent le phénotype des mutants *PcG* (Mollaaghababa *et al*., 2001). De plus HSC70-4 interagit physiquement avec PH dans des cellules de drosophile en culture (Wang et Brock, 2003). HSC70-4 pourrait être nécessaire à l'assemblage du complexe PRC1. Le complexe Chromatine Associated Silencing Complex for Homeotics (CHRASCH) est apparenté à PRC1. Purifié à partir de cellules en culture, il contient en plus des protéines constituant le cœur de PRC1, la protéine Pipsqueak (PSQ) qui permet de fixer spécifiquement PRC1 à l'ADN (Huang et Chang, 2004). Le rôle du complexe PRC1 est d'établir un environnement chromatinien associé à la répression des gènes.

b) Le complexe dRAF

Récemment, un nouveau complexe a été purifié à partir de la protéine dRING : le complexe dRING Associated Factors (dRAF) (Lagarou *et al*., 2008). Associée à dRING et PSC, la protéine dKDM2 forme le cœur du complexe. Nouveau membre des PcG, dKDM2 possède une activité déméthylase permettant d'enlever la marque H3K36me qui est associée à l'activation de la transcription. De plus, dKDM2 stimule l'activité ubiquitine ligase des protéines dRING et de son cofacteur PSC. Les protéines Megator et Ulp1 sont aussi associées à dRAF mais leur rôle n'a pas été analysé. Le rôle de dRAF est la déméthylation de H3K36 puis l'apposition de la marque H2AK119ub par la protéine dRING.

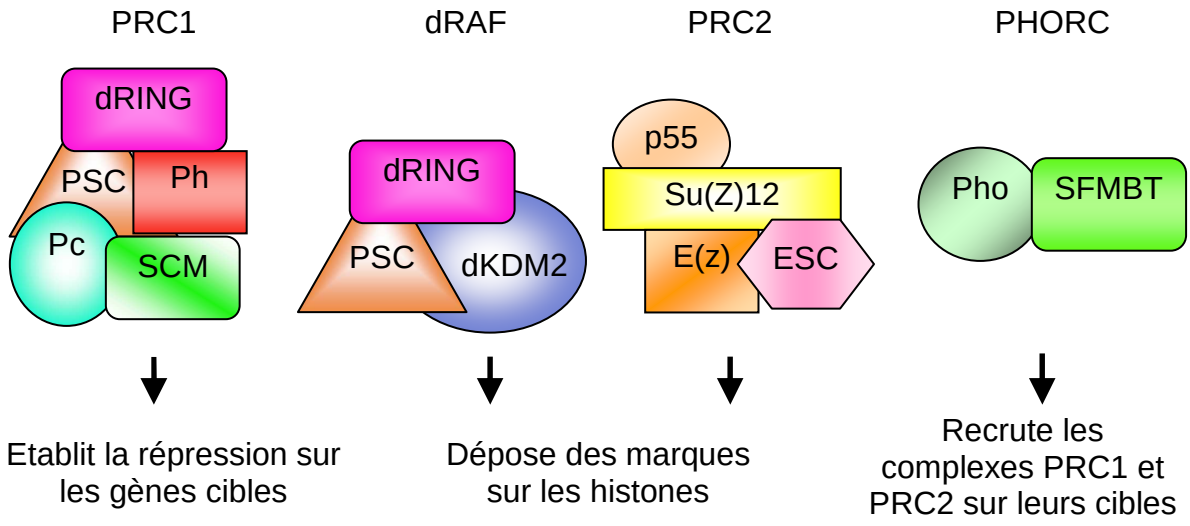


Figure 12 : ***Schéma des protéines cœur des complexes PcG indiquant leurs rôles biochimiques dans le maintien de la répression des gènes.***

c) Le complexe PRC2

Le complexe PRC2 ou ESC-E(z) a une taille de 600 kDa (Ng *et al*., 2000; Tie *et al*., 2001). Le cœur du complexe contient les protéines E(z), ESC, Supressor of Zeste 12 (Su(z)12) et NURF55. D'autres protéines sont associées avec un complexe PRC2 de plus grande taille (1Mda) telles que la protéine Polycomb like (PCL), les protéines histones déacétylase RPD3 et SIR2 (Tie *et al*., 2003; Furuyama *et al*., 2004) et la protéine HSC70-4 (Nekrasov *et al*., 2007). A noter que dans la larve, la protéine PCL fait partie d'un nouveau complexe distinct de PRC1 et PRC2 (Savla *et al*., 2008). Le rôle du complexe PRC2 est de déposer les marques sur les histones associées à la répression des gènes et reconnues par le complexe PRC1.

d) Le complexe PHORC.

Bien que les protéines Pleihomeotic (Pho) et Pleihomeotic Like (PHOL). puissent interagir directement avec les complexes PRC1 (Mohd-Sarip *et al*., 2002) et PRC2 (Wang *et al*., 2004b), elles ne font pas partie de ces complexes. Par contre, Pho a été retrouvée dans deux autres complexes (Klymenko *et al*., 2006). L'un de ces complexes est associé avec le complexe de remodelage de la chromatine dINO80 qui n'est pas connu pour être impliqué dans le maintien de la répression par les PcG. Le second complexe, nommé PHORC, contient Pho et la protéine SFMBT. Le rôle du complexe PHORC est de reconnaître l'environnement chromatinien puis de recruter les complexes PcG sur leurs cibles.

2. Les complexes TrxG

De la même manière que les protéines PcG, les protéines TrxG s'organisent en complexes multimériques pour maintenir les gènes activés. Trois principaux complexes TrxG ont été caractérisés biochimiquement chez *Drosophila melanogaster* (Figure 13) : les complexes BRM, TAC1 et GAF-FACT.

a) Le complexe BRM

Le complexe Brahma (BRM) de 2 MDa est composé des protéines BRM, Moira (MOR), BAP111, OSA et SNF5-related gene 1 (Snr1) (Papoulas *et al*., 1998). Ce complexe est l'homologue du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF caractérisé chez la levure (Collins *et al*., 1999). Chez la drosophile, le complexe BRM existe sous deux formes n'ayant pas la même distribution sur les chromosomes polyténiques et appelés BAP et PBAP (Mohrmann *et al*., 2004). Le complexe BAP est caractérisé par la présence de la protéine

OSA, tandis que le complexe PBAP contient les protéines Polybromo et BAP170 mais pas OSA. Le rôle des protéines OSA, Snr1et la protéine BAP111 serait de moduler les interactions entre le complexe BRM et la chromatine en les ciblant sur des cibles particulières (Marenda *et al*., 2003; Papoulas *et al*., 2001; Vázquez *et al*., 1999). Par exemple, il a été démontré que la protéine Snr1 peut cibler le complexe BRM sur des gènes spécifiques en intervenant dans des processus cellulaires particuliers (Zraly *et al*., 2003). Le rôle du complexe BRM est de déplacer les nucléosomes ce qui facilite l'accès à l'ADN pour les facteurs généraux de transcription.

b) Le complexe TAC1

Le second complexe TrxG est nommé Trithorax Acetylation Complex 1 (TAC1). D'une masse moléculaire de 1 MDa, il contient les protéines Trithorax, CREB Binding Protein (CBP) et l'antiphosphatase Set Binding Factor 1 (SBF1). Le complexe TAC1 va déposer des marques sur les histones liées à l'activation de la transcription.

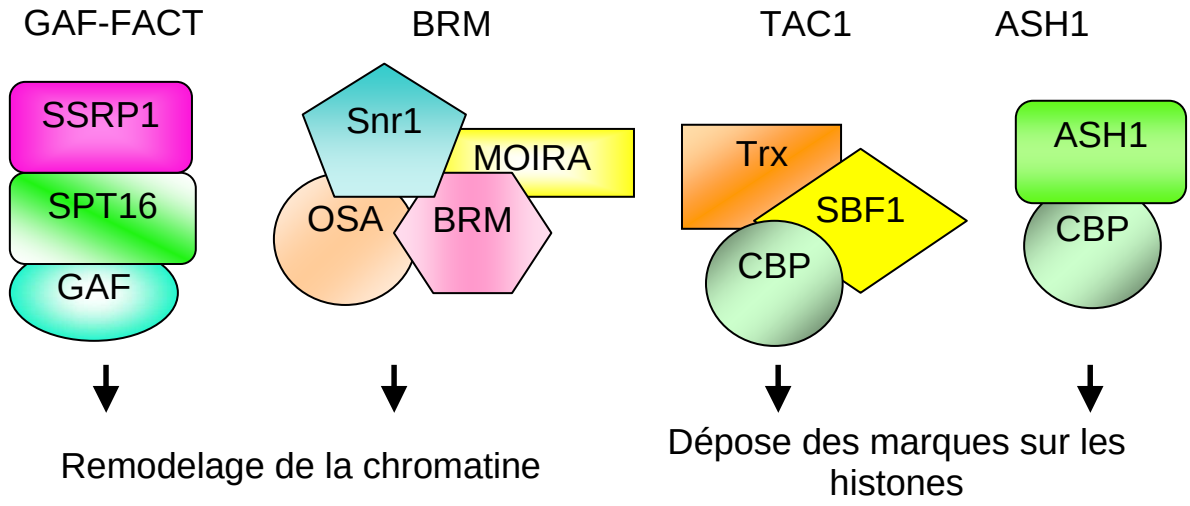


Figure 13 : ***Représentation schématique des complexes TrxG indiquant leurs rôles biochimiques dans le maintien de la répression des gènes.***

c) Le complexe GAF-FACT

Le complexe FAcilitates Chromatin Transcription (FACT) a été isolé initialement chez l'homme (Orphanides *et al*., 1998). C'est un hétérodimère de protéines à boîtes HMG (High Mobility Group), SPT16 et SSRP1, qui facilite l'élongation de la transcription. Chez la drosophile, le complexe FACT, composé des protéines dSPT16 et dSSRP1, a été co-purifié dans l'embryon avec la protéine GAGA Factor (GAF) (Shimojima *et al*., 2003). Le complexe GAF-FACT est impliqué dans le remodelage de la chromatine afin de maintenir l'expression des gènes homéotiques.

d) Autres complexes TrxG

Par tamisage moléculaire, Papoulas et ses collaborateurs ont montré qu'ASH1 et ASH2 sont respectivement présentes dans des complexes de masses moléculaires de 2 MDa et 500 kDa. Les autres composants de ces deux complexes restent à caractériser (Papoulas *et al*., 1998). ASH1 interagit génétiquement et physiquement avec la protéine CBP du complexe TAC1 (Bantignies *et al*., 2000) ce qui laisse à penser que le complexe ASH1 pourrait avoir une fonction redondante avec le complexe TAC1 (Déjardin et Cavalli, 2005).

3. Autres complexes aidant les PcG et TrxG.

Certains complexes de remodelage de la chromatine aident les complexes PcG et TrxG dans le maintien de l'expression des gènes. C'est le cas du complexe TIP60. Composé des protéines TIP60, Reptin, Domino, Enhancer of Polycomb et dMRG15, il est impliqué dans la répression des gènes homéotiques (Qi *et al*., 2006; Ruhf *et al*., 2001). Deux autres complexes de remodelage de la chromatine aideraient les protéines PcG et TrxG dans le maintien de l'expression des gènes. Les deux complexes contiennent la protéine Imitation SWI (ISWI) appartenant à la famille des ATPases SWI2/SNF2 (Tsukiyama *et al*., 1995). ISWI interagit avec la protéine ACF (ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor). Ce complexe intervient dans la répression impliquant les PcG (Fyodorov *et al*., 2004). Le second complexe interagissant avec ISWI est le complexe Nucleosome Remodeling Factor (NURF). Ce dernier est impliqué dans le maintien de l'activation de l'expression des gènes homéotiques avec les TrxG. Il est composé des protéines ISWI (Imitation SWI), NURF 301, NURF 55 (ou p55) et NURF38 (Badenhorst *et al*., 2002). La protéine p55 est aussi membre du complexe PRC2 (Müller *et al*., 2002).

F. Les activateurs des Polycomb et trithorax.

Lors d'un crible génétique visant à identifier de nouveaux activateurs de la mutation perte de fonction du gène *trxG ash1*, Gildea et ses collaborateurs ont mis en évidence l'existence de gènes dont les produits agissent à la fois comme des PcG et TrxG (Gildea *et al*., 2000). Plusieurs gènes initialement identifiés comme des PcG augmentent le phénotype du mutant *ash1*. Ce sont les gènes *E(z)*, *Enhancer of Polycomb (E(Pc))*, *additional sex combs* (*asx*), *Scm*, *Psc* et *Suppressor of zeste 2 (Su(z)2)*. Les auteurs proposent la création d'une nouvelle classe nommée *Activateurs des Polycomb et trithorax* ou *Enhancers of trithorax and Polycomb* (*ETP*) pour les gènes qui agissent comme un *trxG* ou un *PcG* selon la fonction considérée (Tableau 3). Depuis, d'autres gènes ont été identifiés comme des *ETP* :

- Classé parmi les *PcG*, le gène *pho* est nécessaire au maintien de la répression du gène *even skipped* (*eve*) dans l'embryon puis au maintien de l'activation de ce même gène dans la larve (Fujioka *et al*., 2008). La protéine Pho est capable d'interagir physiquement avec les complexes PcG et le complexe BRM (Mohd-Sarip *et al*., 2002).

- A l'inverse, *zeste* (*z*) a été identifié comme un *trxG* (Laney et Biggin, 1992). Puis des mutations *z* augmentant le phénotype de mutants *PcG* ont été décrites (Phillips et Shearn, 1990; Pelegri et Lehmann, 1994). La protéine Zeste interagit avec le complexe BRM (Kal *et al*., 2000) comme avec le complexe PRC1 (Mulholland *et al*., 2003).

- C'est également le cas du gène *Trithorax-like* (*Trl*), codant la protéine GAF. Des mutations du gène *Trl* augmentent le phénotype des gènes *PcG* et *trxG* (Bejarano et Busturia, 2004). La protéine GAF, membre du complexe TrxG GAF-FACT, participe au recrutement des PcG (Mishra *et al*., 2001, 2003; Busturia *et al*., 2001; Poux *et al*., 2001b).

- Le gène *psq* a des fonctions similaires au gène *Trl* dans la répression et dans l'activation des gènes homéotiques (Schwendemann et Lehmann, 2002).

- Un mutant *ban* augmente les phénotypes mutants *PcG* et *trxG* (Faucheux *et al*., 2003). La protéine Ban participe au recrutement des complexes PcG (Mishra *et al*., 2003).

- Un allèle perte de fonction du gène *corto* augmente les phénotypes de type *PcG* et *trxG* (Lopez *et al*., 2001). La protéine Corto interagit physiquement avec les protéines E(z), ESC, PH, SCM impliquées dans les complexes de type PcG (Salvaing *et al*., 2003).

- Le produit du gène *dorsal switch protein 1* (*dsp1*) agit comme un TrxG ou un PcG selon la fonction considérée (Decoville *et al*., 2001) ce qui permet de classer ce gène parmis les *ETP*.

- Le gène *grappa* (*gpp*) est classé parmi les ETP. Un mutant du gène *grappa* (*gpp*), codant une histone méthyltransférase, montre des phénotypes caractéristiques des *PcG* ainsi que des *trxG* (Shanower *et al*., 2005)

Tableau 3 : ***Les Protéines du groupe des activateurs des Polycomb et Trithorax (Enhancers of Trithorax and Polycomb) (ETP)****. Cette liste non exhaustive regroupe les protéines identifiées comme des ETP chez Drosophila melanogaster.*

Membres	Abréviation	Domaines Protéiques	Fonctions	Références
Enhancers of zeste	E(z)	Domaine SET	Méthyle H3K9 et H3K27	(Gildea *et al*., 2000)
Enhancer of Polycomb	E(Pc)	-	-	(Gildea *et al*., 2000)
Sex Comb on Midleg	SCM	Répétition MBT, domaine SAM	Liaison aux histones methylées	(Gildea *et al*., 2000)
Posterior sex combs	PSC	Doigt RING	Cofacteur de dRING	(Gildea *et al*., 2000)
Suppressor of zeste 2	Su(Z)2	Doigt RING	Homologue fonctionnelle de PSC	(Gildea *et al*., 2000)
additional sex combs	ASX	Doigt de zinc	-	(Gildea *et al*., 2000)
Pleihomeotic	Pho	Doigt de zinc	Recrute les complexes PcG et TrxG	(Mohd-Sarip *et al*., 2002)
GAGA factor	GAF	Domaine BTB-POZ	Recrute les complexes PcG et TrxG	(Bejarano et Busturia, 2004)
Grappa	Gpp	Domaine DOT1	Méthylation des histones	(Shanower *et al*., 2005)
Zeste	Z		Recrute les complexes PcG et TrxG	(Phillips et Shearn, 1990; Laney et Biggin, 1992)
Pipsqueak	PSQ	Domaine BTB-POZ	Recrute les complexes PcG et TrxG	(Schwendemann et Lehmann, 2002)
Batman/Lola-like	BAN	Domaine BTB-POZ	Recrute les complexes PcG et TrxG	(Faucheux *et al*., 2003)
Corto	-	Chromodomaine	Liaison aux histones	(Lopez *et al*., 2001)
Dorsal Switch Protein 1	DSP1	Boîte HMG	Recrute les complexes PcG et TrxG	(Decoville *et al*., 2001)

1. Le recrutement des protéines PcG et TrxG par les ETP.

Si on analyse l'activité biochimique des complexes PcG et TrxG, on remarque qu'ils n'ont pas d'activité de liaison à l'ADN. Pourtant les profils de fixation des protéines PcG et TrxG tels que Pc et Trx montrent que ces protéines se lient aux chromosomes sur des sites discrets et précis indiquant qu'elles sont recrutées de manière spécifique sur leurs gènes

cibles. Lorsque l'on s'intéresse au recrutement des PcG et TrxG sur la chromatine, deux questions sont posées. Premièrement, existe-t-il des séquences d'ADN spécifiques permettant le ciblage des complexes ? Deuxièmement, quels sont les facteurs capables de les recruter sur ces séquences particulières ?

a) Les PRE/TRE

Chez la drosophile, le recrutement des PcG et TrxG nécessite des séquences d'ADN régulatrices spécifiques appelées éléments de maintenance ou Polycomb/Trithorax Response Elements (PRE/TRE) (Brock et van Lohuizen, 2001 ; pour revue Ringrose et Paro, 2007). Les PRE/TRE sont des séquences *cis*-régulatrices qui ont été identifiées chez la drosophile par des études génétiques au sein des gènes homéotiques et des gènes *engrailed* et *ph* (Simon *et al*., 1993; Chan *et al*., 1994; Fauvarque et Dura, 1993; Kassis, 1994). La taille de ces séquences varie de quelques centaines à plusieurs milliers de paires de bases. Les PRE ont été identifiés et définis essentiellement de manière fonctionnelle au cours d'expériences de transgénèse (Figure 14).

Les PRE sont définis par les critères suivants:

- Les PRE induisent la répression du gène rapporteur placé à leur voisinage. Le profil de répression maintenu tout au long du développement est perturbé en contexte mutant *PcG* (Kassis *et al*., 1991; Fauvarque et Dura, 1993).
- L'insertion d'un transgène contenant un PRE crée un nouveau site de fixation des protéines PcG sur les chromosomes polytènes de glandes salivaires de larves transgéniques (Zink et Paro, 1995).
- La répression du gène rapporteur est plus forte si le transgène est présent à l'état homozygote. Ce phénomène, observé avec la plupart des PRE, est appelé « Pairing Sensitive Silencing » PSS (Kassis *et al*., 1991). Le PSS se produit aussi si les deux transgènes sont insérés à différents sites dans le génome. Cela démontre l'existence de régulation en trans (Figure 14).
- Les PRE/TRE peuvent maintenir la répression comme l'activation des gènes. Lorsque l'on induit expérimentalement une activation du gène rapporteur, le PRE/TRE maintient l'état activé (Cavalli et Paro, 1998, 1999). Les PRE et les TRE sont distincts mais ils sont physiquement très proches (Tillib *et al*., 1999).

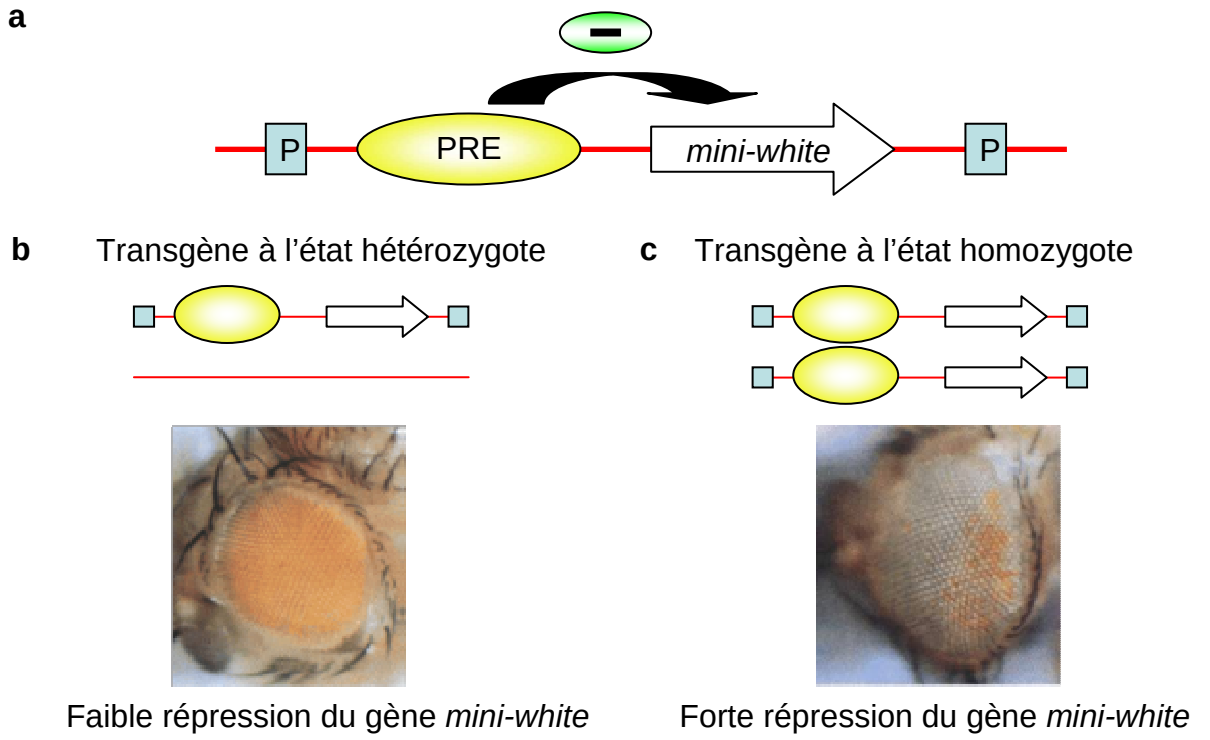


Figure 14 : ***Le phénomène de « Pairing Sensitive Silencing »****. (**a**) Le transgène (symbolisé par les pied de l'élément P (P)) possède une séquence Polycomb Response Element (PRE) réprimant le gène mini-white responsable de la couleur de l'œil. (**b**) A l'état hétérozygote, la répression du gène mini-white par les PcG fixées sur les PRE est faible. (**c**) A l'état homozygote, la répression de mini-white par le PRE est importante. La répression due aux PcG est plus forte lorsque le transgène est présent en deux copies. Ce phénomène est appelé le Pairing Sensitive Silencing (PSS).*

A l'heure actuelle, il n'y a pas de réelle distinction entre les PRE et les TRE. Par exemple, le PRE/TRE *Fab-7* est une séquence frontière du complexe Bx-C situé entre les zones de régulations *iab 6* et *iab 7* et réprimant la zone *iab 6* lorsqu'elle ne doit pas être active (Gyurkovics *et al*., 1990). La délétion de cette zone de régulation entraîne la transformation du segment A6 en segment postérieur A7 ce qui est dû à une forte expression du gène *abd-B* dans le parasegment 11 similaire au niveau normalement exprimé dans le parasegment 12. De plus la fonction de répression de *Fab-7* est dépendante du produit du gène *Pc* (Busturia et Bienz, 1993) ce qui classe *Fab-7* parmi les PRE. A contrario, le fait que, suite à une seule activation de la transcription du gène rapporteur lors de l'embryogénèse, le même *Fab-7* permet le maintien de l'activation tout au long de la vie de la drosophile (Cavalli et Paro, 1998), classe l'élement *Fab-7* comme un TRE. Techniquement, rien ne permet de distinguer le PRE du TRE. C'est pourquoi le terme Module de Mémoire Cellulaire (CMM) ou PRE/TRE est utilisé.

b) Le comité de recrutement des complexes PcG et TrxG.

Bien que certains complexes TrxG (GAF-FACT) et PcG (PHORC et CHRASCH) ont la capacité de se lier de manière séquence spécifique au PRE/TRE, la plupart ne l'ont pas. Comment ces complexes vont-ils être recrutés *in vivo* sur les PRE/TRE ? Un ensemble de protéines, capables de se fixer à l'ADN et interagissant aussi bien avec les complexes PcG que TrxG, permet le ciblage de ces complexes sur les PRE/TRE (pour revue Müller et Kassis, 2006).

Les protéines Pho et PHOL, membres du complexe PHORC (Klymenko *et al*., 2006) se fixent spécifiquement sur la séquence GCCATTTT *in vitro* et *in vivo* (Brown *et al*., 1998, 2003; Schuettengruber *et al*., 2009). Lorsque l'on mute ce site de fixation, la répression par les protéines PcG diminue de la même manière que si la protéine Pho est absente (Brown *et al*., 1998; Mishra *et al*., 2001; Busturia *et al*., 2001). Par exemple, la mutation des sites de fixation de Pho sur le PRE *bxd* abolit la répression de la transcription du gène *Ultrabithorax* dans les disques imaginaux (Fritsch *et al*., 1999). Pho interagit aussi bien avec les complexes PRC1 et PRC2 qu'avec le complexe BRM (Poux *et al*., 2001a; Mohd-Sarip *et al*., 2002). L'étude de la fixation de la protéine Pho sur le génome de la drosophile a confirmé qu'elle joue un rôle d'ETP en étant présente avec les protéines PH et PC sur tous les PRE/TRE, mais également avec les protéines PHOL et Trx sur des promoteurs des gènes (Schuettengruber *et al*., 2009). Même si Pho et PHOL ont des fonctions redondantes (Brown *et al*., 2003), PHOL se fixe préférentiellement sur des gènes où la transcription est active.

La protéine GAF qui a la capacité de se fixer à la séquence (GA)n (Biggin et Tjian, 1988), est un ETP participant au recrutement des PcG et des TrxG (Pour revue Adkins *et al*., 2006; Lehmann, 2004). GAF interagit avec la protéine Trx et les complexes PRC1 et PRC2 pour les recruter sur les PRE/TRE. Par exemple, le PRE *bxd* régulant le gène homéotique *Ubx* possède des sites (GA)n reconnus par GAF. En supprimant ces sites, on empêche la fixation des complexes PcG et de Trx sur le PRE *bxd* (Horard *et al*., 2000; Poux *et al*., 2001b, 2002). Physiquement, la protéine GAF a besoin de cofacteurs pour interagir avec PRC1 et PRC2. L'un de ces cofacteurs pourrait être la protéine CORTO qui interagit directement avec GAF dans le recrutement des complexes PRC1 et PRC2 (Salvaing *et al*., 2003). Un autre cofacteur est la protéine Ban qui coimmunoprécipite avec GAF dans des extraits nucléaires d'embryons (Faucheux *et al*., 2003). De même, PSQ, qui est capable de se fixer à la séquence (GA)n, aide la protéine GAF dans sa fonction de recruteur (Lehmann *et al*., 1998). Les protéines GAF, Ban montrent une majorité de sites de fixation communs sur les chromosomes polyténiques

(Faucheux *et al*., 2003; Schwendemann et Lehmann, 2002) tandis que moins de 70% des sites de fixation de PSQ sont communs avec les sites de fixation de GAF (Théodore, Communication personnelle). Par exemple, ces trois protéines se lient au PRE/TRE *bxd* (Faucheux *et al*., 2003; Huang *et al*., 2002). Lehmann propose un modèle où GAF, PSQ et Ban font partie d'un même complexe pour recruter les complexes PcG et TrxG (Lehmann, 2004). De plus, GAF, membre du complexe GAF-FACT (Shimojima *et al*., 2003) a la possibilité d'interagir avec le complexe NURF (Badenhorst *et al*., 2002; Xiao *et al*., 2001). Ces deux complexes ont la capacité de déplacer le nucléosome. Puisqu'*in vivo*, les PRE/TRE où se fixent GAF et ZESTE sont composés de peu d'histones par rapport au reste du génome (Mito *et al*., 2007), le rôle de GAF et de ses partenaires serait de faciliter le recrutement des complexes PcG ou TrxG en déplaçant les nucléosomes (Mahmoudi *et al*., 2003).

La protéine Zeste se lie au motif YGAGYG (Benson et Pirrotta, 1988). Bien que la protéine Zeste soit exprimée de manière ubiquitaire dans l'embryon, le gène *zeste* est non essentiel pour la survie de la drosophile car les drosophiles porteuses d'une mutation nulle pour ce gène sont viables et fertiles. De plus, ce mutant ne montre pas de phénotype de type *PcG* (Goldberg *et al*., 1989). Pourtant, certains PRE/TRE contiennent la séquence consensus de fixation de Zeste. Par exemple, Zeste se fixe au promoteur *Ubx* quel que soit l'état d'activation. Les sites de fixation de Zeste sont nécessaires à la répression par les PcG d'un transgène *Ubx* (Hur *et al*., 2002) et permettent de recruter les complexes PcG et TrxG. Ainsi la protéine Zeste interagit avec le complexe PRC1 (Saurin *et al*., 2001) en facilitant l'inhibition par PRC1 de l'activité du complexe de remodelage de la chromatine BRM (Mulholland *et al*., 2003). A contrario, la mutation des sites de fixation de Zeste sur le PRE/TRE *Fab-7* n'altère pas le recrutement des PcG (Déjardin et Cavalli, 2004). *In vitro*, Zeste interagit avec le complexe BRM via un contact physique avec les protéines MOR et OSA (Kal *et al*., 2000). *In vivo*, il est démontré que Zeste recrute le complexe BRM pour maintenir l'activation du gène rapporteur sous le contrôle du PRE/TRE *Fab-7* (Déjardin et Cavalli, 2004). Le fait que *zeste* ne soit pas un gène essentiel pour la viabilité suggère qu'un ou plusieurs autres gènes peuvent assurer sa fonction. Il est établi que, dans le maintien de l'activation du gène *Ubx*, GAF et Zeste assurent une fonction redondante (Laney et Biggin, 1996).

Le gène *grainyhead* (*grh*) (connu également NTF-1 ou ELF-1) code un facteur de liaison à l'ADN (Hayashi *et al*., 1999). Les mutations dans le gène *grh* sont létales mais les embryons ne montrent pas de dérégulation du gène homéotique *Ubx* (Bray et Kafatos, 1991). Pourtant, un certain nombre d'expériences indique que GRH participe à la régulation des

gènes *Hox*. Premièrement, GRH active la transcription du promoteur *Ubx in vitro* (Dynlacht *et al*., 1989). Deuxièmement, Blastyak et ses collaborateurs ont montré que GRH interagit *in vitro* physiquement avec la protéine Pho et que cette interaction facilite leur fixation sur le PRE/TRE *iab 7*. De plus, un mutant perte de fonction *grh* augmente le phénotype dû à une mutation dans le gène *sex combs extra* codant la protéine dRING. Les auteurs concluent que GRH permettrait de cibler spécifiquement et plus efficacement le complexe PRC1.

En étudiant le PRE/TRE du gène *engrailed*, Americo et ses collaborateurs ont découvert une séquence nécessaire au bon fonctionnement du PRE/TRE mais aucune protéine connue ne se liait à cette séquence (Americo *et al*., 2002). En alignant les séquences des PRE connus, ils ont découvert qu'une séquence consensus RRGGYG est présente dans de nombreux PRE/TRE. Finalement, ils ont identifié que cette séquence permet la fixation de protéines appartenant à la famille SP1/KLF (Krüppel-Like Factor). La fonction de cette famille de protéines est complexe car elles peuvent soit réprimer soit activer les gènes. Chez la drosophile, dix membres de cette famille sont connus, mais seulement quatre sont bien caractérisés (*buttonhead*, *Sp1*, *huckebein* et *cabut*). Les mutants de ces gènes ne montrent pas de phénotypes homéotiques ce qui laisse à penser que ces protéines ne sont pas impliquées dans le recrutement des PcG et les TrxG au moins sur les gènes homéotiques. Néanmoins, la présence du site consensus de fixation dans de nombreux PRE indique que cette famille serait impliquée dans le recrutement des complexes PcG et TrxG (Brown *et al*., 2005). En faveur de cet argument, lorsque l'on inclut la séquence consensus RRGGYG fixée par les protéines SP1/KLF dans les algorithmes de prédiction des PRE/TRE, le nombre de PRE/TRE déjà identifié est augmenté (Fiedler et Rehmsmeier, 2006).

La protéine Dorsal Switch Protein 1 (DSP1) est aussi impliquée dans le recrutement des PcG en se fixant sur la séquence GAAAA (Déjardin *et al*., 2005). Son rôle exact sera développé dans le chapitre qui lui est consacré.

L'identification des protéines capables de se lier à l'ADN et de leurs séquences a permis de mieux comprendre ce qui définissait un PRE (Figure 15). Une analyse bioinformatique prenant en compte la séquence des PRE connus avec les sites des protéines Pho/PHOL, GAF et Zeste a permis d'identifier 167 PRE dans le génome de la drosophile (Ringrose *et al*., 2003). Cette analyse a montré que les différents motifs Pho/PHOL, GAF et Zeste sont présents en nombre important dans le génome. Mais la présence de ces motifs ne garantit pas la présence d'un PRE/TRE. C'est l'organisation et le nombre de ces motifs qui vont définir le PRE/TRE (voir chapitre suivant).

a) Les motifs présents dans les PRE/TRE

Pho/Phol	GCCAT
Dsp1	GAAAA
GAF/Psq	GAGAG
Zeste	YGAGYG
Grh	TGTTTTT
Sp1/KLF	RRGGYGY

b) Organisation des motifs dans les PRE/TRE *Fab-7* et *en*

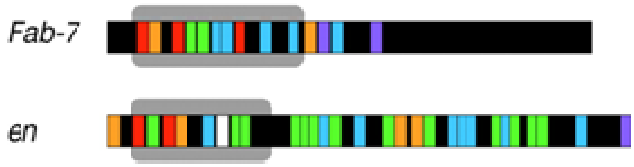


Figure 15 : ***Les séquences présentes dans les PRE/TRE où se fixent les protéines ETP (a)*** *et l'organisation de ces motifs dans les PRE/TRE Fab-7 et du gène engrailed (en)* ***(b)****. Extrait de Ringrose et Paro, (2007).*

c) Fixation des protéines PcG et TrxG sur le génome.

Les techniques d'immunoprécipitation de la chromatine pontée ou Chromatin ImmunoPrecipitation (ChIP) et de DNA adenine methyltransferase identification (DamID) couplées avec les puces à ADN (chip), ont permis d'étudier la fixation des protéines PcG et TrxG sur le génome en identifiant leurs cibles (Figure 16) (Nègre *et al*., 2006; Schwartz *et al*., 2006; Tolhuis *et al*., 2006; Schuettengruber *et al*., 2009).

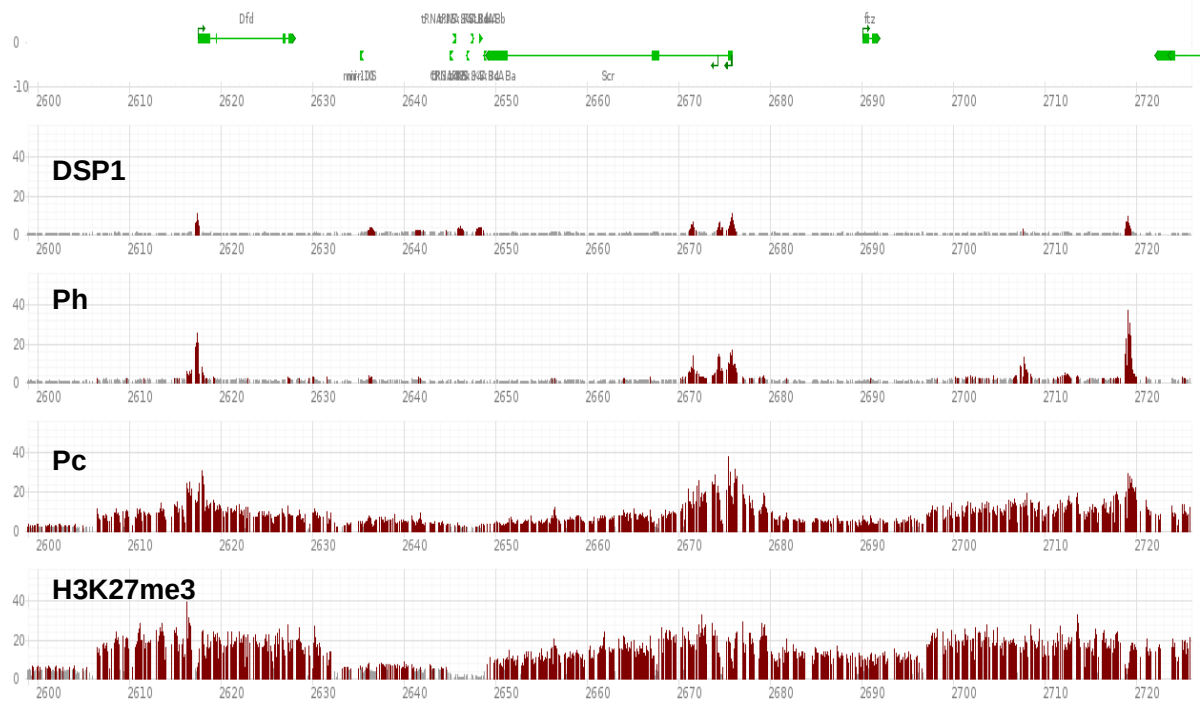


Figure 16 : ***Profils de fixation des protéines DSP1, Pc, Ph et de la marque H3K27me3 dans la région du gène Scr chez Drosophila melanogaster****. Extrait des expériences de ChIP on Chip publié dans Schuettengruber et al., (2009).*

Ces études effectuées sur des cellules ou des embryons de drosophiles ont montré que les protéines PcG et TrxG se fixent principalement au niveau des PRE/TRE sur de nombreuses cibles sur le génome mais qu'elles ne sont pas des régulateurs généraux. Par exemple, Tholuis et ses collaborateurs ont montré que les protéines Pc, ESC et dRING sont présentes ensemble sur plus de 150 régions dans le génome des cellules Kc de drosophile (Tolhuis *et al*., 2006). L'étude réalisée par Schuettengruber et ses collaborateurs montre que la protéine Pc se fixe sur 2110 sites dans le génome de l'embryon de drosophile ce qui correspond à plus de 200 gènes régulés par cette protéine. (Schuettengruber *et al*., 2009). La protéine Pc est la seule protéine se liant à de larges domaines bien corrélés avec ceux de la marque H3K27me3 (voir Figure 16). Inversement, la marque H3K4me3 est présente sur de nombreux sites de fixation de la protéine Trx. Chez la drosophile, les marques H3K4me3 et H3K27me3 sont presque mutuellement exclusives puisque seule 6,5 % des sites sont partagés par les marques H3K4me3 et H3K27me3 (Schuettengruber *et al*., 2009).

L'analyse de la fixation des protéines PcG et TrxG sur le génome de la drosophile a permis de mieux comprendre le recrutement des PcG et TrxG au niveau des PRE/TRE et des recruteurs. Certains PRE/TRE prédits ne sont pas des cibles des PcG et TrxG. Réciproquement, entre 73 et 94% des sites de fixation des protéines PcG *in vivo* n'ont pas été prédits par l'analyse bioinformatique. Parmi les 39 PRE/TRE prédits étudiés par Tolhuis, seuls 12 étaient réellement la cible des PcG (Tolhuis *et al*., 2006). Cela reflète le fait que l'analyse bioinformatique avait été faite avant la découverte d'autres protéines recrutant les PcG et TrxG. La prise en compte des séquences consensus de fixation des protéines DSP1 et SP1/KLF dans l'analyse bioinformatique augmente le nombre de PRE/TRE prédits et déjà validés expérimentalement (Fiedler et Rehmsmeier, 2006). De plus, les PRE/TRE peuvent être spécifiques à certaines lignées cellulaires. Par exemple, lors de la différenciation des cellules germinales mâles en spermatozoïdes, trois gènes responsables de cette différenciation sont des cibles des protéines PcG et TrxG (Chen *et al*., 2005) qui n'avaient pas été détectées dans les études sur les cellules et les embryons de drosophile.

Les profils de fixation des protéines de liaison à l'ADN Pho, PHOL, GAF, DSP1 et Zeste sur le génome de la drosophile ont été déterminés (Kwong *et al*., 2008; Oktaba *et al*., 2008; Schuettengruber *et al*., 2009). Le fait que la protéine Pho soit présente sur toutes les cibles fixées par les protéines PcG Pc et Ph, indique que la présence de Pho est essentielle pour la répréssion des gènes par les PcG. En comparant les motifs de fixation dans les régions où Pho et Pc sont associées et dans les zones où Pho est seule, Kwong et ses collaborateurs ont identifié des motifs de fixation particuliers spécifiques à Pho dans les régions où Pho n'est

pas associée à Pc. Cela suggère que certaines séquences de fixation à la protéine Pho sont plus favorables au recrutement des PcG (Kwong *et al*., 2008). Une très large partie des sites de fixation des protéines Pho et PHOL n'est pas corrélée avec la fixation des protéines PcG. Ce constat est le même pour les protéines GAF, DSP1 et Zeste. Ce résultat confirme le fait que ce n'est pas la présence mais le nombre de motifs et leur organisation qui vont définir le PRE/TRE (Figure 14b) (Ringrose et Paro, 2007). De surcroît, d'autres protéines capables de se lier à l'ADN et de recruter les protéines PcG et TrxG pourraient être découvertes. En effet, Hauenschild et ses collaborateurs ont étudié les séquences PRE dans le génome de quatre espèces de drosophiles : *D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. yakuba* et *D. pseudoobscura*. Ils ont montré que les séquences les plus conservées au sein PRE des quatre espèces sont dépourvues de sites de fixation aux protéines Pho, GAF, DSP1 et Zeste. Puisque la conservation de ces séquences au cours de l'évolution semble démontrer leur importance biologique, ces séquences doivent contenir des sites de fixation pour des protéines encore inconnues (Hauenschild *et al*., 2008). Une autre étude publiée recemment vient appuyer cette idée. De plus Schuettengruber et ses collaborateurs ont identifié 3 motifs surreprésentés dans les PRE/TRE auxquels aucune protéine connue ne se fixe (Schuettengruber *et al*., 2009). A l'heure actuelle, il n'y a pas de définition claire d'un PRE/TRE et des motifs qui sont nécessaires pour les définir ce qui laisse à penser que d'autres éléments que la séquence et les protéines recruteur doivent être pris en compte. L'un de ces éléments pourrait être le fait que la reconnaissance des PRE se ferait non par une spécificité de séquence mais par une spécificité de structure. Au niveau des PRE/TRE, l'ADN adopterait des structures particulières qui seraient reconnues spécifiquement par les protéines recruteur des PcG et TrxG. Afin de valider cette hypothèse, il faudrait s'intéresser à la structure des PRE/TRE.

2. Choix entre la répression et l'activation.

Les PRE/TRE sont des séquences d'ADN fonctionnelles où les protéines séquences spécifiques participent au recrutement des protéines PcG ou TrxG. Quels sont les moyens de recruter les complexes TrxG plutôt que PcG et inversement ? Plusieurs hypothèses sont avancées concernant le choix de la répression ou de l'activation.

a) Marque épigénétique et recrutement des PcG et TrxG.

L'une des possibilités est la mise en place de marques épigénétiques spécifiques permettant de recruter les PcG ou les TrxG sur leurs cibles. Les régions du génome régulées par les PcG et les TrxG sont associées au remplacement de l'histone H3 par son variant

l'histone H3.3 (Mito *et al*., 2007). La marque H3K27me3 est associée à la répression due au PcG tandis que la méthylation H3K4me3 est associée au maintien de l'activation par les TrxG (Schuettengruber *et al*., 2007). Chez les mammifères, l'expression des déméthylases spécifiques de H3K27me3 UTX et JMJD3 conduit à l'abolition de la répression par les PcG (Agger *et al*., 2007). Les modifications des histones seraient le signal du recrutement des PcG ou bien des TrxG selon le contexte. Cette hypothèse est remise en cause par Kahn et ses collaborateurs (Kahn *et al*., 2006). L'expression d'un gène rapporteur *white* placé sous le contrôle du PRE *bxd* est considérablement réduite. En bloquant l'extension de la marque H3K27me3 par ajout d'une séquence issue de « l'insulateur » gypsy Su(Hw), la répression due aux PcG est abolie mais pas la fixation des protéines Pc, E(z) et PSC. Ces expériences montrent que la méthylation H3K27me3 ne serait pas responsable du recrutement des PcG mais qu'elle aurait un rôle plus direct dans le maintien de la répression.

b) Le recrutement des PcG et des TrxG dépend de l'activité transcriptionnelle.

Un même élément PRE/TRE est capable de maintenir les gènes réprimés ou activés. Par exemple, le PRE/TRE *Fab-7* est capable de maintenir la répression d'un transgène *mini-white* par les PcG. Mais il est aussi capable de maintenir l'activation du même transgène par les TrxG lorsque la transcription de *mini-white* est activée lors de l'embryogénèse (Cavalli et Paro, 1998). Ces expériences suggèrent que les PRE/TRE sont réprimés par défaut. Leur état activé est dépendant d'une activation précoce du site de transcription qu'ils régulent (Klymenko et Müller, 2004; Sengupta *et al*., 2004). Plusieurs études démontrent que les PcG et TrxG sont présents constitutivement sur les PRE/TRE quel que soit l'état du gène. Ainsi, Papp et Muller ont montré par des expériences de ChIP que les protéines des complexes PRC1, PRC2, PHORC et la protéine Trx étaient présentes sur les PRE du gène *Ubx* dans les disques imaginaux d'ailes (où *Ubx* est réprimé) et d'haltères (où *Ubx* est activé) (Papp et Müller, 2006). En triant les cellules embryonnaires exprimant le gène *Ubx*, Petruk et ses collaborateurs ont démontré que le complexe TAC1 est présent quel que soit l'état du gène *Ubx* (Petruk *et al*., 2006). La différence observée entre l'état activé et l'état réprimé se ferait sur la quantité de protéines PcG et TrxG fixées sur les PRE/TRE. Ainsi Pc et Pho sont toujours présentes sur les PRE/TRE mais en de plus faible quantité lorsque les gènes homéotiques sont activés (Kwong *et al*., 2008). A contrario, certaines protéines TrxG sont recrutées spécifiquement lors de l'état activé telle la protéine ASH1 qui est présente seulement lorsque *Ubx* est actif (Papp et Müller, 2006).

Sur les chromosomes polyténiques de glandes salivaires de larves de 3ème stade, l'insertion d'un transgène où *white* est sous le contrôle du PRE/TRE *bxd* crée un site ectopique de liaison des protéines PcG et TrxG. Lorsque Trx est fixée sur ce transgène, les protéines Pc, Ph et E(z) en sont absentes et inversement ce qui laisse penser que la fixation des PcG ou des TrxG semble exclusive au moins sur les chromosomes polyténiques (Petruk *et al*., 2008). Les différences observées entre ces expériences pourraient être dues à une différence technique (ChIP vs Immunolocalisation) ou de type cellulaire. L'une des possibilités afin d'expliquer les différences observées entre ces expériences proviendrait d'une étude récente sur la protéine Trx (Schuettengruber *et al*., 2009). La protéine Trx possède cinq isoformes avec une partie C-terminale conservée et une partie N-terminale variable (Sedkov *et al*., 1994). En outre, la protéine Trx est scindée par protéolyse en deux parties C-terminale (Trx-C) et N-terminale (Trx-N). La fonction de ces deux parties n'avait pas été étudiée (Kuzin *et al*., 1994). Les études présentées ici ne tiennent pas compte de ce fait et présentent la protéine Trx comme une seule et même entité. Or Schuettengruber et ses collaborateurs distinguent deux rôles différents pour Trx-C et Trx-N. A l'aide d'anticorps dirigés spécifiquement contre l'une ou l'autre des parties de la protéine Trx, ils ont étudié les profils de fixation des protéines Trx-C et Trx-N sur le génome d'embryon de drosophile. La protéine Trx-N n'est pas fixée sur les PRE tandis que Trx-C est fortement associée sur les PRE avec les protéines PcG. L'activité de Trx est certainement modulée en fonction des isoformes présentes et de la coupure protéolytique. Possiblement, des isoformes de la protéine Trx pourraient être associées aux PcG tandis que d'autres seraient associées aux TrxG. Un manque d'expression des isoformes associées au PcG dans un tissu tel que les glandes salivaires conduirait à observer que la protéine Trx n'est pas associée constitutivement sur les PRE/TRE. Ces nouvelles données devraient amener à reconsidérer les expériences sur la protéine Trx.

Une combinaison des protéines ETP capables de se lier à l'ADN pourrait recruter les protéines PcG et TrxG selon l'activité transcriptionnelle précédemment déterminée. Si le gène cible du PRE/TRE est réprimé, les protéines ETP recrutent majoritairement les complexes PRC1, PRC2 et PHORC en grande quantité grâce à la présence d'une forte concentration de protéines Pho. Cela permet le recrutement de la protéine SFMBT (qui associée à Pho forme le complexe PHORC) qui semble être associée majoritairement à la répression (Oktaba *et al*., 2008). De manière concomitante, les complexes PRC1 et PRC2 sont recrutés en grande quantité sur le PRE/TRE tandis que la protéine Trx-C est faiblement recrutée (Petruk *et al*., 2007; Kwong *et al*., 2008). La présence de la protéine Trx-C permettrait un recrutement des

TrxG plus efficace en cas de changement de l'état transcriptionnel du gène cible. Si le gène cible est activement transcrit, les protéines ETP vont recruter majoritairement les complexes TrxG sur les PRE/TRE. La faible quantité de la protéine Pho et la grande quantité d'autres protéines ETP (peut être GAF) recrutent la protéine Trx-C. La forte concentration de la protéine Trx-C permet le recrutement des complexes TrxG spécifiques de l'activation tels que la protéine ASH1 ou CBP. Néanmoins, les complexes PRC1 et PRC2 sont recrutés faiblement (Papp et Müller, 2006). De la même façon que pour la protéine Trx-C, la présence des complexes PRC1 et PRC2 à l'état activé assure une capacité de réaction pour le cas où le gène cible serait réprimé. Dans le cas du choix du recrutement des protéines PcG ou TrxG, je présente le modèle présenté dans la figure 17 qui résume les données du chapitre.

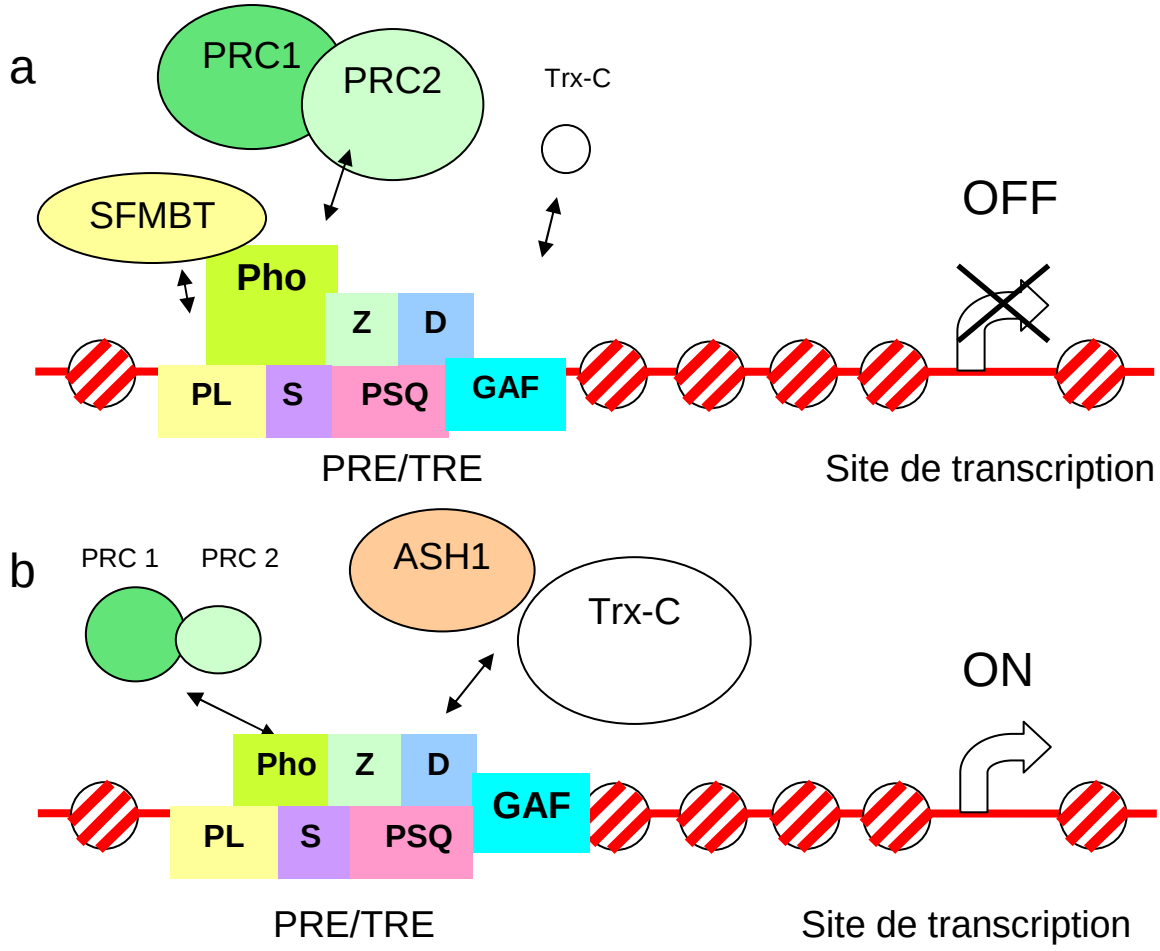


Figure 17 : ***Modèle de recrutement des protéines PcG et TrxG sur les PRE/TRE****. Les protéines PcG et TrxG sont recrutées sur les PRE/TRE par les protéines ETP capables de se lier à l'ADN telle que Pho, PHOL (PL), Zeste (Z), GAF, PSQ, DSP1 (D) et SP1/KLF (S).* ***(a)*** *Lorsque le gène cible du PRE/TRE est réprimé, c'est la quantité de protéine Pho et la présence de la protéine SFMBT qui déterminent le recrutement des protéines PcG. Mais la protéine Trx-C est présente en faible quantité.* ***(b)*** *Lorsque le gène cible est activé, c'est la quantité de protéine ETP à sensibilité TrxG (tels GAF) qui va recruter en grande quantité de la protéine Trx-C. Ensuite la protéine Trx-C permet l'ancrage de protéine TrxG spécifique comme ASH1. Néanmoins une petite quantité de complexe PRC1 et PRC2 est recrutée.*

G. Les Protéines PcG/TrxG et les ARNs non codants

Un certain nombre d'ARN non codants transcrits dans les PRE/TRE des complexes Antp-C et Bx-C ont été découverts (Tableau 4) (Brock *et al*., 2009; Hekimoglu et Ringrose, 2009). Par exemple, les ARNnc sont transcrits dans les séquences régulatrices du complexe BxC (Sánchez-Herrero et Akam, 1989; Bae *et al*., 2002). Certains de ces ARNnc interviennent dans le maintien de l'expression des gènes homéotiques avec les protéines PcG et TrxG.

Tableau 4 : ***Les ARNs non codants exprimés dans les PRE/TRE du complexe Bithorax****. Corrélation avec le gène régulé : la corrélation spatiale indique que l'expression de l'ARNnc a été identifiée par hybridation in situ. Extrait de Hekimoglu et Ringrose, (2009).*

Nom du PRE/TRE	Gène régulé	Situation relative par rapport au gène	Corrélation avec le gène régulé	Expression	Référence
iab8	*Abd-B*	En aval	co-expression	Cellules Kc et SF4	Beisel *et al*., 2007
Fab-7	*Abd-B*	En aval	spatiale	Embryon 2–6 h	Manak *et al*., 2006
			spatiale	Cerveau des Larves	Schmitt *et al*., 2005
iab6	*Abd-B*	En aval	spatiale	Embryon 2–6 h	Bae *et al*., 2002
MCP	*Abd-B*	En aval	spatiale	Embryon 2–6 h	Beisel *et al*., 2007
iab4	*abd-A*	En amont	spatiale	Embryon 2–6 h	Bae *et al*., 2002
iab3	*abd-A*	Sur le promoteur	spatiale	Embryon 2–6 h	Bae *et al*., 2002
iab2	*abd-A*	Sur le promoteur	spatiale	Embryon 2–6 h	Bae *et al*., 2002
bxd	*Ubx*	En amont	opposée	Embryon 2–6 h	Petruk *et al*., 2006
			spatiale	Cerveau des Larves	Schmitt *et al*., 2005
bxd TRE 1, 2, 3	*Ubx*	En amont	co-expression	Disque imaginal de patte T3 chez la larve	Sanchez-Elsner *et al*., 2006

De nombreuses études suggèrent que la transcription d'ARNnc à travers les PRE/TRE jouerait un rôle dans le changement d'un état réprimé vers un état activé (Rank *et al*., 2002; Hogga et Karch, 2002). Dans ces expériences, un gène rapporteur *mini-white* est mis sous le contrôle d'une séquence PRE/TRE et d'un promoteur heatshock. En absence de choc thermique, le gène rapporteur est réprimé par le PRE/TRE. Si le gène rapporteur est activé par

choc thermique au cours de l'embryogénèse, le PRE/TRE maintient cette activation tout au long de la vie de la drosophile (Cavalli et Paro, 1999). La transcription est donc essentielle au maintien de l'activation. Paro et ses collaborateurs ont découvert que le maintien de l'activation dépend de l'activation de la transcription dans le PRE/TRE lui-même. Ils ont détecté la présence d'ARNnc transcrit à travers les PRE/TRE *bxd, Mcp (Miscadastral Pigmentation),* et *Fab-7* dans l'embryon (Rank *et al*., 2002) et la larve (Schmitt *et al*., 2005). L'expression de ces ARNnc est corrélée avec l'expression des gènes qu'ils régulent. Les auteurs de ces deux études suggèrent que la transcription de ces ARNnc permet le maintien de l'activation des gènes *HOX*. L'année suivante, Mazo et ses collaborateurs publient des résultats inverses aux précédents où la transcription des ARNnc permet la répression des gènes. Ils découvrent que les ARNnc *bxd* sont exprimés dans les cellules embryonnaires où *Ubx* est réprimé (Petruk *et al*., 2006). Des résultats similaires pour les ARNnc transcrits dans les PRE/TRE *iab* et dans le gène *abd-A* sont obtenus (Petruk *et al*., 2007). L'expression de ces ARNnc, dépendante de protéines Trx et ASH1, se fait dans le blastoderme syncytial avant les gènes qu'ils régulent. Ils proposent un modèle d'interférence transcriptionnelle pour expliquer les résultats (Figure 18) (voir revue Mazo *et al*., 2007). Dans le modèle présenté, les protéines TrxG vont faciliter le recrutement de l'ARN polymérase sur le PRE/TRE. L'ARN Pol II va transcrire la séquence du PRE/TRE et produire les ARNnc. Ce modèle reste simple car il élude la question de la répression par les protéines PcG. On peut imaginer qu'elles répriment soit le PRE/TRE soit le promoteur selon les besoins de la cellule. Le nombre d'études sur le sujet étant peu important, cela ne permet pas de se faire une idée précise de la fonction des ARNnc. Par exemple, peu de choses ont été découvertes sur l'effet des ARNnc notamment avec les PcG. Des expériences de ChIP sur les protéines PcG et TrxG avec détection d'ARN puis séquençage permettraient d'identifier lesquels des ARNnc se fixent au PcG *in vivo*.

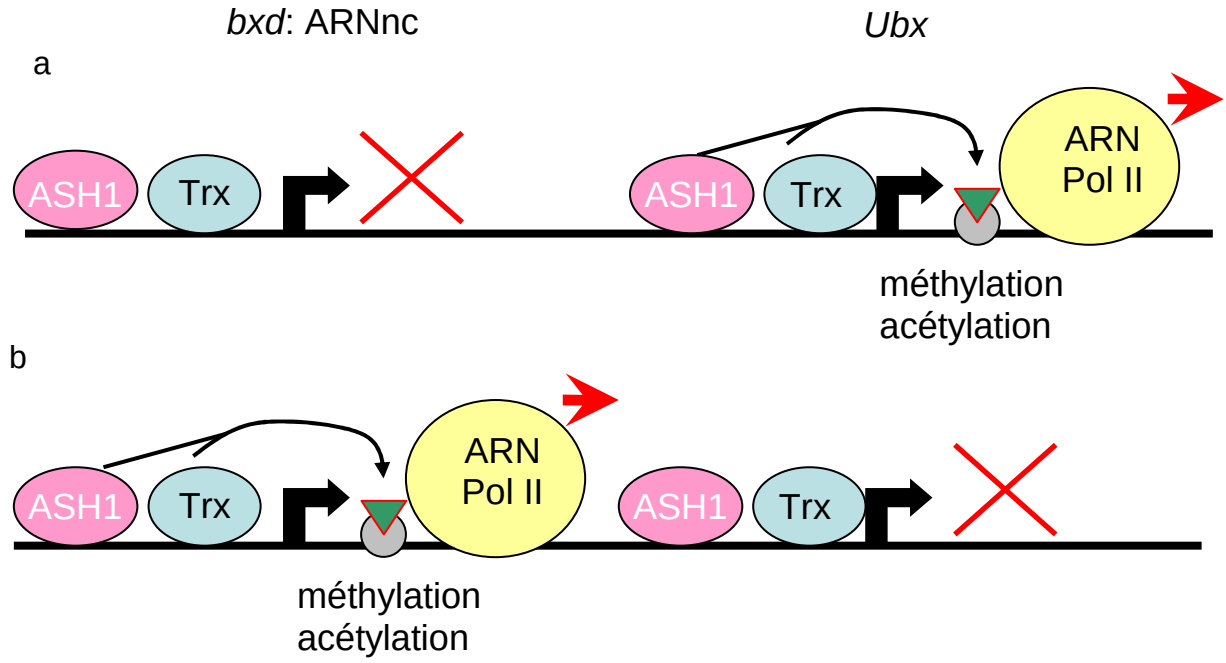


Figure 18 : ***Modèle de l'interférence transcriptionnelle par les TrxG et les ARNnc.*** *Les protéines TrxG sont recrutées sur les PRE/TRE bxd et sur le promoteur Ubx suivant l'état du gène. (a) Lorsque le gène Ubx est préalablement activé, les protéines TrxG ASH1 et Trx vont faciliter la transcription de ce gène grâce à des méthylations et acétylations déposées sur les histones. (b) Lorsque le gène Ubx est réprimé, les protéines ASH1 et Trx vont détourner l'ARN polymérase II (ARN Pol II) du promoteur Ubx pour le PRE/TRE bxd. Les TrxG vont faciliter la transcription du PRE/TRE. Alors, les ARNnc sont transcrits. Dans ce modèle, c'est la production d'ARNnc qui est importante, non pas la fonction de ces ARNnc. D'après Petruk et al., (2006).*

1. Les protéines PcG et TrxG sont capables de se lier à l'ARN.

In vitro, plusieurs protéines PcG et TrxG ont la capacité de se lier à l'ARN. Chez la souris, les protéines Cbx, homologues de la protéine Pc, possèdent un chromodomaine qui se lie à l'ARN de manière non spécifique (Bernstein *et al*., 2006). La protéine Pc de drosophile n'a pas été encore testée pour sa capacité de liaison à l'ARN. D'autres domaines présents dans les protéines PcG et TrxG se lient à l'ARN. Le domaine protéique SET porté par les protéines E(z), Trx et ASH1 et responsable de l'activité de méthylation des histones, se lie aux ARNs transcrits *in vitro* ainsi qu'à l'ADN simple brin (Krajewski *et al*., 2005). Une étude sur la protéine ASH1 et les ARNnc chez la drosophile a montré que ASH1 se lie à 3 ARNnc : TRE 1, 2 et 3. Ces ARNnc sont transcrits dans les disques imaginaux de patte T3 et d'haltère à partir du PRE/TRE *bxd* qui régule le gène *Ubx*. Ces transcrits ont tous des séquences et des

tailles différentes suggérant que ASH1 reconnaît des structures particulières et non pas la séquence primaire des ARNnc (Sanchez-Elsner *et al*., 2006). Des observations similaires ont été observées chez la souris avec des ARNnc et les protéines E(z) de drosophile et son homologue souris Ezh2 (Zhao *et al*., 2008). Ce serait la structure des ARNnc qui déterminerait la spécificité de liaison avec les protéines PcG et TrxG (Hekimoglu et Ringrose, 2009).

2. ARNnc dans le recrutement des PcG et TrxG.

Dans les disques imaginaux de patte T3 de larve, la protéine ASH1 participe à l'activation du gène *Ubx* via son recrutement sur le PRE/TRE *bxd*. Sanchez-Elsner et ses collaborateurs ont montré que le recrutement d'ASH1 sur *bxd* dépend de trois ARNnc TRE1, 2 et 3 exprimés spécifiquement dans la larve. Ces trois ARNnc sont transcrits dans la séquence de *bxd*. Des expériences de ChIP couplées à des traitements par des RNases démontrent que l'association entre ASH1 et le PRE/TRE se fait de manière ARN dépendante. De plus, cette interaction dépend spécifiquement des ARNnc TRE1, 2 et 3 car, en inhibant l'expression d'ARNnc TRE par ARN interférence, le recrutement d'ASH1 sur *bxd* est aboli. Inversement, l'expression ectopique de TRE1, 2 et 3 permet spécifiquement le recrutement d'ASH1 sur *bxd* et l'activation du gène *Ubx*. Le recrutement d'ASH1 sur *bxd* se fait par l'intermédiaire de la formation d'un complexe ADN-ARNnc. Ensuite ASH1, en reconnaissant la structure des ARNnc TRE, va être recrutée sur le PRE/TRE.

Dans l'embryon, il a été montré que tout comme Trx, ASH1 est fixée sur *bxd* quel que soit l'état d'activation du gène *Ubx* (Petruk *et al*., 2007). A l'inverse, ASH1 et Trx ne sont pas présentes sur le PRE/TRE lorsque le gène *Ubx* est réprimé chez la larve (Petruk *et al*., 2008). Cela suggère que le recrutement des TrxG doit se faire de manière différente dans l'embryon et dans la larve. Les ARNnc transcrits spécifiquement pourraient être la clé du mécanisme de recrutement des TrxG dans la larve. Mais à l'heure actuelle, une seule étude s'est intéressée au recrutement des TrxG par les ARNnc chez la drosophile. D'autres rôles ont été proposés pour les ARNnc notamment dans l'activation et la répression des gènes homéotiques.

3. RNAi et compartimentation nucléaire des PcG.

La machinerie interférence ARN ou RNAi est un moyen pour la cellule de détruire les ARN double brin. Celle-ci est impliquée dans la défense contre les virus et les transposons (van Rij et Berezikov, 2009), la formation de l'hétérochromatine et la répression de la transcription (Verdel *et al*., 2009). Un petit ARN complémentaire va venir s'apparier sur l'ARN cible créant un ARN double brin qui va être pris en charge par la machinerie RNAi pour être dégradé. Par exemple, la cellule peut réguler spécifiquement le nombre d'un transcrit en exprimant un ARNnc complémentaire de ce transcrit. Certaines protéines de la machinerie RNAi pourraient être impliquées dans la régulation de l'expression des gènes avec les protéines Polycomb. En étudiant le phénomène de PSS sur un transgène portant le PRE *Fab-7*, Bantignies et ses collaborateurs ont observé une association dans une même région nucléaire entre la région *Fab-7* endogène et le PRE *Fab-7* apporté par le transgène ou bien entre deux mêmes transgènes insérés à différents endroits du génome (Bantignies *et al*., 2003). Des résultats similaires ont été observés avec un transgène portant le PRE *Mcp* (Vazquez *et al*., 2006). Le phénomène de PSS dû au transgène Fab-7 est aboli par des mutations dans les gènes des composants du RNAi. Pourtant, aucune mutation dans les gènes des composants de la machinerie RNAi ne provoque de phénotypes homéotiques et leur absence ne perturbe pas le recrutement des protéines PcG sur les chromosomes polyténiques (Grimaud *et al*., 2006a). L'hypothèse de Grimaud et ses collaborateurs est que les composants du RNAi influent sur l'organisation nucléaire des transgènes et des protéines PcG. Par des expériences d'hybridation de sonde ADN fluorescente *in situ* ou Fluorescent *in situ* DNA hybridization (FISH), ils montrent que l'appariement homologue des chromosomes portant les transgènes *Fab-7* dont dépend le phénomène de PSS, ne se fait plus dans les mutants RNAi. L'utilisation des techniques de fluorescence (lignées transgéniques où la protéine a été fusionnée avec la Green Fluorescent Protein (GFP) ou immunolocalisation avec des anticorps couplés à des marqueurs fluorescents) ont permis de dévoiler la distribution sub-nucléaire des protéines PcG. Lors du développement précoce, la protéine Ph fusionnée avec la GFP apparaît diffuse dans le noyau tandis que, plus le développement arrive à son terme, plus la protéine Ph-GFP s'accumule dans des points précis du noyau (Netter *et al*., 2001). Ainsi, les protéines PcG apparaissent par ponctuation à l'intérieur du noyau dans des territoires appelés « PcG bodies » (Buchenau *et al*., 1998; Ficz *et al*., 2005). Dans les disques imaginaux d'ailes de larve, les protéines impliquées dans le RNAi telles que la protéine PIWI apparaissent colocalisées avec la protéine PH. La conclusion de Grimaud est que l'association des

protéines PcG dans des compartiments du noyau précis est dépendante de la machinerie RNAi (Pour revue Mateos-Langerak et Cavalli, 2008). Toutefois, ces résultats sont nuancés par les résultats obtenus par Fedorova. Chez la larve de 3ème stade, l'association entre *Fab-7* endogène et le transgène *Fab-7* est observée dans un petit nombre de cellules alors que dans la majorité des cellules ils restent non associés. De ce fait, le PSS semble largement dépendre du type cellulaire. De plus, cette étude tend à remettre en cause l'existence de PcG bodies (Fedorova *et al*., 2008). Au vu de l'ensemble de ces résultats, la régionalisation des PcG au sein du noyau semble être complexe et dépendante du type cellulaire. L'effet du RNAi sur la compartimentation n'a pas été analysée par Fedorova et ses collaborateurs. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour savoir quel est le rôle des protéines RNAi dans le maintien de la répression par les PcG.

H. Glycosylation des PcG et TrxG.

Récemment, des études ont mis en lumière l'importance d'une modification post-traductionnelle dans la fonction des PcG et TrxG : la glycosylation beta-O-linked N-acétylglucosamine (O-GlcNAc) (Gambetta *et al*., 2009; Sinclair *et al*., 2009). L'enzyme responsable de cette modification sur les sérines et les thréonines des protéines est la O-linked N-acétylglucosamine transférase (OGT). Chez la drosophile, la protéine OGT est codée par le gène *super sex combs* (*sxc*). Les drosophiles portant des allèles perte de fonction du gène *sxc* présentent des phénotypes homéotiques caractéristiques des mutants *PcG*. L'analyse de la fixation des protéines modifiées O-GlcNAc grâce à des anticorps dirigés contre cette modification sur les chromosomes polyténiques et sur le génome de cellules des disques imaginaux de larves montrent que les protéines présentes sur les cibles des PcG portent la modification O-GlcNAc. Ph semble être la seule protéine de type PcG cible de l'enzyme OGT. Premièrement, l'absence d'OGT perturbe la fixation de la protéine Ph mais pas des protéines E(z) et Pho. Deuxièmement, Ph est la seule protéine parmi les protéines PcG testées qui soit glycosilée O-GlcNAc. En conclusion, la glycosylation O-GlcNAc de Ph est importante pour sa fonction de répression mais il reste à déterminer si Ph est le substrat majeur d'OGT et comment la O-GlcNAc de Ph contribue à sa fonction.

I. Mode d'action des PcG et TrxG.

Une fois recrutées sur leurs cibles, comment les protéines PcG et TrxG maintiennent-elles l'expression des gènes ?

1. Mode d'action des PcG.

Le modèle proposé pour le maintien de la répression par les PcG est résumé dans la figure 19. Les protéines capables de se lier à l'ADN telles que GAF et Pho recrutent les complexes PRC1, PRC2 et PhoRC présents en grande quantité sur leurs PRE/TRE cibles. Composé des protéines PHO et SFMBT, le rôle du complexe PhoRC n'est pas très clair. Klymenko et ses collaborateurs suggèrent que PhoRC est recruté sur les PRE pour vérifier l'environnement nucléosomal autour du PRE. Ensuite, PhoRC recrute les protéines Histones Méthyl Transférase telles que celles contenues dans le complexe PRC2 pour que les histones H3 deviennent tri-méthylées (Klymenko *et al*., 2006). Le rôle du complexe PRC2 est de configurer localement les histones autour du PRE/TRE afin que le complexe PRC1 puisse agir. Les histones déacétylases RPD3 et SIR2 enlèvent les groupements acétyles des histones qui sont associés à une transcription active (Tie *et al*., 2003; Furuyama *et al*., 2004) tandis que la protéine E(z) dépose les marques H3K9me3 et H3K27me3. La marque H3K27me3 est spécifiquement reconnue par le chromodomaine de la protéine Pc, membre du complexe PRC1 (Fischle *et al*., 2003). Lorsque les PRE/TRE sont localisés à plus de 10 kb du gène qu'il régule, de larges domaines de H3K27me3 et de protéines Pc pourraient être établis par la formation d'une boucle dans la chromatine, ce qui permettrait au complexe PRC2 de déposer des groupements tri-méthyle sur les histones H3 autour des gènes et des promoteurs (Nègre *et al*., 2006). Par exemple, le PRE *Frontabdominal 7* (*Fab-7*) régule le gène *Abd-B* alors qu'il est à 35 kb en formant une boucle dans la chromatine (Cléard *et al*., 2006). Le modèle d'action présenté ici doit être nuancé. Environ 15% des sites de fixation de la protéine Pc ne sont pas corrélés avec les H3K9me3 et K3K27me3 (Ringrose *et al*., 2004). Ce résultat suggère l'implication d'autres acteurs maintenant la répression.

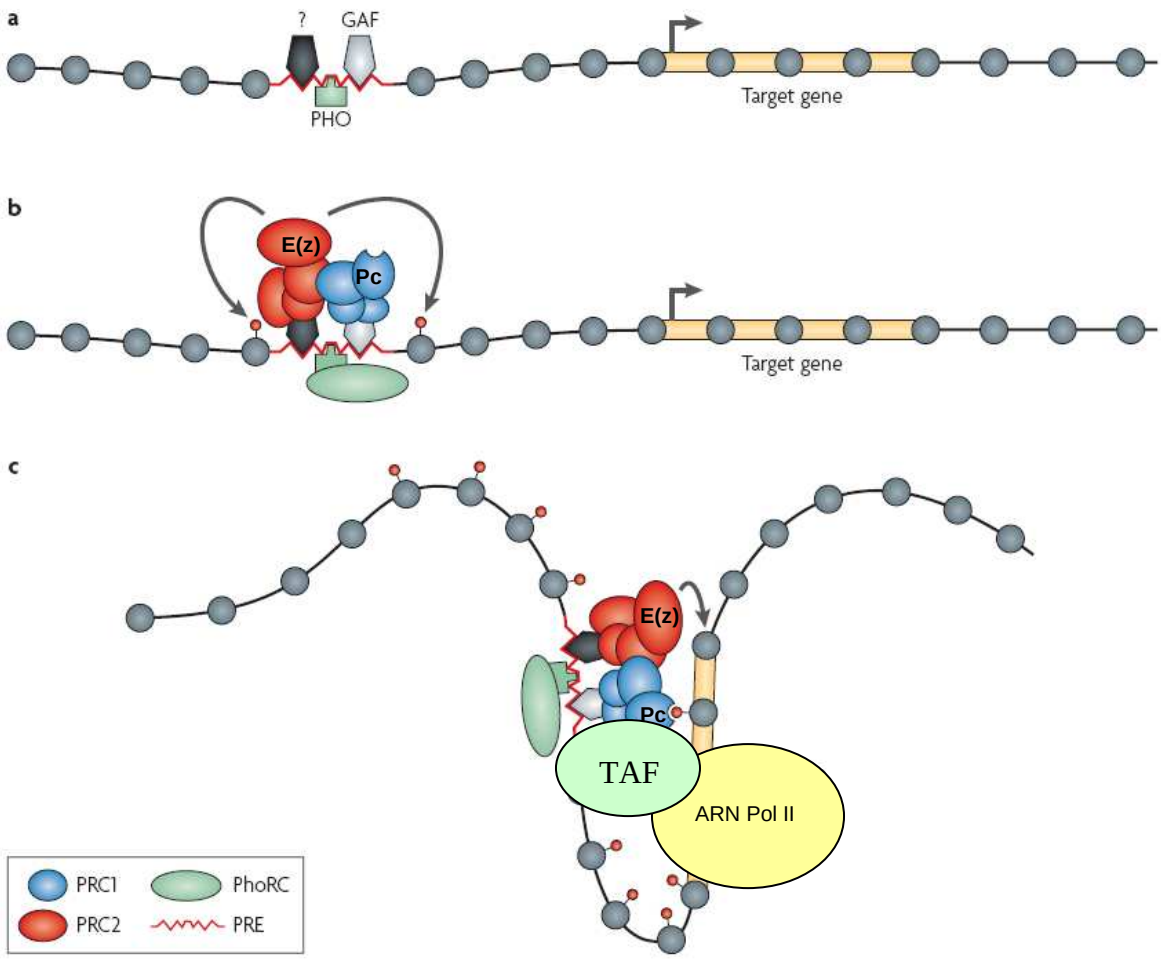


Figure 19: ***Modèle simplifié d'action des protéines PcG****. (**a**) Les protéines telles que PHO, GAF et d'autres protéines capables de liaison à l'ADN (symbolisées par ?) vont reconnaître et se lier au PRE (en rouge) qui est pauvre en nucléosomes (désignés par un rond gris). (**b**) Ces protéines vont recruter les complexes PRC1, PRC2 et PhoRC sur le PRE. La protéine E(z), issue du complexe PRC2, dépose un groupement tri-méthyle sur la lysine 27 des histones H3 adjacents au PRE (H3K27me3 symbolisé par un rond rouge au dessus du nucléosome). (**c**) La marque H3K27me3 est reconnue par la protéine Pc. L'extension de la méthylation des histones H3 se fait grâce à une boucle dans la chromatine. Cette configuration va permettre d'imposer la répression par le complexe PRC1 sur le gène cible. Par des interactions avec les TAF, les protéines PcG peuvent bloquer l'ARN Pol II sur le site d'initiation de la transcription et empêcher la transcription. Extrait de Schwartz et Pirrotta, (2007).*

Le complexe PRC1 va alors condenser la chromatine en bloquant l'accès aux complexes de remodelage de la chromatine. Il a été montré que, *in vitro*, PRC1 inhibe l'activité du complexe de remodelage de la chromatine humain SWI/SNF homologue du complexe BRM de drosophile. Le blocage du complexe SWI/SNF serait dû à une diminution de l'accessibilité à l'ADN (Francis *et al*., 2001). Des images obtenues par microscopie électronique montrent que le complexe PRC1 induit *in vitro* la condensation de la chromatine (Figure 20) (Francis *et al*., 2004).

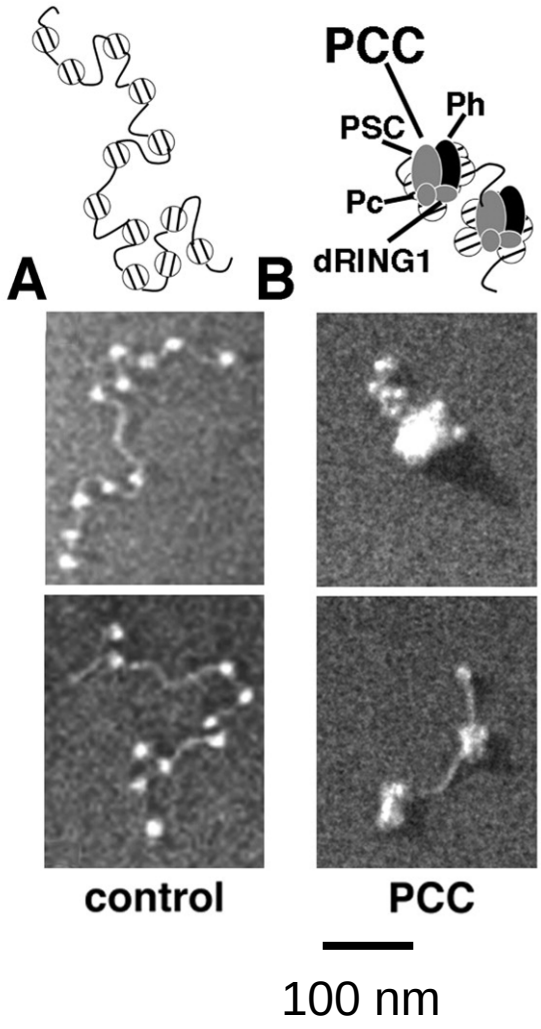


Figure 20 : ***Le complexe PRC1 altère la structure de la chromatine. Image en microscopie électronique de la fibre chromatienne****. A) chromatine seule. B) Compactage de la chromatine en présence du complexe cœur PRC1 (PCC). Extrait de Francis et al., (2004).*

Ainsi l'effet de PRC1 serait de rendre inaccessible l'ADN aux facteurs de transcription et à l'ARN polymérase II. Mais cette idée est mise à mal par plusieurs résultats. Premièrement, des études de digestion de l'ADN par des enzymes de restriction ont montré que l'ADN compacté par le complexe PRC1 était toujours accessible (Francis *et al*., 2001). Deuxièmement, la durée de vie du complexe PRC1 sur la chromatine est trop brève pour bloquer durablement l'accès à la chromatine (Ficz *et al*., 2005). L'inhibition due à PRC1 se ferait non pas en compactant la chromatine mais en inhibant l'initiation ou l'élongation de la transcription. Ainsi, des facteurs de transcription générale et l'ARN polymérase II ont été retrouvés sur des sites où sont présentes les protéines PcG (Breiling *et al*., 2001; Dellino *et al*., 2004). Le fait de retrouver les facteurs de transcription générale TAF associés physiquement avec le complexe PRC1 corrobore cette idée (Saurin *et al*., 2001).

2. Maintien de l'activation par les TrxG.

L'action des complexes TrxG est de maintenir la chromatine dans une configuration facilitant la transcription des gènes. Plusieurs activités liées au TrxG permettent de maintenir un état d'activation. L'état d'activation mis en place par les TrxG s'accompagne de l'acétylation des histones qui est associée aux régions de l'euchromatine où la transcription est active (Jenuwein et Allis, 2001). L'activité des HAT mènerait à une ouverture de la chromatine en déstabilisant l'interaction histones-ADN car l'acétylation des histones réduit leurs charges positives nettes ce qui diminue la force de l'interaction avec l'ADN qui est chargé négativement. Ainsi l'ADN serait plus accessible aux facteurs impliqués dans la transcription (Nightingale *et al*., 1998; Roth *et al*., 2001). Par exemple, l'acétylation des histones due au complexe TAC1 facilite l'élongation lors de la transcription des gènes *heatshock* après un choc thermique (Smith *et al*., 2004). La méthylation des histones est aussi une marque épigénétique associée à une activation de la transcription (Schneider *et al*., 2004). L'apposition de ces marques épigénétiques, aussi bien l'acétylation que la méthylation, permet le recrutement de plusieurs complexes de remodelage de la chromatine. Ainsi, les protéines BRM et Moira, du complexe de remodelage de la chromatine BRM, vont être recrutées sur leurs cibles via une interaction avec les histones méthylées H3K4 et H3K9 (Beisel *et al*., 2002). Le complexe TAC1 peut aussi recruter directement le complexe BRM via l'interaction entre Trx et la protéine Snr1 (Marenda *et al*., 2003). La marque H3K9me3, qui est spécifiquement reconnue par le domaine PHD de la protéine Nurf-301, permet le recrutement du complexe NURF (Li *et al*., 2006; Wysocka *et al*., 2006). GAF recrute le complexe de remodelage de la chromatine FACT sur les cibles des TrxG (Shimojima *et al*., 2003). Le rôle de ces complexes de remodelage de la chromatine est de faciliter le recrutement de la machinerie transcriptionnelle sur les gènes cibles des TrxG en déstabilisant les interactions entre l'ADN et les histones. Par exemple, GAF régule le positionnement des nucléosomes sur les promoteurs des gènes *heatshock* afin que les facteurs généraux de la transcription aient accès à l'ADN (Lu *et al*., 1993; Leibovitch *et al*., 2002).

En plus de faciliter l'accession de la machinerie transcriptionnelle à l'ADN, les protéines TrxG interagissent directement avec celle-ci. Par exemple, le complexe BRM interagit avec l'ARN Polymérase II (ARN Pol II) (Armstrong *et al*., 2002) alors que la protéine Kismet joue un rôle dans l'élongation de la transcription. Ainsi l'activité de l'ARN Pol II lors de l'élongation est réduite lorsque la protéine Kismet n'assure plus sa fonction. Le rôle de Kismet serait de recruter des facteurs aidant l'ARN POL II à ne pas faire de pause lors

de l'élongation (Srinivasan *et al*., 2008). La protéine GAF interagit avec la protéine TAF3 (TBP-associated factor 3) qui est membre du complexe général de transcription TFIID pour activer le gène *Ubx* en facilitant le recrutement de TFIID sur les cibles des TrxG (Chopra *et al*., 2008).

Plusieurs études sur les protéines TrxG laissent penser que leur rôle premier serait de contrer l'action des PcG plutôt que d'activer la transcription. Premièrement, la méthylation des histones due à la protéine ASH1 prévient la fixation des PcG sur les cibles des TrxG (Klymenko et Müller, 2004). Deuxièmement, une mutation perte de fonction dans le gène *kismet* augmente le niveau de méthylation H3K27me3 associé à la répression par les PcG. Possédant un chromodomaine, l'un des rôles de la protéine Kismet serait de prévenir l'extension des méthylations due au PcG (Srinivasan *et al*., 2008).Troisièmement, la protéine Lid (Little imaginal disc) interagit avec l'histone déacétylase RPD3 pour inhiber sa fonction (Lee *et al*., 2009).

J. Mémoire cellulaire au cours des divisons.

L'une des questions essentielles dans la régulation de l'expression des gènes par les protéines PcG et TrxG est : comment les profils d'expression maintenus par les PcG et TrxG parviennent-ils à être transmis au cours des divisons cellulaires ? Lorsque l'on enlève le produit des gènes *PcG* dans des clones de cellules somatiques de disques imaginaux, la répression des gènes homéotiques est abolie mais cette dérépression n'est pas identique pour toutes les protéines PcG. Lorsque la protéine PSC (du complexe PRC1) est enlevée, la dé-répression des gènes *Hox* est rapide intervenant au cours du premier cycle cellulaire tandis que la suppression de la protéine E(z) (complexe PRC2) mène à une dérépression plus lente puisque les gènes *Hox* continuent à être réprimés pendant deux cycles cellulaires. Si on restaure la quantité de protéines PSC après 48 heures, les gènes *Hox*, qui étaient jusqu'alors déréprimés, vont être re-réprimés. Les protéines PSC nouvellement exprimées reconnaîtraient des marques épigénétiques qui sont restés même après plusieurs divisons et rétabliraient la répression des gènes *Hox* (Beuchle *et al*., 2001). Ces expériences suggèrent qu'une mémoire de l'état d'expression des gènes subsiste même après la suppression de certaines protéines PcG. Par contre, les PRE/TRE sont indispensables au maintien de la répression par les PcG au cours des divisions. Si on supprime un PRE/TRE, la répression due au PcG est abolie durant le cycle cellulaire (Sengupta *et al*., 2004).

1. Lors de la réplication.

La réplication de l'ADN consiste à dupliquer l'ADN par une enzyme spécifique, l'ADN polymérase. La quantité d'ADN étant doublée, il faut assurer un état épigénétique identique aux deux chromatides synthétisées afin que les profils d'expression des gènes soient identiques dans les deux cellules filles après la mitose. Cette étape nécessitant l'ouverture de la chromatine, comment la fixation des protéines PcG et TrxG survit-elle à la réplication de l'ADN ? Plusieurs expériences récentes ont permis de mieux comprendre ce phénomène (pour revue Ng et Gurdon, 2008; Francis, 2009). Premièrement, les protéines PcG restent liées à la chromatine durant la réplication (Francis *et al*., 2009). En effet, *in vitro*, le complexe PRC1 n'est pas dissocié de la chromatine pendant la réplication mais il y reste associé puisque l'on retrouve PRC1 encore lié aux produits de la réplication. Par contre, si on incorpore le complexe PRC1 pendant la réplication, il ne se lie pas aux produits de réplication. Deuxièmement, l'apposition de la marque H3K27me3 est essentielle au renouvellement de la fixation des PcG après la réplication. Le rôle du complexe PRC2 est de déposer sur les histones nouvellement ajoutées la marque H3K27me3 (Hansen *et al*., 2008). Ces données ont conduit N. Francis à proposer le modèle suivant (Figure 21). Durant la réplication de l'ADN, les complexes PRC1 qui restent liés à la chromatine se distribuent équitablement entre les deux brins de chromatine synthétisés. Dans le même temps, les complexes PRC2 méthylent les histones H3 nouvellement incorporées dans la chromatine. Ensuite, la marque H3K27me3 facilite le recrutement des nouveaux complexes PRC1 sur les deux chromatides sœurs. Ainsi, le profil de fixation des protéines PcG est identique entre les deux brins de chromatine

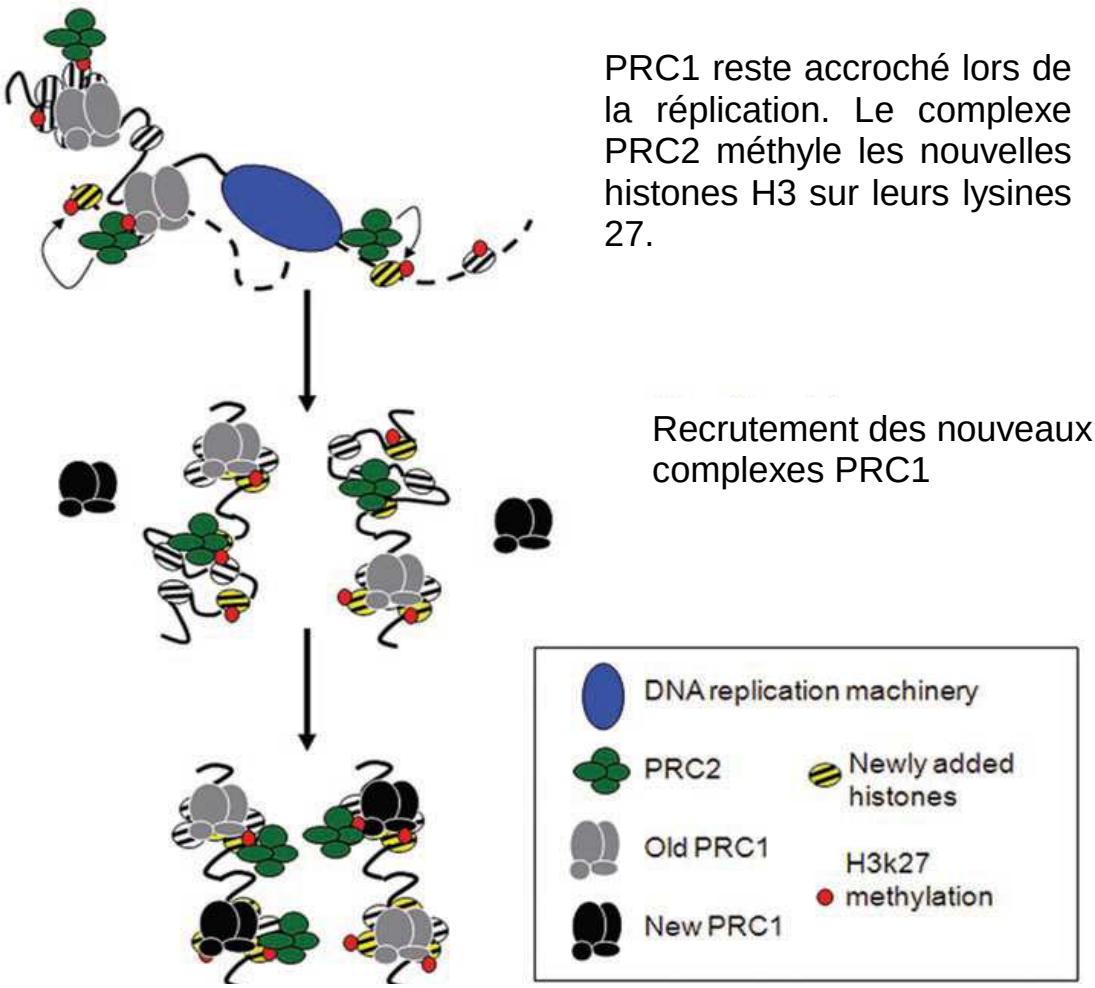


Figure 21: ***Modèle de recrutement des PcG lors de la réplication de l'ADN****. Extrait de Francis, (2009).*

Ce mécanisme de renouvellement des marques épigénétiques pourrait être couplé avec le renouvellement des variants d'histones spécifiques aux cibles des PcG et TrxG. On sait que le variant de l'histone H3 appelé H3.3 est retrouvé associé aux régions cibles des PcG et TrxG (Mito *et al.*, 2007). De plus, les variants d'histones portent aussi des modifications post-traductionnelles (McKittrick *et al.*, 2004). Ng et Gurdon propose un modèle pour le renouvellement des variants d'histones couplé avec les protéines TrxG (Figure 22) (Ng et Gurdon, 2008). Dans le cas d'un gène actif régulé par les TrxG, l'environnement chromatinien des gènes serait composé de nucléosomes contenant des H3.3 modifiées post traductionnellement par les TrxG. Lors de la réplication, il y aurait une distribution aléatoire des histones H3.3 marquées et des nouvelles histones H3 seraient incorporées. Après la réplication, les histones H3.3 marquées recrutent sur le gène cible les protéines TrxG qui « scannent » l'environnement chromatinien et permettent le remplacement par la protéine

chaperonne HIRA des histones H3 en histones H3.3 qui sont immédiatement marquées par les TrxG. Ainsi les profils de variants d'histones et de méthylation de ces histones sont identiques entre les deux chromatides sœurs.

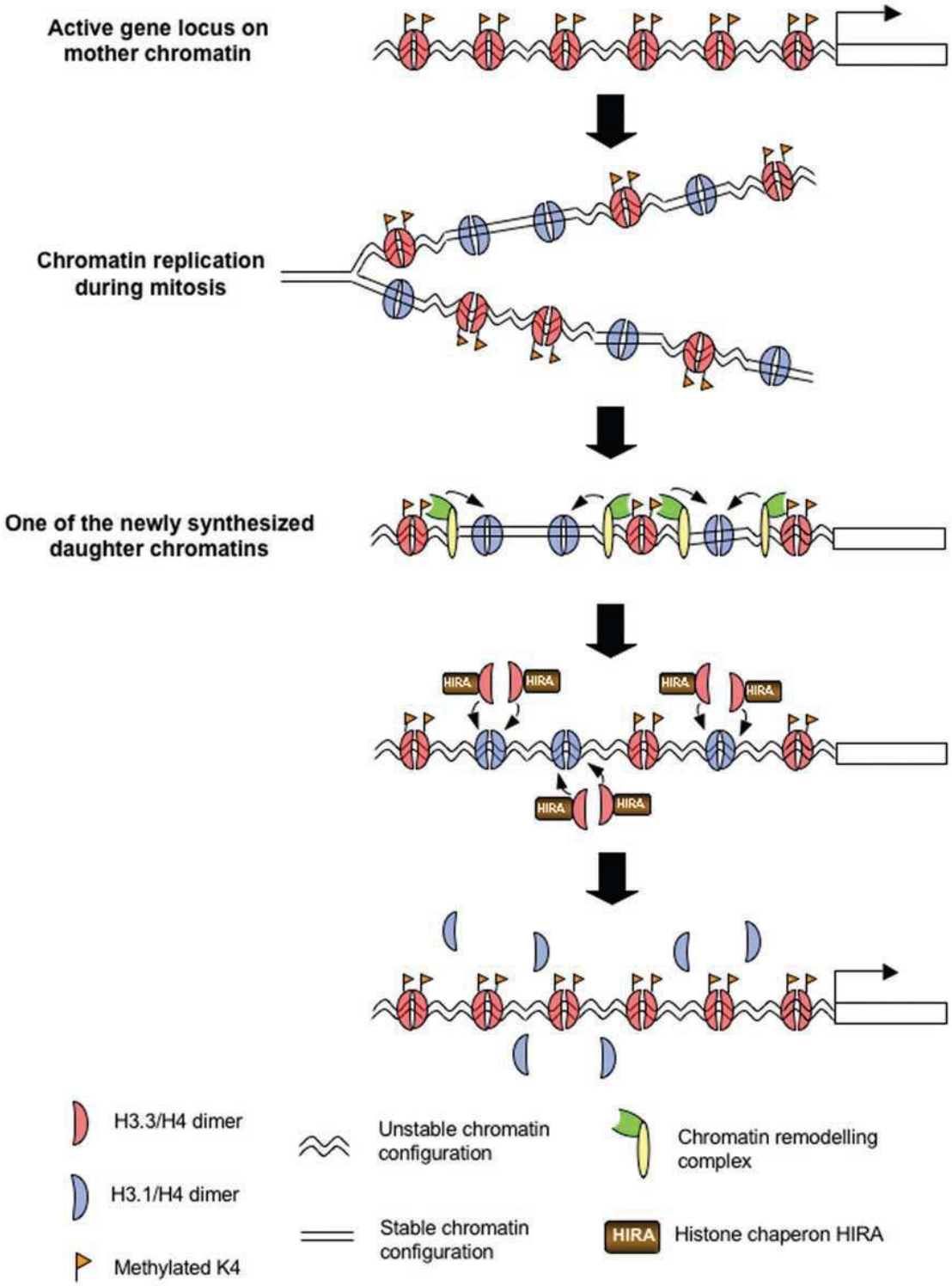


Figure 22: ***Modèle de mémoire cellulaire les TrxG par Ng et Gurdon****, (2008).*

2. Lors de la mitose.

Après la réplication, la cellule enclenche la division cellulaire. Les protéines PcG tels que Pc, PSC, PH et RING ne sont pas associées au chromosome mitotique ; néanmoins la protéine PH reste accrochée en faible quantité au chromosome en métaphase (Buchenau *et al*., 1998; Miyagishima *et al*., 2003). Ces protéines doivent être importantes pour l'établissement de la répression après la mitose mais semblent insuffisantes. L'hypothèse avancée est que la mémoire cellulaire est assurée par les marques épigénétiques des histones déposées par les PcG et les TrxG telles que l'acétylation et la méthylation qui survivent à la mitose. Par exemple, les histones acétylées ont été trouvées associées de manière stable aux chromosomes en mitose (Cavalli et Paro, 1998, 1999). Ces marques permettraient le recrutement rapide des PcG et TrxG après la mitose conservant ainsi l'état épigénétique du gène. Une autre hypothèse est que les protéines ETP capables de se lier à l'ADN telles que PHO/PHOL, GAF ou Zeste, restent accrochées aux chromosomes en mitose et permettent le recrutement rapide des complexes PcG. Pour ce faire des expériences similaires à celles effectuées pour Pc et Ph devraient être entreprises pour les protéines ETP.

K. Les gènes cibles des protéines PcG et TrxG.

Les premières expériences d'imunolocalisation montrent que les protéines PcG et TrxG se fixent sur plus de 100 bandes discrètes sur les chromosomes de glandes salivaires (Rastelli *et al*., 1993; Chinwalla *et al*., 1995; Tripoulas *et al*., 1996; Sinclair *et al*., 1998). Ces résultats indiquent que les PcG et TrxG ne sont pas des régulateurs généraux du génome. Les approches d'immunoprécipitation de la chromatine couplées avec des puces à ADN ont permis de savoir quels étaient les types de gènes cibles des protéines PcG (Figure 23) (Nègre *et al*., 2006; Tolhuis *et al*., 2006; Schuettengruber *et al*., 2007, 2009). La protéine PH régule 243 gènes sur le génome de l'embryon de drosophile (Schuettengruber *et al*., 2009). Beaucoup de ces gènes cibles sont des facteurs de transcription impliqués dans le développement embryonnaire. Ainsi, Schuettengruber et ses collaborateurs ont listé les gènes régulés par les PcG et impliqués dans la mise en place des axes dans l'embryon. Par exemple, les gène de polarité de segment *engrailed* et *hedgehog* avaient déjà été identifiés comme cibles des PcG et TrxG (Kassis, 1994; Randsholt *et al*., 2000; Maurange et Paro, 2002). Les PcG contrôlent leur propre expression : un PRE/TRE lié par la protéine PH a été identifié à proximité du gène *ph-proximal* (Bloyer *et al*., 2003). PH a été identifiée aussi comme régulant les gènes impliqués dans l'ovogénèse (Narbonne *et al*., 2004). La plupart des gènes régulant le développement de l'œil sont des cibles des PcG (Schuettengruber *et al*., 2007), confirmant

les études déjà menées où les PcG et les TrxG régulent les gènes *homothorax*, *eyes absent* et *dachshund* (Ringrose *et al*., 2003; Janody *et al*., 2004). Un autre exemple avec la protéine Pc qui a été identifiée comme un régulateur des gènes spécifiques de la spermatogénèse (Chen *et al*., 2005). Récemment, les gènes impliqués dans les voies de signalisations JAK/STAT et NOTCH impliquées dans le développement embryonnaire ont été identifiés comme des cibles des protéines PcG (Classen *et al*., 2009; Martinez *et al*., 2009). Les cibles des PcG et TrxG semblent être majoritairement des gènes impliqués dans le développement de la drosophile bien que d'autres rôles ont été décrits tels que le contrôle du cycle cellulaire (Martinez *et al*., 2006).

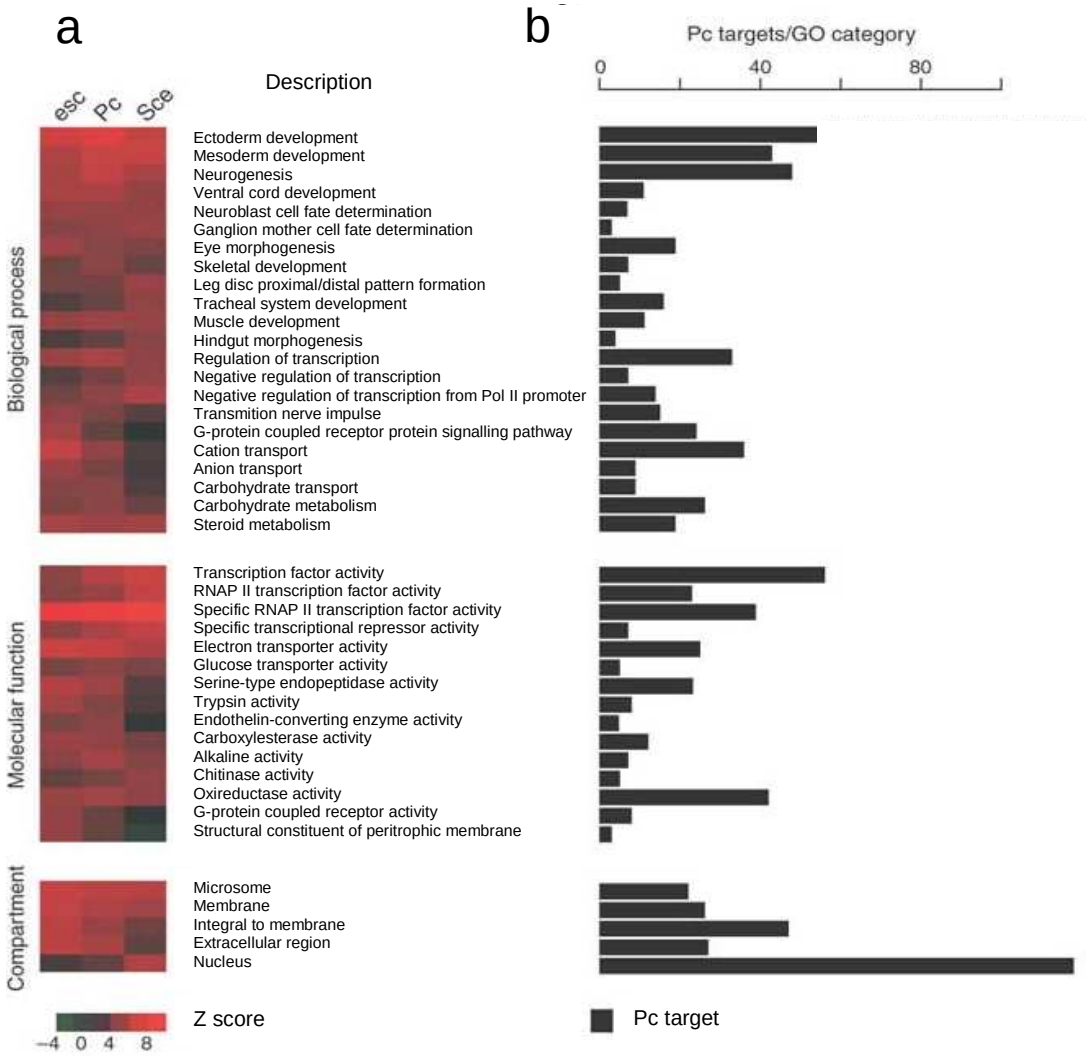


Figure 23 : ***Les gènes cibles des protéines Esc, Pc et Sce dans les cellules Kc de drosophile****. (a) Gene Ontology (GO) des cibles des protéines PcG. (**b**) Nombre de gènes cibles pour chaque catégorie. Extrait de Tolhuis et al., (2006).*

L. Evolution des protéines Polycomb et Trithorax.

1. Conservation des protéines PcG et TrxG

Les gènes *PcG* et *trxG* ont été conservés au cours de l'évolution (Tableau 5) (Pour revue Köhler et Villar, 2008; Schuettengruber *et al*., 2007; Whitcomb *et al*., 2007). Les protéines E(z) et ESC, apparaissent comme les mieux conservées. Par exemple, seuls ces deux gènes possèdent des homologues chez *C.elegans* (Holdeman *et al*., 1998; Korf *et al*., 1998). Ces protéines ont aussi leurs homologues chez les mammifères avec les protéines Enhancer of zeste homolog 1 et 2 (EZH) et la protéine Embryonic Ectoderm Development (EED) (Kuzmichev *et al*., 2005). Chez la plante *Arabidopsis thaliana*, les homologues de la protéine E(z), CURLY LEAF (CLF) et MEDEA (MEA) régulent le développement embryonnaire (Pien et Grossniklaus, 2007). Les complexes sont également conservés. Chez les mammifères, trois complexes similaires à PRC2 ont été purifiés. Ils contiennent différentes isoformes de la protéine EED, l'homologue de la protéine ESC (Kuzmichev *et al*., 2004, 2005). Par contre, les gènes composant le complexe PRC2 sont absents chez les levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe* (Schuettengruber *et al*., 2007). Les composants du complexe PRC1 sont aussi conservés. Par exemple PRC1 été purifié chez les mammifères à partir de cellules HeLa (Levine *et al*., 2002). Le cœur du complexe, similaire à celui trouvé chez la drosophile, contient les protéines CBX 2,4 et 6, HPH1, 2 et 3, RING1A et RING1B, BMI1 et MEL18 correspondant respectivement aux protéines PC, PH, dRING et PSC. Par contre, le complexe PRC1 est absent chez les plantes car le gène Pc n'a pas d'homologue dans le génome d'*Arabidopsis thaliana* (Whitcomb *et al*., 2007). Bien que les gènes homologues de *Pho* et *sfmbt* soient présents chez les mammifères et régulent les gènes homéotiques (Atchison *et al*., 2003; Wu *et al*., 2007), le complexe PHORC n'a pas été retrouvé (Köhler et Villar, 2008). La plupart des gènes *trxG* présents chez la drosophile ont leurs homologues chez les champignons, les plantes et les animaux (Schuettengruber *et al*., 2007). Le complexe de remodelage de la chromatine BRM chez la drosophile est l'homologue du complexe SWI2/SNF2 initialement identifié chez la levure et également présent chez les mammifères (Mohrmann et Verrijzer, 2005). Le gène *trx* est l'homologue du gène *mixed lineage leukemia* (*Mll*) présent chez les mammifères, mais les membres du complexe TAC1, isolés à partir de la protéine Trx, sont différents de ceux purifiés à partir de la protéine MLL (Schuettengruber *et al*., 2007). *Arabidopsis Trithorax1* (*ATX1*), l'homologue de *trx*, est impliqué dans la régulation des gènes homéotiques (Pien et Grossniklaus, 2007).

Tableau 5 : ***Les protéines PcG et TrxG chez la drosophile et leurs homologues chez les mammifères.***

Nom	Abréviation	Homologue mammifère
Les protéines PcG et leurs homologues mammifères		
Polycomb	PC	Cbx2, Cbx4,Cbx6, Cbx7,Cbx8
Polyhomeotic Distal	PHD	PHC1,PHC2,PHC3
Polyhomeotic Proximal	PHP	PHC1,PHC2,PHC3
Sex Combs Extra/dRing	dRING	RING1A, RING1B
Posterior sex combs	PSC	BMI1, MEL18
Sex Comb on Midleg	SCM	SCMH1
Heat Shock Protein Cognate 4	HSC70-4	HSPA8
Enhancers of Zeste	E(Z)	EZH1, EZH2
Extra Sex Combs	ESC	EED
ESC-Like	ESCL	EED
Polycomb-like	PCL	MTF2, PHF19
Supressor of zeste 12	SU(Z)12	SUZ12
RPD3		HDAC1
Pleihomeotic	PHO	YY1, YY2
Pleiohomeotic like	PHOL	YY1, YY2
Scm-related gene containing four mbt domains	dSFMBT	L3MBTL2
Les protéines TrxG et leurs homologues mammifères		
Trithorax	TRX	MLL1
CREB-Binding Protein	CBP	p300
SBF1	-	SBF1
Brahma	BRM	SMARCA4
Moira	MOR	SMARCC1, SMARCC2
Osa	-	ARID1B
Snf5 related 1	SNR1	SMARCB1
GAGA factor	GAF	-
SPT16	-	SPT16
structure specific recognition protein 1	SSRP1	SSRP1
Absent, small, or homeotic discs 1	ASH1	ASH1L
Absent, small, or homeotic discs 2	ASH2	ASH2L

2. Les PRE/TRE chez les vertébrés.

Jusqu'à cette année, aucun PRE/TRE n'avait été identifié dans d'autres organismes que les drosophilidae. L'identification des PRE/TRE chez les mammifères semblait être difficile car peu des protéines capables de se lier à l'ADN et recrutant les complexes PcG et TrxG chez la drosophile ont été conservées chez les mammifères. Par exemple les protéines GAF, Pipsqueak et Zeste n'ont pas d'homologue. Seule la protéine de drosophile Pho a pour homologue les protéines YIN-YANG-1 et 2 (YY1). YY1 interagit avec les complexes mammifères similaires à PRC1 et PRC2 (García *et al*., 1999; Satijn *et al*., 2001) afin de les recruter sur leurs cibles (Wilkinson *et al*., 2006). Le système de recrutement des complexes PcG et TrxG par un ensemble de protéines ETP n'avait pas été conservé et semblait spécifique à la drosophile. Chez les mammifères, le recrutement se ferait par des mécanismes différents (Schwartz et Pirrotta, 2007). Récemment, Sing et ses collaborateurs ont identifié une séquence PRE chez la souris. Le PRE mammifère est issu d'une séquence appelée *Kreisler* (*Kr*) permettant l'expression régionalisée de gènes de segmentation. L'inversion de cette séquence dans le chromosome provoque une mauvaise expression des gènes qu'il contrôle. Le PRE *Kr* a été défini fonctionnellement par des expériences de transgénèse chez la drosophile puis chez la souris (Sing *et al*., 2009). Tout comme pour les PRE chez la drosophile, le PRE/TRE *Kr* permet le recrutement des protéines Bmi1 et SUZ12 homologues à PSC et Su(z)12 chez la souris lorsque le gène est réprimé. Ce travail démontre que le mécanisme de recrutement des PcG et TrxG est similaire chez la drosophile et chez la souris. Le fait de définir un PRE de mammifère chez la drosophile montre qu'il y a une conservation du mécanisme d'action des PcG et TrxG entre la drosophile et les mammifères. Cette conservation fonctionnelle avait déjà été observée avec les protéines homologues. Par des expériences de sauvetage, une protéine homologue d'origine mammifère peut compenser une mutation de son gène correspondant chez la drosophile. Par exemple M33 (cbx 2) de souris peut sauver le phénotype mutant perte de fonction *Pc* chez la drosophile (Müller *et al*., 1995). Toutefois cette conservation fonctionnelle a des limites. Bien que l'expression du transgène contrôlé par *Kr* soit perturbée en contexte mutant pour les gènes *PcG* et le gène *trl* (GAF), il n'y aucun effet des mutants du complexe BRM sur l'expression du transgène, pourtant le complexe BRM a son homologue chez la souris (Tamkun *et al*., 1992).

Bien qu'identifiant un PRE chez la souris, ce travail ne répond pas à certaines questions essentielles du recrutement des PcG et TrxG chez la souris. L'analyse de la séquence du PRE *Kr* montre de nombreux sites de fixation pour la protéine YY1/Pho et la

protéine GAF (*Trl*). Chez la drosophile, les mutations perte de fonction *pho* et *trl* affectent l'expression du transgène contrôlée par *Kr*. Mais les auteurs ne se sont pas intéressés à l'effet d'YY1 sur le recrutement des PcG sur les PRE et aux effets des séquences de fixation de GAF chez la souris. L'analyse de l'effet des séquences du PRE sur le recrutement des PcG et TrxG permettra certainement de mieux comprendre le recrutement des PcG et TrxG chez les mammifères.

II. Les rôles biologiques de la protéine DSP1.

L'équipe dans laquelle j'ai effectué ma thèse s'intéresse au rôle biologique de la protéine Dorsal Switch Protein 1 (DSP1) chez *Drosophila melanogaster*. DSP1 appartient à la famille des protéines High Mobility Group B (HMGB).

A. Présentation de la protéine DSP1.

1. La structure primaire de DSP1.

Le gène *dsp1*, porté par le chromosome X à la position 14B14-14B15, code une protéine de 386 acides aminés et d'une masse moléculaire de 44 kDa (Canaple *et al*., 1997). La structure primaire, présentée dans la figure 24, peut être divisée en deux.

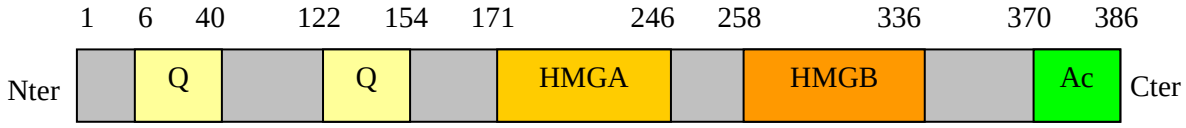


*Figure 24: **Schéma de la structure primaire la protéine DSP1**. Q : Correspond aux régions riches en résidus glutamine. HMG A et B : Boîtes High Mobility Group. Ac : correspond à la région riche en acides aminés acides.*

A l'extrémité N-terminale, la protéine DSP1 possède deux régions d'une trentaine d'acides aminés riches en glutamine. Retrouvée spécifiquement chez les diptères, le rôle de cette partie dans la fonction de la protéine DSP1 n'est pas connu (Sessa et Bianchi, 2007). La seconde partie est composée de deux boîtes HMG désignées par A et B et d'une queue acide. Cette seconde moitié présente une forte homologie avec les protéines HMGB 1 et 2 de mammifère (Lehming *et al*., 1994). Les boîtes HMG A et B de DSP1 possèdent respectivement 70% et 40% d'identité avec les domaines correspondants de la protéine HMGB1 humaine. La queue acide de la protéine DSP1 est plus courte que la protéine HMGB1. Le rôle des boîtes HMG A

et B a été étudié au sein de l'équipe. Celles-ci sont responsables de la liaison à l'ADN et participent également aux interactions entre DSP1 et ses partenaires protéiques (Decoville *et al*., 2000; Daulny *et al*., 2003; Salvaing *et al*., 2006)..

2. La famille des protéines HMGB.

Les protéines classées dans la famille des protéines HMGB ont toutes un ou plusieurs motifs spécifiques appelés boîtes HMG (HMG Box) (Pour revue Thomas et Travers, 2001; Stros *et al*., 2007). La famille HMGB, classée selon le nombre de boîtes HMG et la spécificité de séquence, est subdivisée en deux classes (Soullier *et al*., 1999). La première classe comprend les protéines reconnaissant l'ADN sans spécificité de séquence et possédant au moins deux boîtes HMG et une queue acide C-terminale. Chez les mammifères, ce groupe comprend les protéines HMGB1 à 3 qui possèdent deux boîtes HMG et une partie C-Terminale riche en résidus acides. Chez la drosophile, 26 protéines à boîtes HMG sont répertoriées (Tableau 6) dont la protéine DSP1 qui est l'homologue de la protéine HMGB1 de mammifère (Canaple *et al*., 1997). Les protéines HMGD et HMGZ exprimées chez la drosophile sont assimilées à cette famille bien qu'elles n'aient qu'une seule boîte HMG (Ragab *et al*., 2006). Les facteurs de transcription Upstream Binding Factor (UBF) (Jantzen *et al*., 1990) et le facteur de transcription mitochondrial Transcription Factor A Mitochondrial (TFAM) (Kang *et al*., 2007) contenant respectivement 6 et 2 boîtes HMG, font également partie de ce groupe.

La seconde classe rassemble des protéines n'ayant pour la plupart qu'une seule boîte HMG et se liant de manière spécifique à l'ADN. Ce sont des régulateurs transcriptionnels exprimés dans certains tissus. Par exemple, le facteur Sex determining Region Y (SRY), déterminant le sexe mâle chez les mammifères (Sinclair *et al*., 1990), fait partie d'un groupe de protéines HMG, la famille des SOX jouant un rôle important au cours du développement embryonnaire (Kiefer, 2007). On peut citer les facteurs de transcription spécifique T Cell Factor 1 (TCF) et Lymphocyte Enhancer Factor-1 (LEF1) impliqués dans la voie de signalisation Wnt/Wg (Hurlstone et Clevers, 2002). La protéine Pangolin, homologue de TCF1 chez la drosophile, est également impliquée dans la voie Wg (Waltzer et Bienz, 1999).

Tableau 6 : ***Les protéines à boîtes HMG chez Drosophila melanogaster****.*

	Nom
1	bobby sox
2	CG4617
3	CG5591
4	CG7045
5	CG7046
6	CG9418
7	CG12104
8	capicua
9	Dichaete
10	dalao/BAP111
11	Dorsal switch protein 1
12	High mobility group protein D
13	High mobility group protein Z
14	maelstrom
15	pangolin
16	polybromo
17	RNA polymerase I subunit
18	Sox box protein 14
19	Sox box protein 15
20	Sox21a
21	Sox21b
22	Sox100B
23	Sox102F
24	SoxNeuro
25	Structure specific recognition protein
26	mitochondrial transcription factor A

Le domaine HMG composé de 80 acides aminés est impliqué dans la liaison avec l'ADN. La structure tridimensionnelle des boîtes HMG de la protéine de mammifères HMGB1 a été résolue par RMN (Figure 23). Il est caractérisé par une structure tertiaire en forme de L impliquant 75 % des acides aminés du domaine. Les 3 hélices α et la région N-terminale se replient en deux bras formant un angle de 80° entre eux (Weir *et al*., 1993; Read *et al*., 1993; Hardman *et al*., 1995). La structure des boîtes HMG d'autres protéines a été obtenue (LEF-1 (Love *et al*., 1995), SRY (Murphy *et al*., 2001), NHP6A (Masse *et al*., 2002) et HMGD (Murphy *et al*., 1999)) montrant une conservation structurale du domaine HMG. Les structures des boîtes HMG A et B de la protéine HMGB1 complexée avec l'ADN montrent qu'elles interagissent avec le petit sillon de l'ADN (Figure 23).

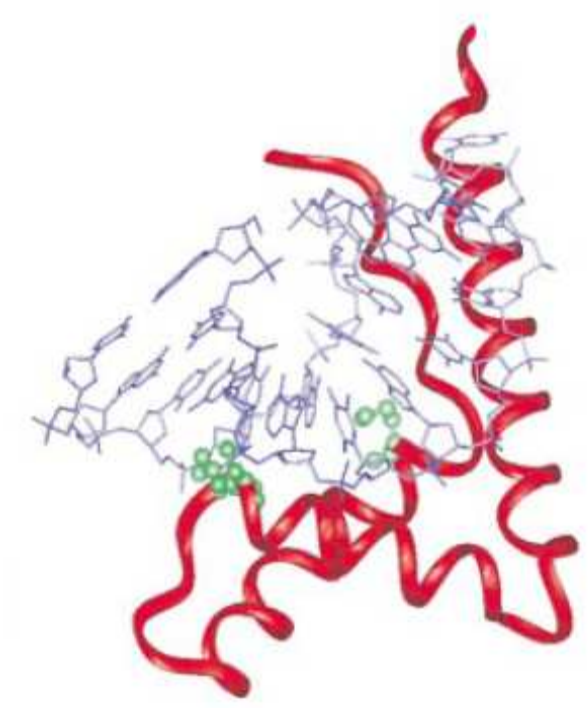


Figure 23: ***Structure de la boîte HMG de la protéine HMG-D de Drosophila melanogaster en complexe avec un ADN double brin****. Extrait de Thomas et Travers, (2001).*

La face concave du domaine HMG interagit avec le petit sillon de l'ADN. Les résidus d'acides aminés hydrophobes se positionnent à l'intérieur du sillon et une série de résidus basiques interagit avec le squelette phosphodiester. Certains acides aminés hydrophobes de cette face concave s'intercalent partiellement entres les bases provoquant l'élargissement du petit sillon avec pour conséquence de dérouler la double hélice et d'augmenter la courbure de l'ADN vers le grand sillon (Murphy *et al*., 1999). La structure d'une protéine chimérique composée de deux boîtes HMG (la boîte A de la protéine HMGB1 a été remplacée par la boîte de la protéine SRY) montre que les acides aminés faisant le lien entre les deux boîtes HMG s'intercalent dans le petit sillon de l'ADN (Stott *et al*., 2006). La structure 3D de la protéine HMGB1 entière n'a pas encore été obtenue.

3. *Expression de la protéine DSP1* chez Drosophila melanogaster.

La protéine DSP1 et son ARN messager ont été recherchés à différents stades du développement de la drosophile (Figure 25).

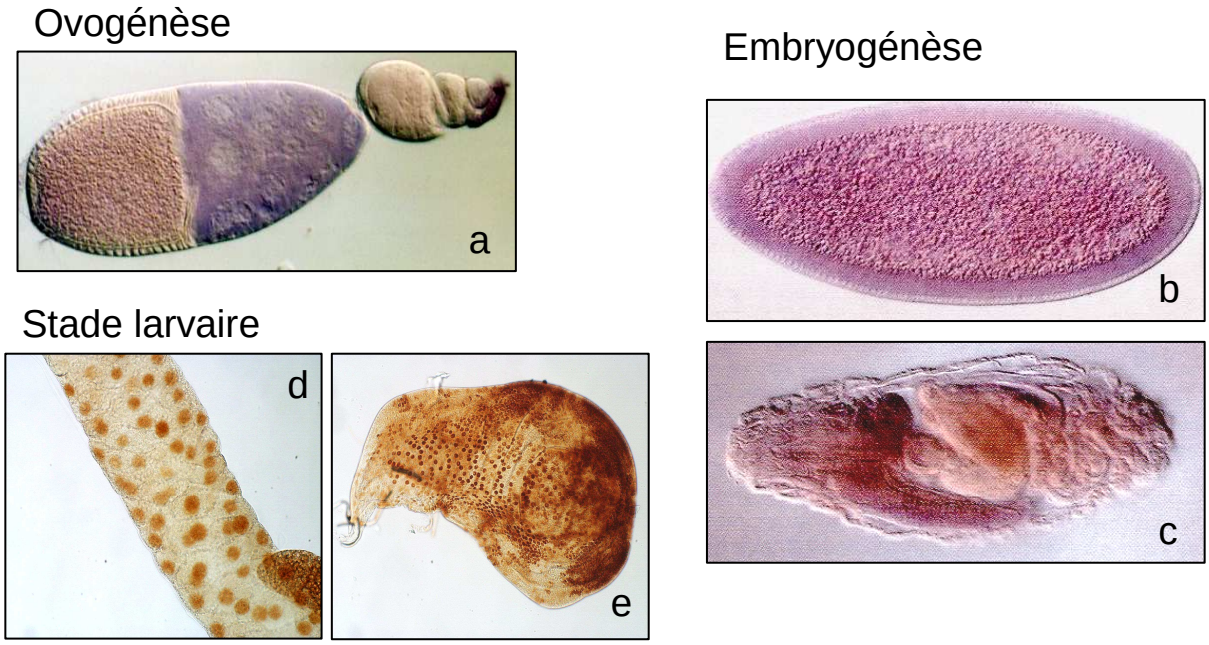


*Figure 25**: Expression du gène dsp1 chez Drosophila melanogaster.** (**a**) Distribution de la protéine DSP1 au cours de l'ovogénèse dans les cellules nourricières. (**b** et **c**) Distribution de l'ARNm dsp1 dans l'embryogénèse. (**b**) Embryon dans un stade précoce de division. L'ARNm dsp1 apparaît exprimé de manière ubiquitaire. (**c**) Embryon terminant son développement après l'organogénèse (Stade 16). **a**,**b** et **c** extrait de Mosrin-Huaman et al., (1998). (**d** et **e**) Distribution de la protéine DSP1 dans une glande salivaire (**d**) et dans un disque imaginal d'aile (**e**) de larve de troisième stade.*

Au cours de l'ovogénèse, la protéine DSP1 est exprimée dans les cellules nourricières (**25a**). Puis elle est déversée dans l'ovocyte. Aux stades les plus précoces de l'embryogénèse (stades 1 à 6), la protéine DSP1 d'origine maternelle est présente dans tout l'embryon (**25b**). L'ARNm zygotique *dsp1* est synthétisé et traduit au stade blastoderme cellulaire. Au fur et à mesure de l'avancée du développement, l'expression de protéine DSP1 se restreint à l'épiderme et au système nerveux central (**25c**). Chez la larve, la protéine DSP1 est détectée dans le cerveau, les glandes salivaires (**25d**) et les disques imaginaux (**25e**). Chez l'adulte, la protéine DSP1 est exprimée dans le cerveau et dans les cellules nourricières des ovaires (Mosrin-Huaman *et al.*, 1998).

B. Le rôle de la protéine DSP1 dans la régulation des gènes.

Pour comprendre le rôle biologique de la protéine DSP1 chez la drosophile, une mutagénèse à l'élément P a été effectuée permettant l'obtention d'un mutant nul pour le gène *dsp*1. L'allèle noté *dsp1*^{1} a perdu uniquement l'ensemble du gène *dsp1*. A l'état homozygote, les drosophiles sont peu viables, peu fertiles et montrent un phénotype pléiotrope (Mosrin-Huaman *et al*., 1998; Decoville *et al*., 2001). Les mutants *dsp1*^{1} montrent des transformations homéotiques suggérant une implication de la protéine DSP1 dans la régulation des gènes homéotiques.

1. DSP1 participe à la régulation des gènes homéotiques.

a) *dsp1* est un *ETP*.

Les transformations homéotiques observées chez le mutant *dsp1*^{1} sont les suivantes (Figure 26) (Decoville *et al*., 2000):

- La transformation du segment T3 en segment thoracique T2 c'est-à-dire la transformation de l'haltère en aile. Cette transformation intervient chez 3 individus sur 1000. Ce phénotype mime des mutations perte de fonction du gène homéotique *Ubx*.
- La transformation de la patte T1 en patte T2 se caractérisant par une diminution du nombre de dents du peigne sexuel sur la patte T1. Les mâles hémizygotes *dsp1*^{1} ont 6 dents par peigne contre 11 dents par peigne chez les mâles sauvages. Tous les mâles *dsp1*^{1} sont affectés. Ces mutations ressemblent à des mutations observées chez les mutants perte de fonction pour le gène homéotique *Scr*.
- La transformation du segment abdominal A6 en A5. Des soies apparaissent sur le sternite A6 pour 20% des mâles *dsp1*^{1}. Ce phénotype traduit une dérégulation du gène *Abd-B*.
- La transformation du segment abdominal A4 en segment A5. La moitié des mâles présente des taches pigmentées sur le tergite A4 qui sont normalement présentes sur le tergite A5. Ce phénotype est caractéristique d'une mutation gain de fonction du gène *Abd-B*.

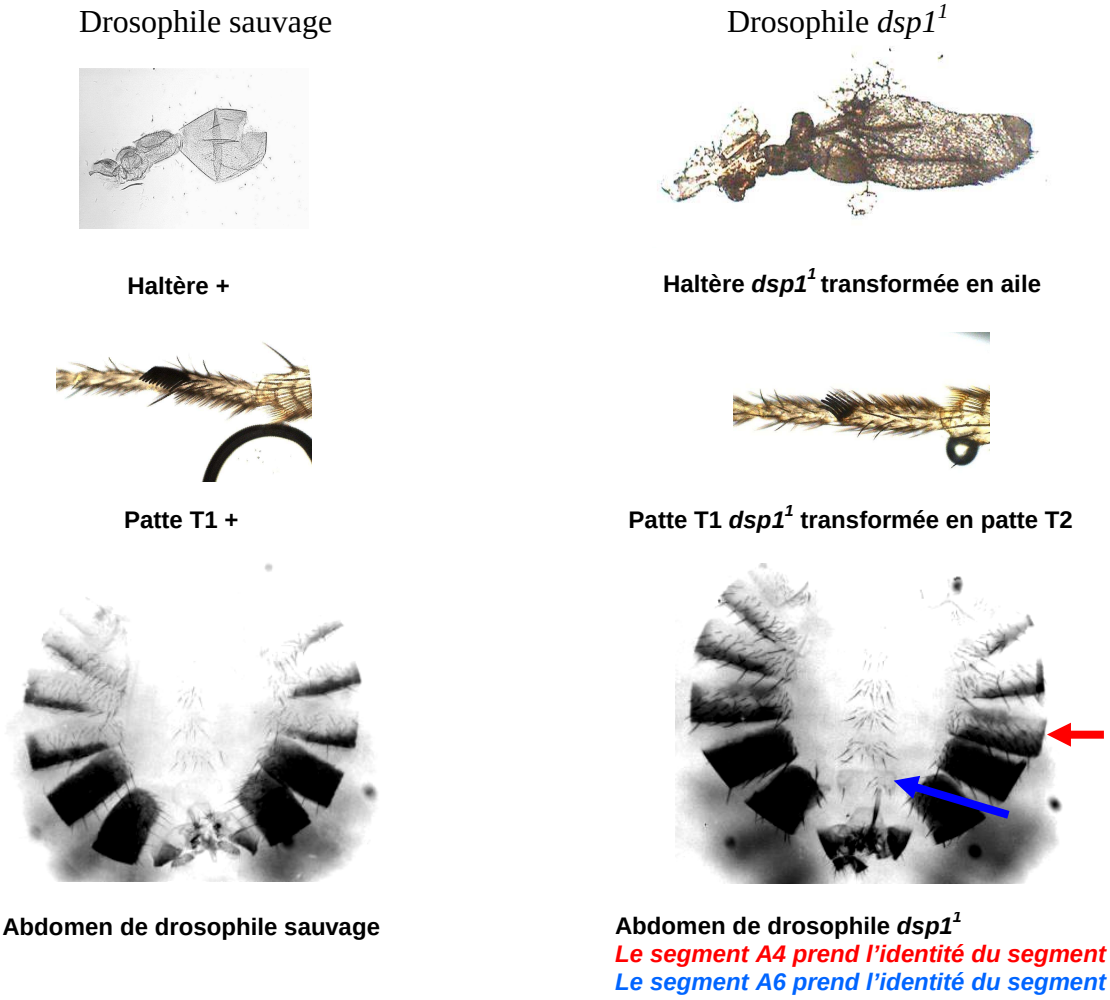


Figure 26 : ***Les différentes transformations homéotiques observées chez le mutant dsp1¹.***

Les trois premières transformations présentées miment des mutations perte de fonction de différents gènes homéotiques *Ubx*, *Scr* et *Abd-B*. Il a été montré que l'expression du gène *Scr* diminue très fortement dans un contexte mutant *dsp1¹*. De plus, des études d'interactions génétiques entre l'allèle *dsp1¹* et des allèles perte de fonction des gènes *Ubx*, *Scr* et *Abd-B* montrent que la fréquence et la « force » des phénotypes décrits ici sont augmentées. Cela prouve que la protéine DSP1 participe au maintien de l'activation des gènes homéotiques. Cette idée est confortée par le fait que l'allèle *dsp1¹* interagit génétiquement avec des allèles perte de fonction des gènes *trxG*, *trx* et *ash1* en augmentant la fréquence des phénotypes de type *trxG*. A l'inverse, la mutation *dsp1¹* supprime en partie le phénotype caractéristique de la mutation perte de fonction du gène *PcG*, *Pc*. Donc la protéine DSP1 appartient au groupe TrxG.

Mais le dernier trait phénotypique présenté par le mutant *dsp1*^{1} est corrélé à une mutation gain de fonction du gène homéotique *Abd-B*. Cette transformation ressemble à des mutations touchant la région *MCP*. *MCP* est une séquence de 300 pb permettant aux régions de régulation *iab4* et *iab5* des gènes *abd-A* et *Abd-B* de fonctionner indépendamment (Karch *et al*., 1994). Une délétion dans cette région entraîne une expression ectopique du gène *Abd-B* dans le segment A4 provoquant une pigmentation de celui-ci. Ici, la mutation *dsp1*^{1} se comporte comme une mutation de type PcG.

Malgré son rôle TrxG qui semble prépondérant, DSP1 se comporte soit comme une protéine TrxG, soit comme une protéine PcG selon le locus considéré. Pour conclure, le gène *dsp1* peut être classé comme un *ETP*. Déterminé génétiquement, le rôle du produit du gène DSP1 est de réguler les gènes homéotiques avec les protéines PcG et TrxG.

b) La protéine DSP1 participe au remodelage de la chromatine.

Des études *in vitro* ont montré que la protéine HMGB1 participe à la réplication de l'ADN, l'asssemblage des nucléosomes et à la régulation de la transcription en remodelant la chromatine (Travers, 2003). La protéine DSP1, homologue de la protéine HMGB1 est-elle capable de remodeler la chromatine ? Les données génétiques suggèrent que la protéine DSP1 régule la région *MCP*. La région *MCP* est une zone d'hypersensibilité à la DNase (Karch *et al*., 1994). Des expériences de digestion à la DNase de la chromatine extraite d'embryons sauvages et mutants *dsp1*^{1} ont montré que l'absence de la protéine DSP1 provoque la disparition de l'hypersensibilité à la DNase de la région *MCP*. Ce résultat indique que la protéine DSP1 participe au remodelage de la chromatine au niveau du locus *MCP* (Decoville *et al*., 2001). Il a été proposé que la protéine DSP1 régule les gènes homéotiques en remodelant la chromatine des régions régulatrices.

c) DSP1 régule le gène *Scr* agissant comme une protéine TrxG.

Le phénotype du mutant *dsp1*^{1} indique que DSP1 doit réguler le gène *Sex combs reduced (Scr)*. En effet, l'expression de *Scr* est considérablement réduite dans le segment T1 du mutant *dsp1*^{1} (Decoville *et al*., 2001). Le gène *Scr* fait partie du complexe homéotique Antennapedia. Il est nécessaire à l'établissement et au maintien de l'identité morphologique des segments thoraciques et du labium (Pattatucci *et al*., 1991). Des fragments d'ADN issus du complexe AntpC ont été sous-clonés permettant de mettre en évidence les séquences

régulatrices du gène *Scr* répondant aux protéines PcG et TrxG (Gindhart et Kaufman, 1995). Dans les travaux présentés dans Rappailles *et al*., (2005), le laboratoire a montré que la protéine DSP1 régule *Scr* en se liant à la région régulatrice *Scr10.0XbaI*. L'introduction de ce domaine de 10 kb en amont du gène rapporteur *Lac Z* dans une lignée de drosophiles transgéniques induit spécifiquement l'expression du gène *Lac Z* au niveau du segment thoracique T1 chez l'embryon et dans les disques imaginaux T1 de larve (Gindhart *et al*., 1995). En contexte mutant *dsp1*^{1}, l'expression du transgène *Lac Z* régulé par *Scr*10.*0XbaI* est abolie dans les disques imaginaux T1 de larve. Mais cette expression reste identique dans les embryons. Cela indique que DSP1 est nécessaire au maintien de l'activation de l'expression du transgène dans la larve mais pas dans l'embryon. De plus, l'insertion du transgène a créé un nouveau site de fixation sur les chromosomes polyténiques de la lignée transgénique pour la protéine DSP1. L'activation du transgène par DSP1 repose sur une interaction physique entre cette protéine et la zone de régulation *Scr*10.*0XbaI*. Des expériences de ChIP analysées par Southern Blot ont montré que DSP1 se lie précisément à deux régions régulatrices de 1 kb de *Scr*10.*0XbaI* dans des cellules de drosophile SL-2. Plus tard, Salvaing et ses collaborateurs ont montré que DSP1 s'associe physiquement avec la protéine ETP Corto. Comme Corto est aussi fixée sur le gène *Scr* via la séquence de régulation *Scr*10.*0XbaI*, les auteurs concluent que Corto et DSP1 sont associées physiquement pour réguler le gène *Scr* (Salvaing *et al*., 2006). Pour conclure, DSP1 participe au maintien de l'activation spatio-temporelle du gène *Scr*.

d) DSP1 permet le recrutement des protéines du groupe PcG.

Le rôle des protéines PcG et TrxG est de maintenir l'expression de leurs gènes cibles en remodelant localement la structure de la chromatine. Un certain nombre de protéines ont pour rôle de recruter les complexes PcG et TrxG : ce sont les protéines Pho, PHOL, Zeste, GAF, PSQ, Ban, Corto, Grh, SP1/KLF (leurs rôles ont été décrits dans le chapitre consacré au recrutement des PcG et TrxG). Il a été montré que la protéine DSP1 joue un rôle dans le maintien de la répression des gènes en recrutant les protéines PcG sur un domaine particulier : Ab-*Fab*. Nous avons vu précédemment que DSP1 se fixe dans l'embryon sur le PRE/TRE *Fab7*. Ab-*Fab* est un élément régulateur de 219 pb nécessaire et suffisant à l'activité du PRE/TRE du domaine *Fab7* régulant le gène *Abdominal-B* (Déjardin et Cavalli, 2004). Lorsque l'on insère un transgène contenant le gène *white* (*w*) sous le contrôle du domaine Ab-*Fab*, ce dernier est capable d'induire la répression du gène *w*. L'insertion du transgène crée un

nouveau site de fixation pour les protéines PcG. Ab-*Fab* contient des sites de fixation pour les protéines PHO, GAF et Zeste. Si l'on mute ces sites, la répression du transgène et la fixation de la protéine Ph sur les chromosomes polyténiques sont réduites voire abolies. Donc les sites de fixation des protéines PHO, GAF et Zeste sont indispensables au fonctionnement du domaine Ab-*Fab*. Ces sites ont été insérés dans une séquence artificielle issue de la bactérie appelée Syn-*Fab*. Cette séquence n'est plus capable de réprimer le gène *w*. Cela indique que les sites PHO, GAF et Zeste sont nécessaires mais pas suffisants pour l'activité répressive d'Ab-*Fab*. D'autres séquences devraient être déterminantes pour la fonction de ce PRE/TRE. Des alignements de séquences d'Ab-*Fab* avec d'autres PRE/TRE ont permis d'identifier une nouvelle séquence 5'-GAAAA-3' ($G(A)_4$), régulièrement localisée à proximité d'un site PHO. Il a été montré que cette séquence est nécessaire à l'activité répressive d'Ab-*Fab*. Lors d'études de la fixation de la protéine DSP1 sur le complexe BX-C, la séquence *Fab-7* a été établie comme une cible de la protéine. Plusieurs expériences ont confirmé que DSP1 est capable de se fixer à la séquence $G(A)_4$. Premièrement, des analyses de retardement sur gel ont montré que DSP1 est capable de se lier sur une sonde à ADN contenant la séquence $G(A)_4$. Deuxièmement, en contexte mutant *dsp1*^{1}, l'activité répressive du domaine Ab-*Fab* sur le gène *w* est perdue. Troisièment, l'insertion du transgène crée un site ectopique de liaison pour la protéine DSP1 sur les chromosomes polyténiques. Cette donnée est confirmée par des expériences de ChIP validant le fait que DSP1 se fixe précisément sur le domaine Ab-*Fab in vivo*. Lorsque l'on mute le site $G(A)_4$ dans le domaine , on abolit le recrutement de la protéine DSP1 sur les chromosomes polyténiques. Enfin, il a été montré que l'absence de DSP1 abolit le recrutement de la protéine Ph sur le domaine Ab-*Fab* (Déjardin *et al*., 2005). Tous ces résultats montrent que DSP1 agit comme un recruteur des PcG en se fixant sur la séquence $G(A)_4$.

e) Recherche des séquences cibles de la protéine DSP1.

(1) Profils de fixation de DSP1 sur le complexe Bithorax.

Au cours de sa thèse, A. Rappailles a déterminé le profil de fixation de la protéine DSP1 sur le complexe BxC par des expériences de ChIP (Rappailles, 2005). Plusieurs données génétiques obtenues avec le mutant suggèrent que la protéine DSP1 a pour cibles les séquences régulatrices du complexe BxC notamment *MCP*, *iab-6* et *bx* (Decoville *et al*., 2001). De plus, la fixation de la protéine DSP1 sur le complexe Bx-C a été observée par des expériences d'immunolocalisation sur les chromosomes polyténiques (Salvaing *et al*., 2006).

Des expériences de ChIP couplées à des analyses sur macro-puces à ADN ont permis de préciser *in vivo* les séquences cibles de la protéine DSP1 sur le complexe Bx-C. Le profil de fixation de DSP1 a été déterminé sur 10 régions cibles des PcG et TrxG sur le complexe BxC recouvrant les promoteurs des gènes et les PRE/TRE (ou CMM) (Orlando *et al*., 1998). Ce sont les régions *bx, bxd, iab2, iab4, MCP, iab6* et *Fab7* et les promoteurs des gènes *Ubx, abd-A* et *Abd-B* (Figure 27) qui ont été découpés en 57 fragments de 1 kb et fixé sur une membrane. Puis les fragments d'ADN obtenus par des expériences de ChIP sur des embryons avec des anticorps anti DSP1 et radiomarqués ont été hybridés sur la puce à ADN. La figure 27 présente les résultats obtenus.

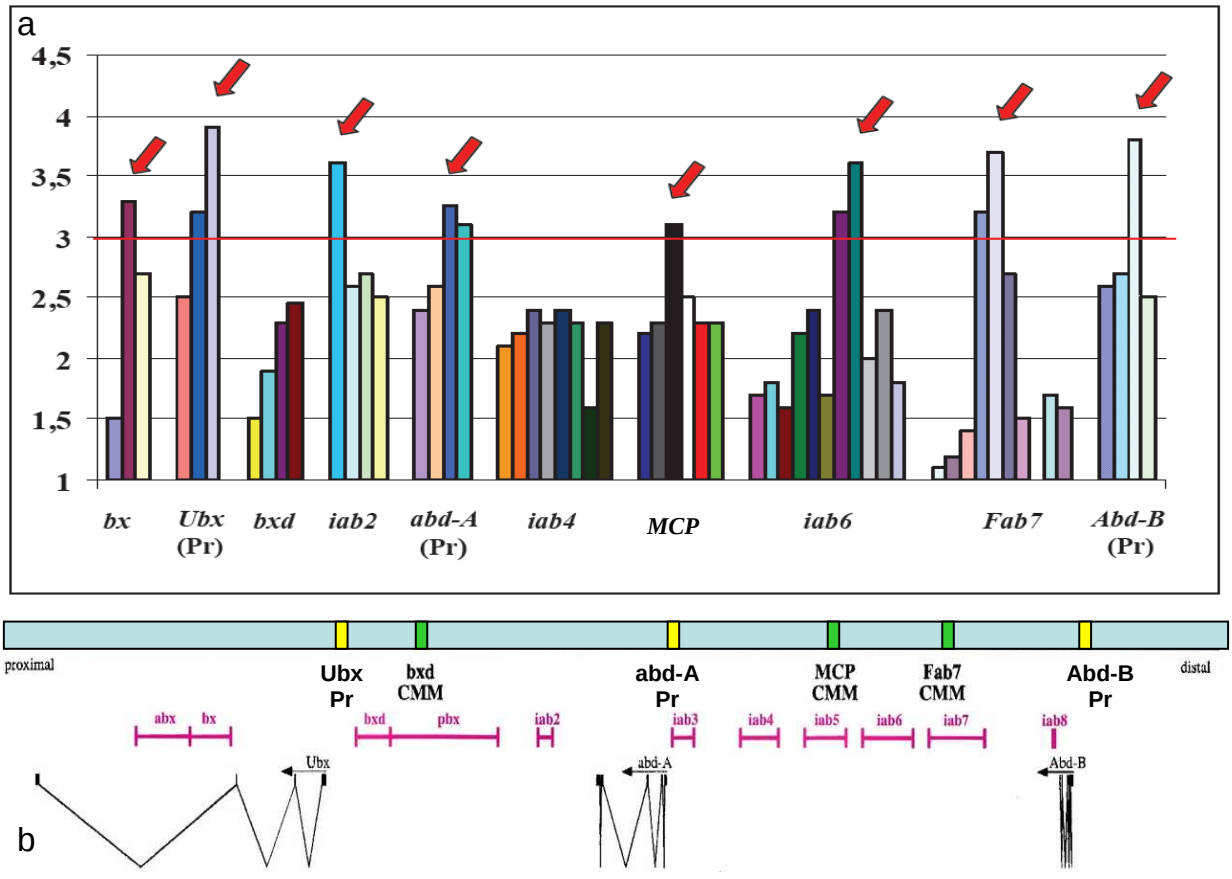


Figure 27 : ***Fixation de la protéine DSP1 sur des domaines de régulation du complexe Bithorax****. (**a**) Le graphique présente le profil de fixation de DSP1. Les domaines de régulation sont indiqués en abscisse (Pr signifie promoteur). Une barre représente un fragment de 1000 pb. Le degré d'enrichissement associé à chaque fragment est indiqué en ordonnée. Huit sites sont des cibles prédominantes de la protéine DSP1 (Flèches rouges). Extrait de* (Rappailles, 2005) ***(b)*** *Schéma du complexe Bithorax et des zones de régulation connues. Adapté de Rank et al., (2002).*

En prenant le locus *MCP* comme référence, 8 régions cibles présentant un degré d'enrichissement supérieur à 3 (le degré d'enrichissement associé à chaque fragment correspond au rapport entre l'intensité du signal spécifique avec les anticorps anti DSP1 et celle du signal contrôle avec le sérum pré-immun). Ces résultats montrent que la distribution de la protéine DSP1 n'est pas homogène le long des domaines étudiés. DSP1 est associée préférentiellement à des fragments recouvrant les PRE/TRE des domaines *bx, iab2*, *MCP*, *Fab7* et les promoteurs des gènes *Ubx*, *abd-A* et *Abd-B*. DSP1 est fixée aussi sur une partie du domaine *iab6* qui n'a fait l'objet d'aucune étude. Cette étude a permis de déterminer que la protéine DSP1 se fixait majoritairement sur les PRE/TRE et les promoteurs des gènes.

(2) Sur tout le génome

L'étude de la fixation de la protéine DSP1 sur les chromosomes polyténiques de glandes salivaires de larves de troisième stade a montré qu'elle se fixait sur 173 sites distincts (Salvaing *et al*., 2006). Une étude publiée récemment décrit les profils de fixation de certaines protéines PcG et TrxG, dont la protéine DSP1, sur le génome d'embryon de drosophile (Schuettengruber *et al*., 2009). Des expériences d'immuno-précipitation de la chromatine pontée d'embryons de drosophile avec des anticorps anti DSP1 combinés avec une puce à ADN à haute résolution (ChIP on chip) ont montré que la protéine DSP1 se fixe sur 1982 régions du génome entier de la drosophile. Les différences entre le nombre de sites de fixation obtenus par ChIP on chip et par immunolocalisation sur les chromosomes polyténiques tient au fait de la résolution. Cette étude donne plusieurs informations sur la protéine DSP1. Premièrement, le fait que la protéine DSP1 est fortement corrélée avec la protéine Trx-N (1182 cibles communes) et faiblement corrélée avec les protéines Pc et Ph (225 cibles communes). Deuxièmement, DSP1 semble associée autant avec les gènes actifs et les gènes réprimés puisqu'elle partage autant de sites avec les histones H3K27me3 (associées à des gènes dont la transcription est réprimée) qu'avec les histones H3K4me3 (associées à des gènes dont la transcription est active). Concernant le recrutement, DSP1 semble fortement associée avec la protéine GAF (66% des sites DSP1 sont partagés avec la protéine GAF). Par exemple, DSP1 et GAF sont associées avec 50% des sites où se fixe PH. La séquence consensus de fixation de la protéine DSP1 est composée de répétition GA/CT. Le site $G(A)_4$ ne semble pas être une cible préférentielle pour la protéine DSP1. Les résultats de la fixation de la protéine DSP1 sur tout le génome confirment la fonction d'ETP de DSP1, celle-ci étant autant associée avec les gènes activés qu'avec les gènes réprimés.

2. Les autres fonctions régulées par la protéine DSP1.

Sur les 1982 sites de fixation de DSP1 sur le génome de l'embryon de drosophile, 670 ne sont pas partagés par les protéines Pc, Ph et/ou Trx (Schuettengruber *et al*., 2009). Cela illustre le fait que la protéine DSP1 intervient dans d'autres fonctions que le maintien de l'expression des gènes avec les protéines PcG et TrxG.

a) DSP1 régule l'expression de *knirps*.

L'étude de la protéine DSP1 a permis de préciser son rôle dans la régulation du gène de segmentation *knirps* (*kni*) avec l'aide de la protéine Bicoïd (BCD). La souche mutante *dsp1*^{1} présente une malformation du segment A4 à tous les stades du développement. Ce type d'anomalie est dû à l'absence de la protéine DSP1 d'origine maternelle. Cette malformation du segment A4 est un trait phénotypique présenté par certains mutants des gènes lacunaires *kni* et *krüppel* (*kr*). Ces gènes interviennent dans la segmentation précoce de l'embryon. Lorsque DSP1 est absente, le domaine d'expression du gène *kni* est réduit tandis que le domaine d'expression du gène *kr* est augmenté postérieurement dans l'embryon de drosophile. La malformation du segment A4 est due à un défaut dans l'activation du gène kni. Ce dernier est activé par deux produits d'origine maternelle BCD et Caudal. L'étude de l'interaction génétique entre la mutation *dsp1*^{1} et des mutations *bcd* montre une forte augmentation de l'anomalie A4 chez les doubles mutants. Les protéines DSP1 et BCD régulent ensemble le gène *kni*. Il a été prouvé, *in vivo* et *in vitro,* que les protéines DSP1 et BCD interagissent physiquement. Par des expériences de ChIP, il a été montré que, dans les embryons de drosophile, la protéine DSP1 est présente au niveau de la région régulatrice du gène *kni* contenant les sites de fixation de la protéine BCD. En conclusion, DSP1 active le gène *kni* avec l'aide de la protéine BCD lors de l'embryogénèse précoce (Daulny *et al*., 2003).

b) DSP1 intervient dans la régulation des peptides antimicrobiens.

DSP1 apparaît comme jouant un rôle dans l'inhibition des gènes intervenant dans la réponse immunitaire. Lors d'une infection par une bactérie, le facteur de transcription NF-κB (Nuclear Factor-kappaB) va activer la transcription des gènes responsables de l'immunité (Ferrandon *et al*., 2007). Kim et ses collaborateurs ont simulé une infection immunitaire par ajout de lipopolysaccharide et de peptidoglycane (constituants de la paroi des bactéries) sur des cellules SL2 de drosophile, et ils ont observé que la protéine DSP1 forme un complexe

avec les protéines HDAC1 (ou RPD3), Jun-related antigen (Jra) et Signal-transducer and activator of transcription protein at 92E (Stat92E). Ce complexe a pour rôle d'inhiber la transcription d'un gène codant pour le peptide antimicrobien Attacin. Ce travail montre le rôle de la protéine DSP1 dans la régulation des gènes responsables de la réponse immunitaire (Kim *et al*., 2007).

III.Sujet de recherche

Le projet de thèse présenté ici s'articule autour de deux projets concernant la protéine DSP1. Le premier projet porte sur la purification des partenaires de DSP1. Le second objectif est l'étude structurale de la protéine DSP1.

A. Identification des partenaires de la protéine DSP1.

Le rôle des protéines PcG et TrxG est de maintenir l'expression des gènes. Au niveau moléculaire, ces protéines agissent en complexes multiprotéiques. Chez la drosophile, quatre complexes de type PcG (PRC1, dRAF, PRC2 et PhoRC) et trois complexes TrxG (TAC1, BRM et GAF-FACT) ont été purifiés et caractérisés biochimiquement. Ces complexes sont aidés par une troisième classe de protéines, les ETP. Définis génétiquement, les *ETP* sont des gènes qui participent à la fois au maintien de la répression génique avec les *PcG* et au maintien de l'activation avec les *trxG* (Gildea *et al*., 2000). Le modèle d'action des ETP indique qu'elles fassent le lien entre l'ADN et les complexes PcG et TrxG en interagissant physiquement avec ces deux partenaires. Parmi les complexes de type PcG et TrxG qui ont été purifiés, aucun ne contient la protéine DSP1. Une question se pose : DSP1 interagit-elle physiquement avec les protéines PcG et TrxG ? Le mécanisme d'action des PcG et TrxG suggère que DSP1 fasse partie de complexes protéiques. Par tamisage moléculaire, les complexes contenant la protéine DSP1 ont été caractérisés dans les embryons de drosophile (Figure 27) (Rappailles *et al*., 2005).

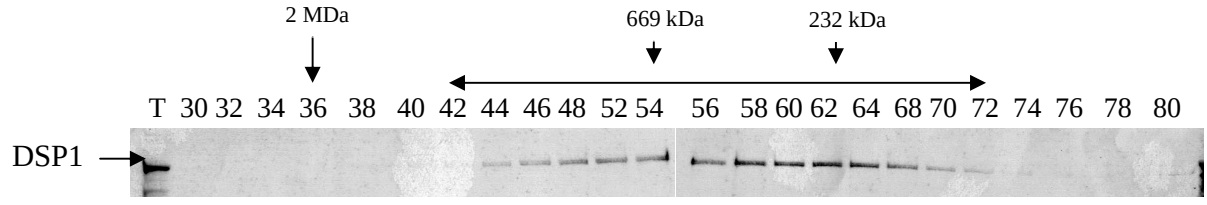


Figure 27 : ***Séparation par tamisage moléculaire des complexes contenant la protéine DSP1 dans l'embryon de drosophile****. Western blot sur les fractions issues du passage d'extraits de protéines d'embryons âgés de 0 à 20 heures sur colonne de Sephacryl S400 avec un anticorps anti-DSP1 révélé avec des anticorps couplés à la peroxydase. T : témoin positif. Extrait de Rappailles et al., (2005).*

Cette expérience démontre que DSP1 fait partie de complexes multiprotéiques dans l'embryon de drosophile. De plus, elle permet de préciser, la taille de ces complexes. La protéine DSP1 se trouve en majorité dans les fractions 54 à 64 correspondant à une taille comprise entre 200 kDa et 650 kDa. Dans une moindre mesure, elle est présente dans les fractions 42 à 52 correspondant à des tailles de 1 MDa. La taille des complexes contenant la protéine DSP1 a été caractérisée avant mon arrivée en thèse.

L'objectif de mon projet de thèse présenté ici était d'identifier les partenaires de la protéine DSP1. Plusieurs techniques peuvent être employées afin de purifier les complexes protéiques. Nous avons utilisé la technique d'immuno-affinité. A l'aide d'anticorps dirigés contre une partie de la protéine DSP1 et immobilisés sur des résines, nous avons purifié les complexes contenant la protéine DSP1. Cette technique nécessite peu d'étapes de purification avec une quantité de matériel biologique relativement accessible. Dans un premier temps, j'ai mis au point au laboratoire des techniques d'immuno-affinité. A l'aide de ces techniques, nous avons identifié les partenaires de la protéine DSP1 dans l'embryon puis nous avons caractérisé les relations biologiques entre DSP1 et un certain nombre de partenaires plus particulièrement la protéine Rm62

B. Contribution à l'étude structurale de la protéine DSP1.

La seconde partie du projet de thèse s'articule sur l'obtention de la structure tridimensionnelle de la protéine DSP1. La structure 3D de la protéine DSP1 nous permettrait de mieux comprendre la fonction de la protéine DSP1 notamment de sa partie N-terminale. La première étape pour l'obtention de la structure de la protéine DSP1 est la production en masse de cette protéine qui permettrait, à terme, des études *in vitro* comme, par exemple, des études d'interaction avec des partenaires identifiés dans le projet précédant. La production chez *E.coli* et la purification de la protéine DSP1 recombinante avaient déjà été effectuées au laboratoire (Janke *et al*., 2003). Mais le système de purification choisi (DSP1 fusionnée avec la maltose-binding protein) ne permettait pas d'obtenir des quantités compatibles avec des études structurales. Au cours de ma thèse, j'ai entrepris la production et la purification de la protéine DSP1 recombinante fusionnée avec une étiquette six histidines. L'obtention de grande quantité de protéine recombinante nous a permis de définir de nouveaux paramètres physico-chimiques de la protéine DSP1.

Résultats

Afin d'identifier les partenaires de la protéine DSP1 dans l'embryon, nous avons décidé de purifier les complexes contenant la protéine DSP1 à l'aide d'anticorps. Deux techniques d'immunopurification similaires et complémentaires ont été développées au cours de ma thèse. La première technique consiste à purifier les complexes à l'aide d'une protéine DSP1 « chimérique » portant des étiquettes à ses extrémités avec des anticorps qui sont dirigés contre les étiquettes. Le second type d'immunopurification consiste à utiliser des anticorps dirigés directement contre la protéine DSP1 endogène. L'avantage de la première méthode est qu'elle permet de purifier les partenaires de la protéine DSP1 de manière plus spécifique pour deux raisons. Premièrement, les anticorps dirigés contre les étiquettes n'ont pas ou peu de réactivité croisée contre les protéines de drosophiles. Deuxièmement, elle fait appel à deux étapes successives de chromatographie d'immunoaffinité contrairement à la seconde méthode qui n'en a qu'une seule. Mais elle nécessite la création et l'utilisation de lignées drosophiles transgéniques exprimant la protéine DSP1 étiquetée ce qui entraîne de nombreux contrôles. A l'inverse, la deuxième méthode est plus rapide car on purifie les complexes à partir de la protéine DSP1 endogène grâce à des anticorps anti-DSP1 déjà disponibles au laboratoire. Comme ces anticorps sont dirigés contre les boîtes HMG de la protéine DSP1, il est possible que d'autres protéines HMG soit retenues par ses anticorps.

I. Purification des partenaires de la protéine DSP1.

A. Etudes des protéines DSP1 étiquetées.

Cette stratégie de purification nécessite l'utilisation de drosophiles transgéniques exprimant la protéine DSP1 étiquetée. L'étiquette peut être placée en position C ou N-terminale de la protéine étudiée. Il est possible que la présence de l'étiquette change la fonction de la protéine étiquetée par rapport à la protéine native. Nous avons augmenté nos chances de réussite en choisissant d'étiqueter la protéine DSP1 en position N-terminale par trois peptides FLAG (DYKDDDDK) et trois peptides HA (YPYDVPDYA) ou bien en position C-terminale par trois peptides FLAG. La présence d'une double étiquette présente un avantage par rapport à une seule étiquette puisqu'elle permet deux étapes d'immunopurification au lieu d'une seule. Deux types de lignées de drosophiles transgéniques ont été produites : l'une intégrant le transgène pPWF *dsp1* permettant l'expression de la protéine $DSP1^{3FLAG}$, l'autre ayant intégré le plasmide pPHWF *dsp1* exprimant la protéine $DSP1^{3FLAG3HA}$ (Figure 28). L'expression des protéines DSP1 étiquetées est contrôlée par des séquences activatrices de la transcription UAS (Upstream Activation Sequence) qui sont

reconnues par le facteur de transcription Gal4 de levure. Ce système d'expression inductible dans les différents tissus de la drosophile permet de contrôler l'expression des protéines DSP1 étiquetées en fonction de l'expression de la protéine Gal4.

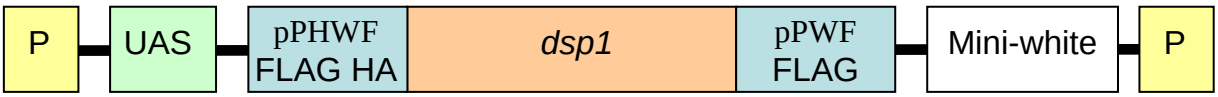


Figure 28 : ***Schéma des transgènes insérés dans le génome de la drosophile afin d'exprimer la protéine DSP1 étiquetée****. Entre les pieds de l'élément P (P), la séquence de l'ADNc du gène dsp1 est étiquetée par des peptides 3 FLAG 3 HA en position N-terminale (plasmide pPHWF FLAG HA) ou 3 FLAG position C-terminale (plasmide pPWF FLAG). L'expression de la protéine DSP1 est contrôlée par des séquences UAS issues de levures. La copie minimale du gène white (mini-white) sert de gène de sélection.*

Après la construction des transgènes pPWF *dsp1* et pPHWF *dsp1*, ceux-ci ont été insérés dans le génome de drosophile w^{1118}. Il a fallu sélectionner les drosophiles ayant intégré les éléments P grâce au gène de sélection *mini-white*, puis localiser les transgènes dans le génome de ces drosophiles.

1. Localisation des transgènes.

La localisation des transgènes a été réalisée par les croisements présentés dans la figure 29. La localisation sur les autosomes a été réalisée par des croisements entre des lignées portant des chromosomes balanceurs du II ou du III, et les lignées portant les transgènes permettant l'expression des protéines DSP1 étiquetées (désignées par P[w+, UAS-*dsp1*]). La localisation sur le chromosome III, qui n'est pas présentée ici, a été réalisée par des croisements entre une lignée (*w-, Tm6 Ser/Drop*) et les lignées portant les transgènes P[w+, UAS-dsp1]. La localisation sur le chromosome IV se fait par défaut.

1) Premier croisement : Localisation sur les chromosomes sexuels.

P ♀ $\frac{w-}{w-}$ X ♂ $\frac{w-}{}$ P[w^+, UAS-*dsp1*]

[Œil blanc] [Œil rouge]

↓

F1 : Trois solutions :

- S'il y a 50 % des individus [œil rouge] et 50 % [œil blanc] alors le transgène P[w+, UAS-*dsp1*] est porté par un autosome.

ou

- Si toutes les femelles sont [œil rouge] et tous les mâles sont [œil blanc] alors le transgène P[w+, UAS-*dsp1*] est porté par le chromosome X.

ou

- Si toutes les femelles sont [œil blanc] et tous les mâles sont [œil rouge] alors le transgène P[w+, UAS-*dsp1*] est porté par le chromosome Y.

q

2) Second croisement : Localisation sur les autosomes. Exemple du chromosome II.

P II

♀ w- ; $\frac{P[w^+, UAS\text{-}dsp1]}{+}$ X ♂ $\frac{w-}{}$; $\frac{CyO}{Bl, L}$

[Œil rouge] [Œil petit et blanc, aile courbée, soies courtes]

↓

F1 ♀ [Œil rouge, aile courbée] X ♂ [Œil petit et rouge, soies courtes]

↓

F2 : Deux solutions :

- S'il y a des ♀ et des ♂ [œil petit, aile courbée, soies courtes] qui ont les yeux rouges, alors le transgène P[w+, UAS-*dsp1*] est porté par un autre chromosome que le II.

II

w- ; $\frac{CyO}{Bl, L}$; $\frac{P[w+, UAS\text{-}dsp1]}{+}$

ou

- Si les ♀ et des ♂ [œil petit, aile courbée, soies courtes] ont tous les yeux blancs, alors le transgène P[w+, UAS-*dsp1*] est porté par le chromosome II.

II

w- ; $\frac{CyO}{Bl, L}$; $\frac{+}{+}$

Figure 29 : ***Principe des croisements réalisés pour la localisation des transgènes P[w+, UAS-dsp1] sur les chromosomes sexuels et le chromosome II.***.

Tous les résultats sont consignés dans le tableau 7 regroupant les souches avec les transgènes pPWF *dsp1* et pPHWF *dsp1*.

Tableau 7 : ***Localisation des transgènes sur les chromosomes pour les souches transgéniques simple et double étiquetées****. Il est indiqué si le transgène est létal à l'état homozygote.*

PPWF *dsp1* : simple étiquetée DSP1^{3FLAG}			pPHWF *dsp1*: double étiquetée DSP1^{3FLAG3HA}		
Nom de la souche	localisation du transgène sur les chromosomes	Létal à l'état homozygote	Numéro de la souche	localisation du transgène sur les chromosomes	Létal à l'état homozygote
B	3	non	15	X	non
L	2	oui	20	2	non
M	2	non	23	X	non
m'	3	oui	24	X	non
N	2	non	27	X	non
Omega	2	non	28	3	non
S	3	non	30	X	non
Sigma	2	non	31	3	non
T	3	non	32	2	non
U	3	oui	35	3	non
X	2	non	39	2	non
Y	3	non	40	3	non
			41	3	oui
			42	3	non

Dans certaines lignées, les transgènes ne peuvent être à l'état homozygote car ils induisent de la létalité. Pour la suite des expériences, nous n'avons pas utilisé les souches transgéniques létales à l'état homozygote puisqu'elles possèdent le transgène en un seul exemplaire.

2. Vérification de l'expression de la protéine DSP1 simple et double étiquetée.

Pour activer la transcription du transgène P[w+, UAS-*dsp1*], l'activateur Gal4 doit être apporté par une souche transgénique l'exprimant qui est croisée avec la souche transgénique DSP1 étiquetée. Pour étudier la participation de la protéine DSP1 aux stades précoces du développement, j'ai choisi, dans un premier temps, une souche 4442 (w-, P[w+, NGT]) exprimant Gal4 dans les premières heures (0 à 3 heures) du développement embryonnaire.

a) Principe de l'expression de Gal4 dans la souche 4442.

La souche 4442 exprime la protéine Gal4 dans les premières heures de la vie embryonnaire grâce à un ingénieux système construit par W.D. Tracey et ses collaborateurs : le système Nanos – Gal4 – Tubuline (NGT) (Tracey *et al*., 2000) (Figure 30). Le cDNA *gal4* (G) suivi de la région 3'UTR de l'ARNm de la tubuline (T) est sous le contrôle du promoteur du gène *nanos (N).* L'intérêt du promoteur *nanos* est de permettre la transcription de l'ARNm *gal4* dans les cellules nourricières au cours de l'ovogenèse. La présence de la région 3'UTR de l'ARNm tubuline permettra le dépôt dans l'ovocyte de l'ARNm Gal4 qui ne sera traduit qu'après la fécondation. La protéine Gal4 activera alors la transcription des gènes (X) sous le contrôle de séquences UAS. Il est important de noter que la protéine Gal4 doit être apportée par la mère, tandis que le gène X est apporté par le mâle.

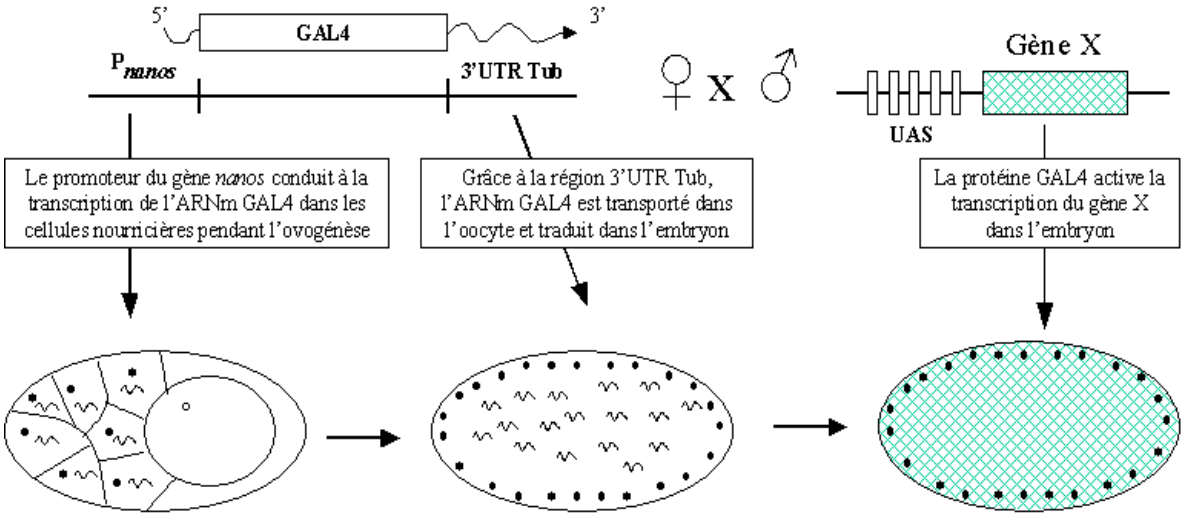


Figure 30: ***Principe de l'activation d'un gène X par la protéine GAL4 dans un embryon (NGT, X)****. D'après Tracey et al., (2000).*

b) La protéine simple étiquetée DSP1^{3FLAG}

Pour vérifier l'expression de la protéine DSP1^{3FLAG}, j'ai choisi la lignée Sigma (Tableau 6). Ayant les yeux rouge vif, elle exprime donc le gène mini-*white* de façon importante. Dans la lignée Sigma, le transgène se serait inséré dans une région du génome où la transcription est active. J'ai supposé que la protéine DSP1^{3FLAG} pourrait également être exprimée fortement. Par Western Blot, j'ai vérifié l'expression de la protéine DSP1 simple étiquetée dans les embryons âgés de 0 à 3 heures et issus du croisement ♀ 4442 x ♂ sigma alors que les embryons issus du croisement ♀ 4442 x ♂ w^{1118} ont fourni un contrôle négatif (Figure 31).

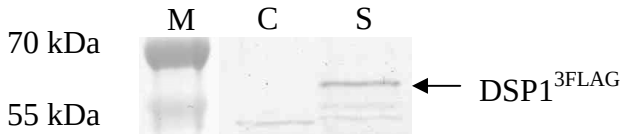


Figure 31: ***Mise en évidence par Western Blot avec des anticorps anti FLAG de la protéine DSP1^{3FLAG} dans des embryons issus des croisements ♀ 4442 x ♂w^{1118} (C) et ♀ 4442 x ♂ sigma*** *(S). M : marqueur de masse moléculaire.*

Une bande à 60 kDa, correspondant à la protéine DSP1^{3FLAG,} est observée sur la piste S alors qu'elle est absente dans la piste C. La protéine DSP1^{3FLAG} est bien exprimée dans les embryons issus du croisement ♀ 4442 x ♂ sigma.

c) La protéine DSP1 double étiquetée

Afin de vérifier la présence de la protéine DSP1^{3FLAG3HA}, deux expériences de Western Blot ont été réalisées : l'une avec les anticorps anti-HA et l'autre avec les anticorps anti-FLAG. Pour ces expériences, la lignée de drosophiles transgéniques 28, choisie pour les mêmes raisons que la lignée sigma, est croisée avec des femelles 4442 tandis que les embryons issus du croisement ♀4442 x ♂ w^{1118} ont fourni un contrôle négatif (Figure 32).

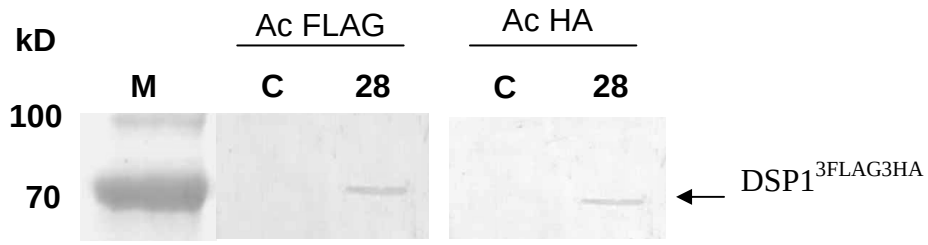


Figure 32: ***Mise en évidence par Western Blot avec des anticorps anti-FLAG et anti HA de la protéine DSP1^{3FLAG3HA} dans des embryons issus du croisement ♀ 4442 x ♂w^{1118} (C) et ♀ 4442 x ♂28*** *(28). M : marqueur de masse moléculaire.*

Que ce soit avec les anticorps anti HA ou avec les anticorps anti FLAG, une bande d'une taille de 70 kDa, correspondant à la protéine DSP1^{3FLAG3HA}, est présente seulement dans les pistes 28. DSP1^{3FLAG3HA} est donc bien exprimée dans les embryons issus des croisements femelles 4442 avec des mâles 28. Les deux anticorps anti-HA et anti-FLAG sont capables de détecter la protéine DSP1 double étiquetée en Western Blot. Avant de commencer l'immuno-purification, il faut s'assurer que la présence des étiquettes ne perturbe pas les fonctions de la protéine DSP1.

3. La protéine DSP1 double étiquetée est capable de se fixer sur la chromatine.

La protéine DSP1 endogène ayant la capacité de se fixer à la chromatine, j'ai vérifié que les étiquettes ne perturbent pas la capacité de la protéine DSP1 à assurer cette fonction. Pour ce faire, une expérience de pontage de la chromatine sur les embryons a été menée. Cette expérience est bien maîtrisée par le laboratoire mais nécessite une quantité importante d'embryons de l'ordre du gramme. Pour atteindre cette quantité, 15000 drosophiles femelles vierges et autant de mâles sont nécessaires. Il nous est impossible de récolter 15000 femelles 4442 qui doivent être obligatoirement vierges. De plus, nous travaillons avec des embryons de 0 à 3 heures ce qui limite encore la quantité disponible. C'est pourquoi j'ai dû m'assurer que le pontage de la chromatine était possible avec une quantité de 0,2g d'embryons issus du croisement ♀4442 x ♂28. Les protéines pontées sur la chromatine sont détectées par Western Blot avec des anticorps anti-FLAG. Le résultat est présenté dans la figure 33 :

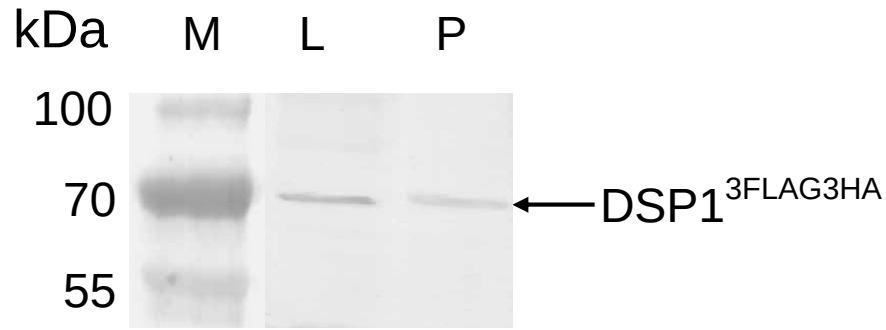


Figure 33: ***Mise en évidence par Western Blot de la protéine DSP1^{3FLAG3HA} avec des anticorps anti-FLAG sur les fractions contenant les protéines libres (L) et la chromatine pontée (P)****. M : marqueur de masse moléculaire.*

Une bande apparaissant à 70 kDa est observée dans les deux pistes L et P. Cette bande correspond à la protéine DSP1^{3FLAG3HA}. Ce résultat indique que la protéine DSP1 double étiquetée se trouve associée à la chromatine. Mais une partie de la quantité de protéine DSP1^{3FLAG3HA} produite est à l'état libre. Ce résultat est similaire à celui obtenu avec la protéine DSP1 endogène qui se trouve aussi dans les fractions où il y a les protéines libres et les fractions correspondant à la chromatine pontée (donnée non montrée). La présence de l'étiquette ne perturbe donc pas la fonction de liaison à l'ADN de la protéine DSP1.

4. La protéine DSP1 double étiquetée se trouve dans des complexes.

Lors de son stage M2, Rabhi Makhlouf avait étudié la taille des complexes contenant la protéine DSP1 au cours du développement embryonnaire. Dans les embryons âgés de 0 à 3 heures, la protéine DSP1 est dans un complexe de petite taille (<150 kDa). A l'inverse, la protéine DSP1 est présente dans un complexe de taille plus importante dans les âges 3 à 12 h et 12 à 24 h. Or j'induis les protéines DSP1 étiquetées grâce à un « driver Gal4 » exprimé fortement entre 0 et 3 heures de développement. De plus, la quantité d'embryons récoltés en trois heures de ponte est faible. Ceci m'a conduit à changer le driver NGT-Gal4 (souche 4442) exprimé dans l'embryon entre 0 et 3 heures contre un driver Daughterless Gal4 (w-, P[w+, Da-Gal4]) (souche 5460) dont l'expression se fait tout au long du développement. Je me suis assuré que la présence de l'étiquette ne perturbe pas la capacité de la protéine DSP1 à se lier à d'autres protéines. Pour ce faire, nous avons choisi la technique de séparation des protéines sur gradient de glycérol. Dans un premier temps, il a fallu calibrer les gradients à l'aide de marqueurs choisis pour leur masse moléculaire. Après centrifugation, j'ai mesuré l'indice de réfraction de chaque fraction ce qui m'a permis de constater que le gradient est linéaire et que celui-ci est parfaitement reproductible d'un tube à un autre (Figure 34). Pour ces études préliminaires, quatre marqueurs de taille ont été utilisés : la Thyroglobuline 669 kDa, la Catalase 232 kDa, l'Aldolase 158 kDa et l'Ovalbumine 48 kDa. La position de ces différents marqueurs de taille est déterminée en mesurant l'absorbance des fractions à 280 nm (Figure 34). On constate que l'on obtient une séparation satisfaisante entre 48 kDa et 600 kDa. Par contre, les complexes de taille supérieure ou égale à 600 kDa vont se retrouver au fond du tube.

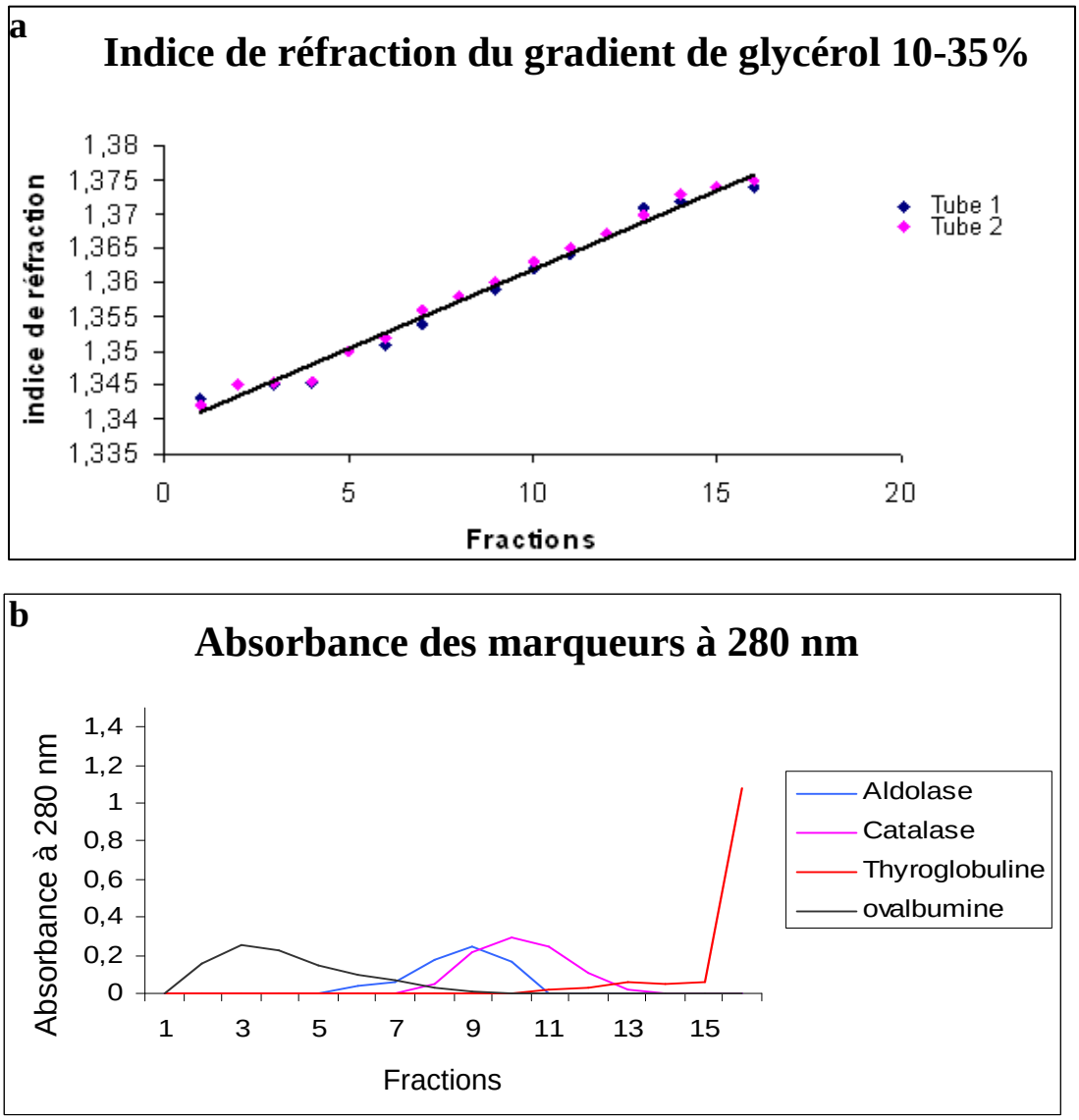


Figure 34: ***Calibrage du gradient de glycérol 10-35 %. a****: Indice de réfraction des fractions du gradient de glycérol pour deux tubes différents.* ***b****: Absorbance à 280 nm des différentes fractions du gradient pour les différents témoins de taille: thyroglobuline, catalase, aldolase et ovalbumine.*

Les gradients étant calibrés, j'ai extrait les protéines d'embryons âgés de 3 à 12 heures issus du croisement ♂5460 x ♀28 et de la souche w^{1118}. Puis, ces protéines ont été séparées sur gradient de glycérol 10 - 35% selon leur coefficient de sédimentation. Une fois les gradients fractionnés, la présence des protéines DSP1 et DSP1 double étiquetée dans les fractions est repérée par Western Blot (Figure 35).

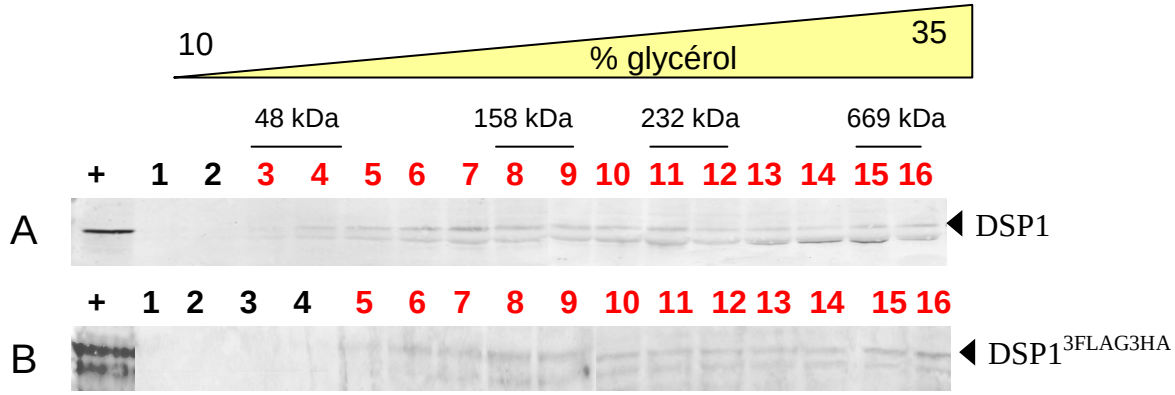


Figure 35: ***La protéine DSP1^{3FLAG3HA} est présente dans des complexes dans l'embryon****. (A) Western Blot avec un anticorps anti DSP1 sur les fractions du gradient de glycérol séparant un extrait protéique w^{1118}. (B) Western Blot avec un anticorps anti HA sur les fractions du gradient de glycérol séparant un extrait protéique ♂5460 x ♀28. Les fractions où sont présentes les protéines DSP1 et DSP1^{3FLAG3HA} sont indiquées en rouge.*

La protéine DSP1 endogène est présente dans les fractions 3 à 16 (**35A**). Dans les embryons âgés de 3 à 12 heures, la protéine DSP1 est présente au sein de complexes multiprotéiques d'une taille comprise entre 100 et 669 kDa et plus. Ce résultat confirme celui obtenu en séparant les protéines embryonnaires par tamisage moléculaire (Rappailles *et al*., 2002). La protéine DSP1^{3FLAG3HA} est présente dans les fractions 5 à 16 (**35B**). La protéine DSP1 double étiquetée est présente dans des complexes multimériques d'une taille comprise entre 100 et 669 kDa dans des embryons âgés de 3 à 12 heures. Le comportement des protéines DSP1 et DSP1^{3FLAG3HA} est similaire. Donc l'étiquette 3 FLAG 3 HA ne perturbe pas la capacité de la protéine DSP1 à se complexer avec d'autres protéines. J'ai effectué les expériences de pontage de la chromatine et de gradient de glycérol seulement avec des extraits contenant la protéine DSP1 double étiquetée pour plusieurs raisons. Premièrement, la protéine DSP1^{3FLAG3HA} permet une double immunopurification, c'est pourquoi j'ai choisi de travailler à partir de cette protéine. Deuxièmement, on peut faire l'hypothèse que la protéine DSP1^{3FLAG} se comporte de la même façon que la protéine DSP1^{3FLAG3HA}.

5. Mise au point du protocole d'immunopurification des protéines DSP1 étiquetées.

Avant de commencer à purifier les partenaires de la protéine DSP1, il a fallu mettre au point un protocole d'immunopurification. Pour la mise au point du protocole j'ai pris pour base le travail de Klymenko et ses collaborateurs (Klymenko *et al*., 2006). La stratégie de purification est la suivante (Figure 36).

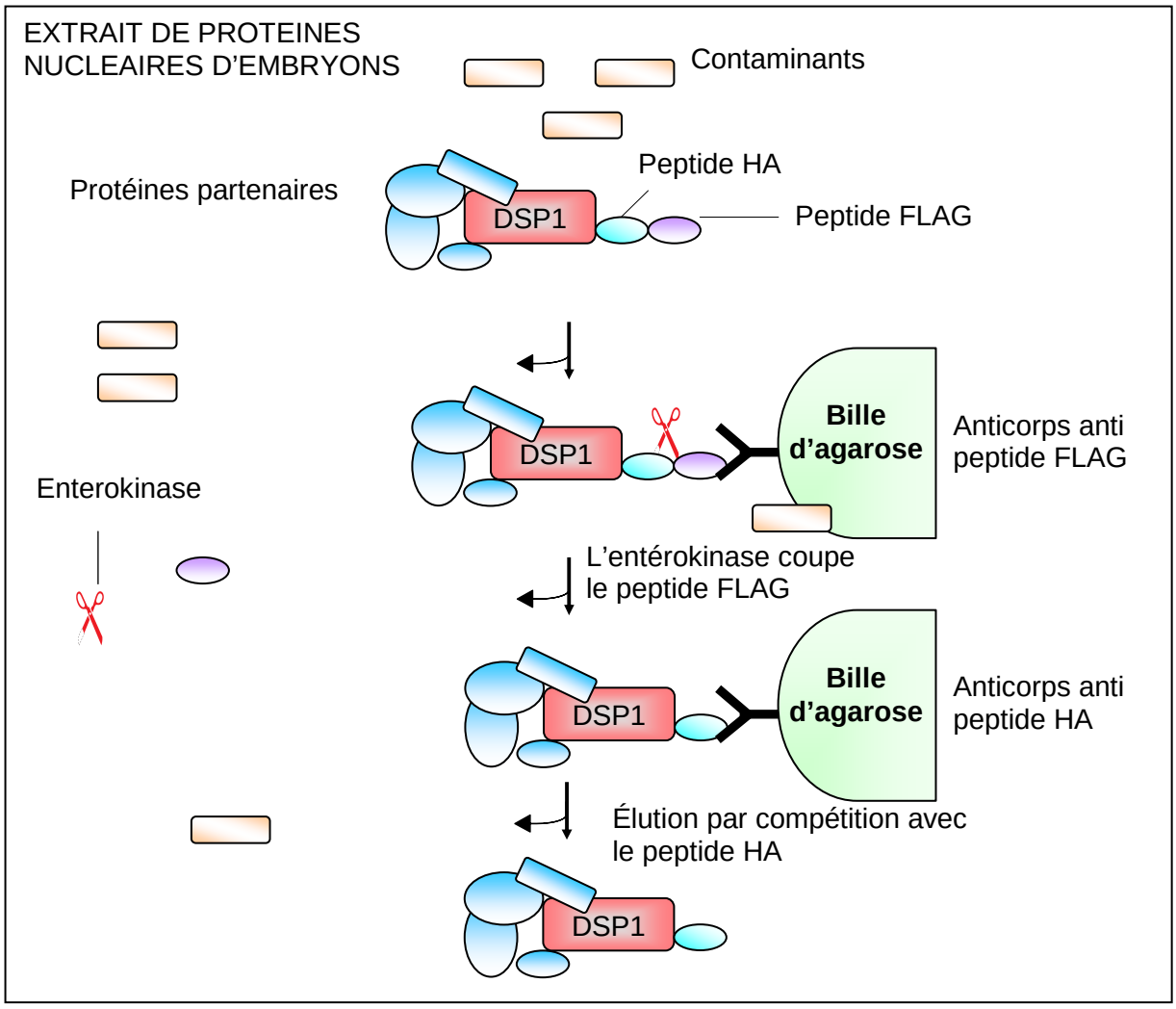


Figure 36: ***Stratégie de purification des partenaires de la protéine DSP1^{3FLAG3HA}.***

Après extraction des protéines des embryons exprimant la protéine DSP1^{3FLAG3HA}, les anticorps anti FLAG couplés aux billes d'agarose sont ajoutés à la solution. Les anticorps reconnaissant le peptide FLAG, la protéine DSP1 étiquetée et ses partenaires vont être précipitées. Afin d'éliminer le plus possible les protéines liées de manière non spécifique, les billes sont lavées. Les complexes vont être élués par la coupure du peptide FLAG de la protéine DSP1^{3FLAG3HA} par l'entérokinase qui a pour site de coupure la séquence peptidique DDDDK (la coupure se faisant après la lysine) correspondant à la fin de la séquence du peptide FLAG (DYKDDDDK). Ainsi, l'entérokinase va couper les trois peptides FLAG libérant la protéine DSP1 étiquetée des anticorps. Mais, il va rester des protéines liées de manière non spécifique qui vont se trouver dans les élutions. C'est pourquoi, une seconde immunopurification est préférable. Des anticorps anti peptide HA couplés avec des billes d'agarose sont ajoutés à la solution contenant les protéines éluées. Après lavage des billes, la protéine DSP1 étiquetée HA accrochée à la résine et ses partenaires sont éluées par

compétition avec le peptide HA. Les protéines récupérées sont ensuite séparées sur gel SDS PAGE puis analysées par spectrométrie de masse ou/et Western Blot.

Lors de la mise au point de l'immunopurification, la présence de la protéine DSP1^{3FLAG3HA} dans les extraits, les lavages et les élutions est repérée par Western Blot avec des anticorps anti HA (Figure 37).

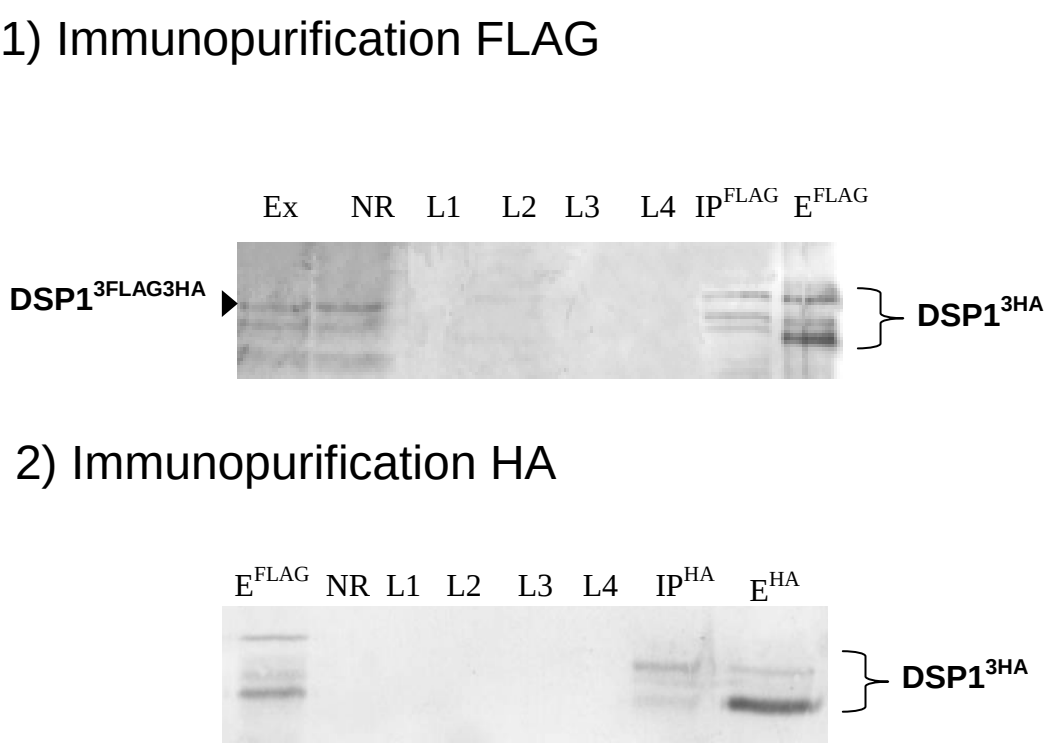


Figure 37 : ***Immunopurification de la protéine DSP1^{3FLAG3HA}.*** *Western blot avec des anticorps anti-Ha. Ex : extrait protéique embryonnaire 28 x 5460, NR : protéine non retenue sur les résines d'agarose couplée avec les anticorps, L1 à L4 : lavage, IP^{FLAG}: résine anti FLAG + protéines précipitées, E^{FLAG}: protéines éluées par coupure avec l'entérokinase, IP^{HA}: résine anti HA + protéines précipitées, E^{HA}: protéines éluées par compétition avec le peptide HA*

Lors de la première étape d'immunopurification, la protéine DSP1 a bien été immunoprécipitée par le gel d'agarose couplé avec les anticorps anti FLAG (piste IP^{FLAG}). La présence de protéine DSP1 dans la piste E^{FLAG} indique que la coupure par l'entérokinase a permis d'éluer la protéine DSP1 (désigné par DSP1^{3HA}). Mais la présence d'un triplet de bandes repéré par l'anticorps anti HA est troublant. Une première hypothèse est que la protéine DSP1 double étiquetée possède trois peptides FLAG qui seraient coupés aléatoirement par l'entérokinase faisant apparaître 3 formes de la protéine DSP1 double étiquetée. Mais les différences de tailles observées entre les 3 bandes me semblent trop importantes pour que cette hypothèse se révèle juste. La seconde hypothèse est que la protéine

DSP1 ne soit pas stable en solution et se dégrade pendant la nuit. Des expériences dans les chapitres suivants viennent étayer cette hypothèse (voir chapitre production de la protéine DSP1). Lors de la seconde étape, la présence du triplet de bandes correspondant à la protéine $DSP1^{3HA}$ dans la piste élution indique que cette protéine est immunoprécipitée par la résine HA puis éluée par compétition avec le peptide HA. Mais elle est aussi présente dans la piste IP ce qui indique qu'il y a une majorité de la protéine DSP1 double étiquetée qui est éluée mais qu'une partie reste accrochée sur la résine. Pour conclure, la protéine DSP1 double étiquetée est bien immunoprécipitée et éluée par compétition avec le peptide HA. Grâce à cette technique, nous pouvons purifier les complexes contenant la protéine DSP1 étiquetée avec les peptides HA et les peptides FLAG.

6. Construction de lignées de drosophiles exprimant les protéines DSP1 étiquetées de manière constitutive.

Afin d'exprimer la protéine DSP1 étiquetée, nous croisons les drosophiles portant le transgène P[w+, UAS-dsp1] avec une souche portant le driver da-Gal4. Cela nécessite le tri de nombreuses femelles vierges pour obtenir une grande quantité d'embryons exprimant les protéines DSP1 étiquetées. Pour s'affranchir de cette contrainte, j'ai construit des lignées de drosophiles exprimant constitutivement la protéine DSP1 étiquetée c'est-à-dire des lignées portant les transgènes P[w+, UAS-dsp1] et da-Gal4 à l'état homozygote. Le transgène da-Gal4 est porté par le chromosome 3. Afin de faciliter la construction des lignées, j'ai choisi des lignées portant le transgène P[w+, UAS-dsp1] sur le chromosome 2. La souche sigma porte le transgène pPWF sur le chromosome 2. Par contre, la souche 28 porte le transgène pPWHF sur le chromosome 3. C'est pourquoi j'ai choisi la souche 20 qui porte le transgène sur le chromosome 2 et qui exprime fortement la protéine $DSP1^{3FLAG3HA}$ (données non montrées). En utilisant des lignées portant des chromosomes balanceurs, j'ai construit les lignées exprimant la protéine DSP1 étiquetée de manière constitutive (Figure 38). Une fois les lignées construites, j'ai pu facilement récupérer des embryons de drosophiles exprimant la protéine DSP1 étiquetée.

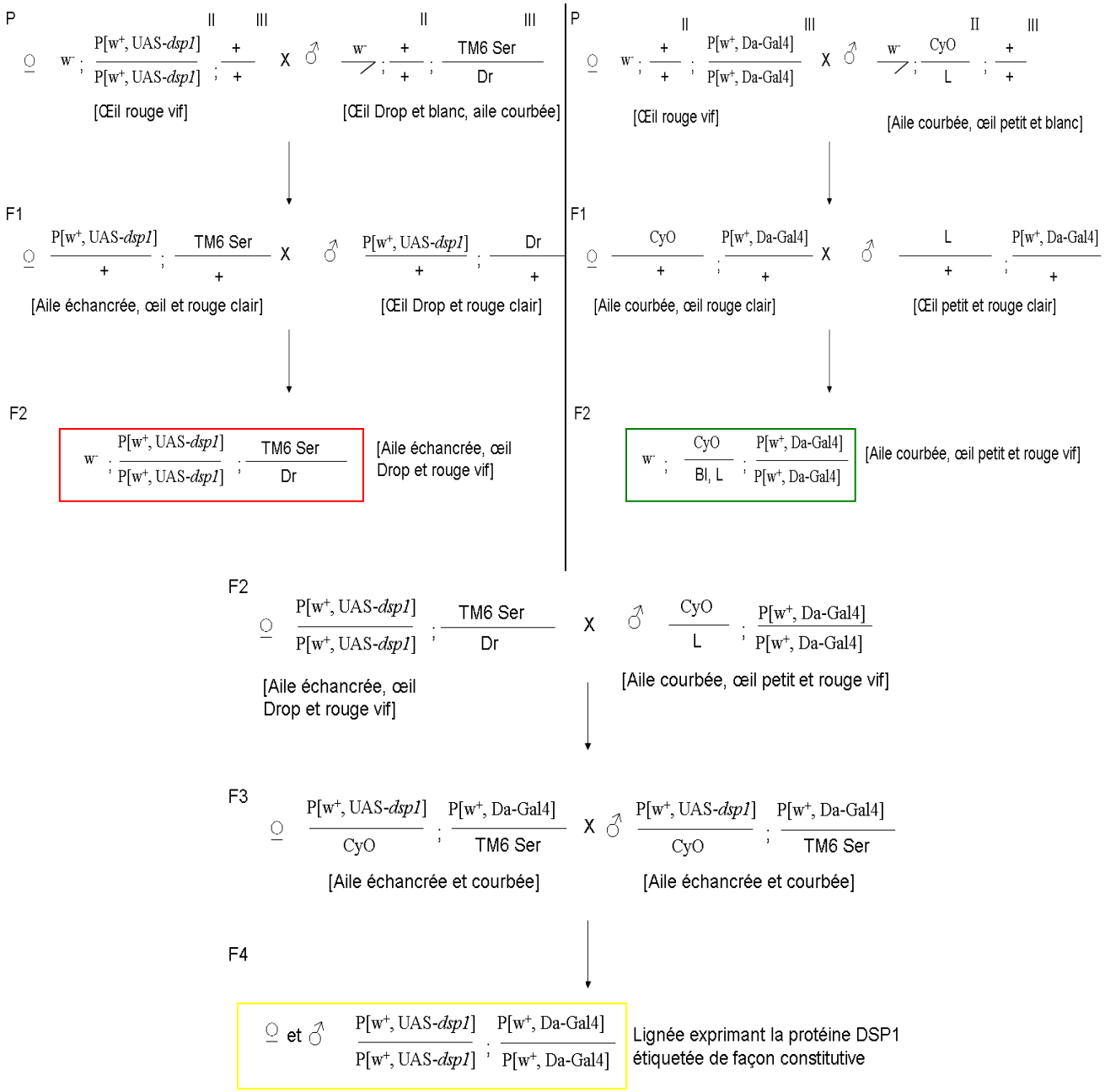


Figure 38 : ***Schéma des croisements effectués lors de la construction de lignées exprimant la protéine DSP1 étiquetée de façon constitutive.***

Après avoir récupéré une grande quantité d'embryons (10 g) exprimant la protéine DSP1 double étiquetée et d'embryons w^{1118}, j'ai fait des premiers essais encourageants d'immunopurification notamment avec des extraits protéiques embryonnaires totaux. Lorsque nous avons fait identifier certaines protéines de ce gel, il est apparu qu'il y avait beaucoup de trop de protéines cytoplasmiques qui contaminaient le gel (Donnée non montrée). C'est pourquoi, j'ai recommencé l'expérience avec des extraits de protéines nucléaires ce qui nécessite deux fois plus d'embryons pour avoir une quantité de protéine équivalente aux extraits totaux. Après avoir récupéré les 20 grammes d'embryons nécessaires puis extrait les protéines nucléaires, des problèmes techniques ont entraîné la perte de ces échantillons. Je n'ai pas pu reprendre ces expériences au cours de ma thèse. J'ai purifié les complexes contenant la protéine DSP1 en utilisant la seconde méthode d'immunoprécipitation.

B. Immunopurification à l'aide d'anticorps anti-DSP1.

1. Mise au point.

Au laboratoire, nous disposions d'anticorps dirigés directement contre la protéine DSP1. Nous savons que ces anticorps sont immunoprécipitants puisqu'ils sont utilisés avec succès pour des expériences de ChIP J'ai entrepris la mise au point de la purification des partenaires de la protéine DSP1 à l'aide de ces anticorps (Figure 39)

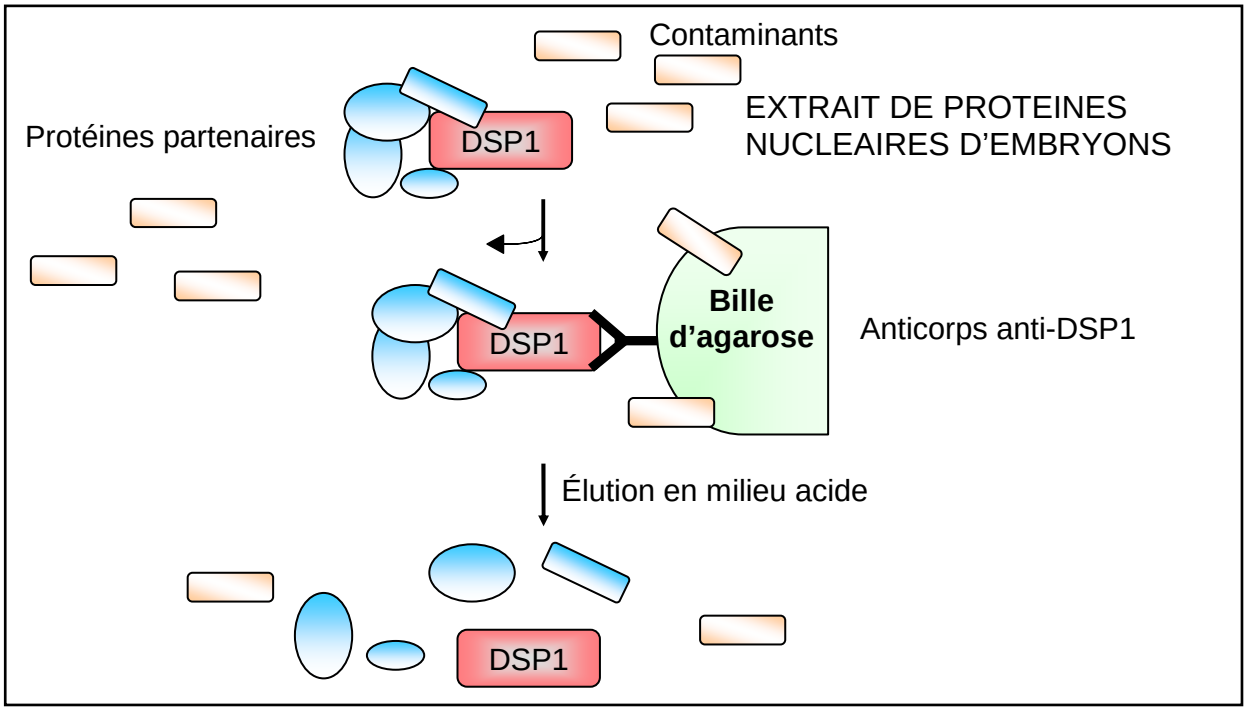


Figure 39: ***Schéma de la stratégie de purification des complexes contenant la protéine DSP1 à l'aide des anticorps anti DSP1****.*

Les anticorps anti DSP1 ont été immobilisés sur la résine AminoLink® Plus Coupling Gel (Pierce). Puis ces anticorps ont été ajoutés à une solution de protéines nucléaires extraites d'embryons. Les partenaires de DSP1 sont précipitées avec le complexe résine-anticorps-DSP1. La résine a été lavée afin d'éliminer les protéines fixées de manière non spécifique. La protéine DSP1 et ses partenaires ont été éluées en milieu acide avec du tampon ImmunoPure® IgG Elution Buffer pH 2.8 (Pierce). Des anticorps IgG produits chez le lapin ont été fixés sur la résine afin de servir d'expérience contrôle. Deux questions se posent. Premièrement, pouvons-nous purifier la protéine DSP1 à l'aide de ce système ? Deuxièmement, le lot d'anticorps IgG purifiés de lapin fournissent-ils un bon contrôle négatif? Ne connaissant pas la nature des molécules contre lesquelles les anticorps IgG sont dirigés, il faut s'assurer qu'ils ne fixent pas la protéine DSP1. C'est pourquoi il a fallu mettre au point la technique d'immunopurification de la protéine DSP1 à l'aide des anticorps anti DSP1 (Figure 40).

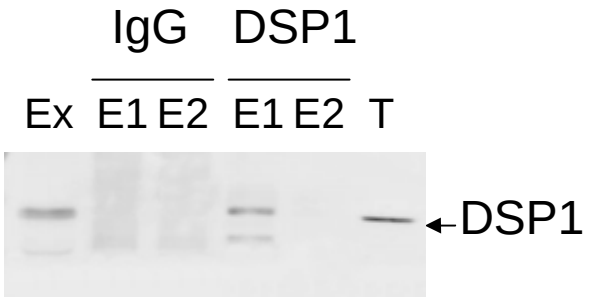


Figure 40 : ***Immunopurification de la protéine DSP1 par une résine d'agarose couplée avec des anticorps anti DSP1 et des anticorps IgG de lapin.*** *Western blot avec des anticorps anti-DSP1. Ex : extrait protéique embryonnaire w^{1118}. E1 et 2: élution successive des protéines en milieu acide. T : extrait de tête de drosophile servant de témoin positif au western blot.*

La protéine DSP1, présente dans l'extrait de protéines nucléaires d'embryons, est retenue puis éluée par la résine couplée avec les anticorps anti DSP1. Nous pouvons utiliser cette résine couplée avec les anticorps anti-DSP1 pour purifier les complexes la contenant. Au contraire, les anticorps IgG purifiés de lapin n'immunoprécipitent pas la protéine DSP1. Le lot d'anticorps IgG de lapin fournit un contrôle négatif adéquat pour l'immunopurification de la protéine DSP1.

2. Identification des partenaires putatifs de la protéine DSP1.

Pour identifier les partenaires de la protéine DSP1 tout au long du développement embryonnaire, j'ai utilisé des extraits d'embryons de drosophiles âgés de 0 à 20 heures. Après l'immunopurification effectuée, la totalité des protéines présentes dans les élutions est concentrée par une précipitation à l'acétone puis reprise dans du tampon de charge. La totalité de ce volume est déposée sur le gel SDS PAGE qui, après l'électrophorèse, est coloré avec du bleu de coomassie (Figure 41).

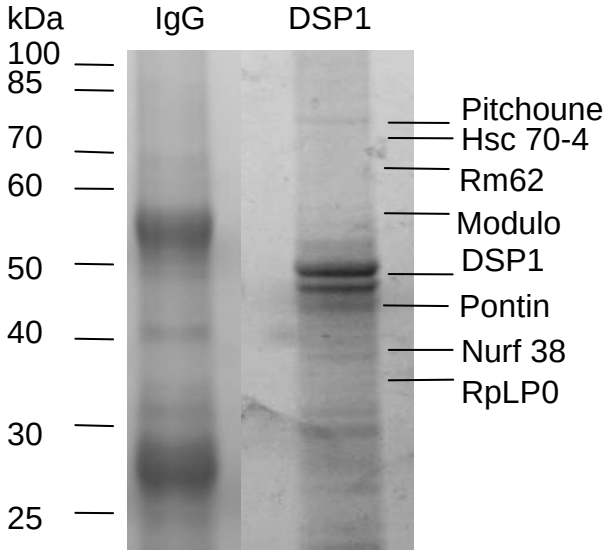


Figure 41. ***Identification des partenaires possibles de la protéine DSP1 dans les embryons de Drosophiles****. Les partenaires possibles de la protéine DSP1 ont été purifiés à partir d'extraits protéiques embryonnaires mis en contact avec une résine couplée à des anticorps anti DSP1. Les protéines éluées ont été séparées par SDS PAGE et visualisées par coloration au bleu de coomassie. Les protéines présentes dans le gel ont été identifiées par spectrométrie de masse. DSP1 = anticorps anti-DSP1, IgG = contrôle anticorps IgG.*

Les pistes IgG et DSP1 du gel ont été entièrement découpées de manière identique en 23 bandes de 2 à 3 millimètres. Les protéines présentes dans le gel ont été analysées par spectrométrie de masse par Valérie Labas à la Plateforme de Protéomique Analytique et Fonctionnelle du Centre de Recherches INRA Nouzilly. Plus de 300 peptides différents correspondant à une centaine de protéines ont été identifiés pour les deux pistes analysées. Un travail d'analyse et de tri a été nécessaire afin de sélectionner les partenaires putatifs de DSP1 sur lesquels nous allions travailler. Les critères de sélection ont été les suivants :

- Les protéines identifiées à la fois dans la piste contrôle et la piste DSP1 ont été éliminées. Elles correspondent aux protéines liées de manière non spécifique à la résine qui n'avaient pas été éliminées lors des lavages.
- Lorsqu'une protéine a été identifiée à l'aide d'un seul peptide, celle-ci est éliminée. En effet, la présence d'un seul peptide identifié n'assure pas la présence certaine de la protéine au sein du gel.
- A l'inverse, les protéines identifiées par plus de 2 peptides ont été sélectionnées.

Après la sélection, il reste 23 protéines candidates en plus de la protéine DSP1 (Tableau 8) :

Tableau 8 : ***Protéines présentes dans le gel étant des partenaires potentielles de la protéine DSP1 et leurs fonctions.***

N°	Nom	Taille	Fonction
1	Moca-cyp	112 kDa	Transcription, épissage
2	Chromator	100 kDa	architecture de la chromatine
3	Rm62	78 à 62 kDa	ARN interférence; Désactivation transcriptionnelle
4	Recombination repair protein 1	75 kDa	Réparation de l'ADN
5	helicase pitchoune	74 kDa	inconnue
6	CG4806	74 kDa	Inconnue
7	Srp72	72 kDa	transport des ARN double brin
8	Heat shock protein cognate 4	71 kDa	ARN interférence, neurotransmission
9	CG2260	69 kDa	Inconnue
10	Modulo	60 kDa	Prolifération cellulaire, spermatogénèse.
11	CG7275	51 kDa	Phagocytose
12	pontin	50 kDa	Remodelage de la chromatine
13	Dorsal Switch Protein 1	48 kDa	Remodelage de la chromatine
14	failed axon connections	47 kDa	Formation des axones
15	CG7845	47 kDa	Inconnue
16	CG18178	43 kDa	Inconnue
17	Actin	42 kDa	Constituant du cytosquelette
18	CG6937	40 kDa	Inconnue
19	Replication factor C 38kD subunit	38 kDa	Réplication de l'ADN
20	Mov34	38 kDa	Formation et organisation du fuseau de division lors de la mitose
21	NURF-38	38 kDa	Remodelage de la chromatine
22	CG7993	36 kDa	Inconnue
23	CG11837	35 kDa	Modification d'ARN ribosomique
24	Ribosomal protein LP0	34 kDa	Traduction, Réparation de l'ADN

Les 23 protéines peuvent être regroupées en quatre classes :

- La première classe correspond aux protéines qui ont déjà été retrouvées associées avec des complexes PcG et TrxG. C'est le cas des protéines Heat shock protein cognate 4 (HSC-70 4), Modulo (Mod), Pontin, Actin et Nurf-38. La protéine Hsc-70 4 est associée avec les complexes PRC1 et PRC2 (Saurin *et al*., 2001; Nekrasov *et al*., 2007). Dans l'embryon, Modulo est associée aussi bien avec le complexe PRC1 qu'avec la protéine dCBP (Saurin *et al*., 2001; Bantignies *et al*., 2002). Les protéines Pontin et Actin sont des membres du complexe dINO80, homologue du complexe de remodelage de la chromatine INO80 de levure. dINO80 a été purifié avec la protéine PHO au cours de l'embryogénèse (Klymenko *et al*., 2006). De plus, Pontin et Actin ont été co-purifiées avec le complexe BRM (Diop *et al*., 2008; Kal *et al*., 2000). La protéine NURF 38 est un membre du complexe NURF (NUcleosome Remodeling Factor) impliqué dans des fonctions liées au maintien de la transcription avec les protéines TrxG (Badenhorst *et al*., 2002).

- La seconde classe est constituée de deux protéines à la fonction similaire d'ARN hélicase. Ce sont les protéines Rm62 et Pitchoune. Ces protéines appartiennent à la famille ARN hélicase à boîtes DEAD. Le gène codant la protéine Pitchoune est nécessaire au bon développement de la drosophile. En effet, les individus homozygotes pour l'allèle perte de fonction du gène *Pitchoune* ne dépasse pas le stade larve de troisième stade. Pitchoune serait impliquée dans la croissance et la prolifération cellulaire (Zaffran *et al*., 1998), mais le rôle exact de cette protéine n'est pas connu. La protéine Rm62 a été plus étudiée. Elle est codée par un gène essentiel à la survie de la drosophile, le gène *Rm62* ou *Lighten up (Lip).* Celui-ci est un suppresseur de PEV, suggérant une implication de la protéine Rm62 dans le remodelage de la chromatine (Csink *et al*., 1994).

- La troisième classe est constituée des protéines impliquées dans des fonctions ayant un rapport avec la chromatine et/ou la transcription: les protéines Moca-cyp, Chromator, Recombination repair protein 1 (Rrp1), Replication factor C 38kD subunit (RfC38) et Ribosomal protein LP0 (RpLP0). Moca-cyp pourrait être impliquée dans l'épissage des ARN (Cavarec *et al*., 2002). Chromator est impliquée dans la régulation de la structure de la chromatine (Rath *et al*., 2004; Ding *et al*., 2009). Rrp1 est une exonucléase impliquée dans la réparation des dommages de l'ADN (Szakmary *et al*., 1996). RFC38 fait partie du complexe impliqué dans la réplication de l'ADN, Replication Factor C (Jaffe et Jongens, 2001). Le gène *RpLP0* code une protéine ribosomique ayant une activité endonucléase. Lorsque ce gène est muté, il est un suppresseur de PEV. RpLP0 serait impliquée dans la régulation de l'expression des gènes (Frolov et Birchler, 1998).

- La dernière classe est constituée des protéines dont la fonction est peu connue ou inconnue. Ce sont les protéines CG4806, CG2260, CG7275, CG7845, CG18178, CG6937, CG7993, CG11837, Mov 34, Srp72 et failed axon connections.

C. Etude des interactions entre DSP1 et ses partenaires.

Pour confirmer une interaction entre deux protéines, plusieurs techniques sont possibles. Par exemple, les deux protéines peuvent être produites par des bactéries puis purifiées. Ainsi, l'interaction entre ces deux protéines est étudiée *in vitro*. Une deuxième possibilité pour confirmer une interaction est de disposer d'anticorps dirigés contre les deux protéines dont nous suspectons une interaction. Ces anticorps permettent des expériences de co-immunoprécipitation et des Western Blot. Nous avons cherché dans le commerce et dans la communauté scientifique les anticorps dont nous pouvions disposer.

Pour comprendre le rôle biologique des interactions entre ces protéines, nous nous sommes intéressés aux interactions génétiques entre le mutant $dsp1^1$ et les mutations dans les gènes codant les protéines partenaires de DSP1. Nous avons cherché les lignées de drosophiles mutantes auprès des banques de lignées de drosophiles (telles que le Bloomington Drosophila Stock Center de l'université d'Indiana) et de la communauté scientifique. Ainsi, nous avons pu disposer de lignées mutantes pour les gènes *Rm62*, *nurf 38*, *Hsc70-4*, *modulo* et *RpLP0* et d'anticorps dirigés contre les produits de ces gènes sauf RpLP0.

1. Interaction génétique.

Les interactions génétiques sont mises en évidence par l'observation des phénotypes. Par exemple, si le phénotype provoqué par la mutation dans un premier gène est aggravé ou au contraire supprimé par une mutation dans un deuxième gène, alors il y a interaction entre les deux mutations. Une interaction génétique peut être la conséquence d'une interaction directe entre les protéines mais il se peut qu'elle soit la conséquence d'une cascade d'interactions moléculaires. Dans le cas du gène *dsp1*, nous nous intéressions aux transformations homéotiques occasionnées par la mutation nulle $dsp1^1$ (Decoville *et al*., 2001) (tableau 9). Les phénotypes homéotiques observés chez les mâles hémizygotes $dsp1^1$ issus du croisement ♀ $dsp1^1$ x ♂ Oregon R sont:

- une réduction du nombre de soies dans le peigne sexuel. Le nombre de soies moyen est normalement de 11 dans la lignée sauvage. Mais chez les mâles hémizygotes, elles sont au nombre moyen de 8,65. Cette transformation est due à une dérégulation du gène *Sex combs reduced*.

- la transformation des haltères en ailes, c'est-à-dire du segment thoracique T3 en segment thoracique T2 qui est observée chez 0,7 % des individus hémizygotes *dsp1*^{1}. La présence de tissu thoracique sur le premier segment abdominal est aussi observée. Le premier segment abdominal se transforme en segment T3 plus antérieur. Ces deux types de transformation sont dus à une dérégulation de l'expression du gène *Ultrabithorax.*

- des soies sur le sternite du segment abdominal A6 chez 10% des individus hémizygotes *dsp1*^{1} alors que les individus sauvages ne présentent pas de soies sur le sternite du segment A6. Le segment abdominal A6 se transforme en segment plus antérieur A5. Cette transformation est due à une mauvaise régulation du locus *infra-abdominal 6* (*iab 6*) contrôlant le gène *Abd-B.*

S'il y a une interaction génétique entre la mutation et les mutations des gènes *Rm62, nurf 38, Hsc70-4*, *modulo* et *RpLP0*, le nombre de transformations homéotiques décrites ici doit être augmenté ou bien diminué. Les résultats des interactions génétiques sont présentés dans le tableau 9.

Tableau 9 : ***Interaction génétique entre la mutation dsp1*^{1} *et des mutations des gènes nurf-38, HSC70-4, modulo, RpLP0 et Rm62****. Des femelles homozygotes dsp1*^{1} *ou Oregon R (utilisées comme contrôle) ont été croisées avec des mâles Oregon R, nurf-38*^{k16102}*/Cyo, Hsc70-4*^{03550}*/TM3, Hsc70-4*$^{54.1}$*/TM6, mod*^{07570}*/TM3, RpLP0*^{01544}*/TM3 et Rm62*^{01086}*/TM3. Les mâles résultant des croisements sont examinés pour les phénotypes déjà observés chez les mutants dsp1*^{1}*: (1) Réduction du nombre de soies sur le peigne sexuel de la patte T1. (2) Transformation des ailes en haltères (T3 en T2). (3) Transformation du segment A6 en segment A5 observé par la présence de soies sur la sternite A6.*

Génotype des descendants mâles des croisements	Nombre de pattes T1 observées	Nombre moyen de soies sur le peigne sexuel de la patte T1	Nombre de mâles observés	T3 en T2 et A1 en T3 (%)	Nombre de mâles observés	A6 en A5 (%)
dsp1^{1}*/Y ; +/+*	43	8.65	863	0,7	157	10
+/Y ; nurf-38^{k16102}*/+*	53	10.21	253	0	38	0
dsp1^{1}*/Y ; nurf-38*^{k16102}*/+*	29	8.65	132	1	141	22
+/Y ; Hsc70-4^{03550}*/+*	46	9.52	198	0	47	0
dsp1^{1}*/Y ; Hsc70-4*^{03550}*/+*	36	9.41	138	0	70	43
+/Y ; Hsc70-4$^{54.1}$*/+*	41	9,75	212	0	37	0
dsp1^{1}*/Y ; Hsc70-4*$^{54.1}$*/+*	39	8.92	82	0	76	8
+/Y ; mod^{07570}*/+*	60	9.56	147	0	34	0
dsp1^{1}*/Y ; mod*^{07570}*/+*	29	7.75	125	0	65	5
+/Y ; RpLP0^{01544}*/+*	32	10.53	312	0	43	91
dsp1^{1}*/Y ; RpLP0*^{01544}*/+*	48	9.9	214	1	137	61
+/Y ; Rm62^{01086}*/+*	31	9.51	259	0	41	2
dsp1^{1} */Y ; Rm62*^{01086}*/+*	41	8.97	554	1.3	142	44

a) Interaction entre *dsp1* et *nurf-38*.

Pour cette étude, nous utilisons l'allèle *nurf-38*^{k16102} qui a été produit par l'insertion d'un élément P dans la séquence du gène *nurf-38* (Spradling *et al*., 1999). La nature de l'allèle produit est inconnue. Néanmoins, cet allèle est létal à l'état homozygote indiquant que le gène *nurf-38* est indispensable à la survie de la drosophile. Chez les mâles hétérozygotes *nurf-38*^{k16102}, aucune transformation homéotique n'est observée. Les mâles hémizygotes *dsp1*^{1} et hétérozygotes *nurf-38*^{k16102} montrent une augmentation du nombre de transformations A6 en A5 (22%) par rapport au résultat obtenu avec les mâles hémizygotes pour la seule mutation *dsp1*^{1} (10%). Nous observons une interaction génétique entre les gènes *dsp1* et *nurf-38*. Cette interaction suggère que les protéines DSP1 et NURF-38 régulent ensemble le locus *infra-abdominal 6* en agissant comme des protéines de type TrxG.

b) Interaction entre *dsp1* et *HSC70-4*.

Deux types d'allèles du gène *Hsc70-4* ont été utilisés. L'allèle *Hsc70-4*^{03550} est un allèle hypomorphe produit par l'insertion d'un élément P dans le premier exon du gène *Hsc70-4* (Schmucker *et al*., 1997). L'autre allèle utilisé est l'allèle *Hsc70-4*$^{54.1}$ produit par mutagénèse à l'N-éthyl-N-nitrosourée (ENU) (Mollaaghababa *et al*., 2001). C'est un allèle antimorphe produisant une protéine HSC70-4 dont la leucine 380 a été changée en proline. Ces deux allèles sont létaux à l'état homozygote. Ces allèles interagissent génétiquement avec des mutations dans les gènes *PcG* : *Pc* et *Ph*. Les mâles hétérozygotes *Hsc70-4*^{03550}/+ et *Hsc70-4*$^{54.1}$/+ ne montrent pas de phénotype homéotique particulier. Les mâles hémizygotes *dsp1*^{1} et hétérozygotes *Hsc70-4*$^{54.1}$ ne montrent aucune augmentation du nombre de transformations homéotiques par rapport aux mâles hémizygotes pour la mutation *dsp1*^{1}. Par contre avec l'allèle *Hsc70-4*^{03550}, une augmentation du nombre de transformations A6 en A5 (43%) ainsi qu'une légère augmentation du nombre de soies du peigne sexuel de la patte T1 (9,41 soies) sont observées chez les mâles *dsp1*^{1}*/Y ; Hsc70-4*^{03550}/+. La différence observée entre les deux allèles pourrait s'expliquer par la nature de l'allèle. L'allèle *Hsc70-4*$^{54.1}$ produit une protéine où un seul acide aminé a été échangé (Leu en Pro en position 380) ce qui n'a pas d'influence sur les mécanismes observés. A l'inverse, l'insertion d'un élément P dans la séquence du gène *Hsc70-4* modifierait assez le comportement de la protéine pour perturber la fonction de HSC70-4. Nous observons une interaction génétique entre les gènes *dsp1* et *Hsc70-4*. Cette interaction suggère que *Hsc70-4* se comporte comme un *trxG* pour activer le locus *iab-6* puisqu'une mutation *Hsc70-4*^{03550} augmente l'effet *trxG* observé lors de l'absence

de protéine DSP1. A l'inverse, *Hsc70-4* se comporte comme un *PcG* pour réprimer le gène *Scr* puisque la mutation *Hsc70-4*^{03550} supprime l'effet *trxG* de la mutation *dsp1*^{1}.

c) Interaction entre *dsp1* et *modulo*.

Pour étudier l'interaction génétique entre *dsp1* et *modulo*, nous avons utilisé l'allèle *mod*^{07570}. Cet allèle est produit par l'insertion d'un élément P dans la séquence du gène *modulo*. Les mâles homozygotes pour cet allèle sont stériles (Castrillon *et al*., 1993). Chez les mâles hétérozygotes *mod*^{07570}, aucune transformation homéotique n'est observée. Les mâles hémizygotes *dsp1*^{1} et hétérozygotes *mod*^{07570} montrent une réduction du nombre de soies sur le peigne sexuel passant de 8,65 en contexte *dsp1*^{1} à 7,75 chez le double mutant. Il y a une interaction génétique entre les allèles *dsp1*^{1} et *mod*^{07570} qui suggère que DSP1 et Modulo participent à l'activation du gène Scr comme les protéines TrxG.

d) Interaction entre *dsp1* et *RpLP0*.

L'allèle *RpLP0*^{01544} a été utilisé pour étudier l'interaction génétique entre *dsp1* et *RpLP0*. Celui-ci a été produit par insertion d'un élément P dans le premier intron du gène *RpLP0*. *RpLP0*^{01544} est un allèle gain de fonction hypermorphe suppresseur de PEV (Frolov et Birchler, 1998). Les mâles hétérozygotes *RpLP0*^{01544} ont un nombre important de transformations homéotiques A6 en A5 (91%) comparé à celui des mâles hémizygotes *dsp1*^{1} (10%). La protéine RpLP0 se classe parmi les PcG puisque sa surexpression réprime le locus *iab 6*. Lorsque les deux allèles *dsp1*^{1} et *RpLP0*^{01544} sont présents dans le même individu (*dsp1*^{1}*/Y ; RpLP0*^{01544}/+), le nombre de transformations A6 en A5 est réduit à 61%. La présence de l'allèle *dsp1*^{1} réduit le nombre de transformations homéotiques A6 en A5 dues à l'allèle *RpLP0*^{01544}. L'absence du produit du gène *dsp1* réduit l'effet de RpLP0 sur la répression et/ou l'absence d'activation du locus *iab 6* contrôlant le gène *Abd-B*. Ceci indique que la protéine RpLP0 a besoin de la protéine DSP1 dans la répression du gène *Abd-B*.

e) Interaction entre *dsp1* et *Rm62*.

Afin d'étudier l'interaction génétique entre *dsp1* et *Rm62*, nous avons utilisé l'allèle *Rm62*^{01086}. Cet allèle a été produit par l'insertion d'un élément P dans la séquence du gène *Rm62*. Cet allèle produisant très peu de protéine Rm62, il serait un allèle hypomorphe. A l'état homozygote, celui-ci est létal (Buszczak et Spradling, 2006). Les mâles hétérozygotes *Rm62*^{01086} ne montrent aucune transformation d'haltères en ailes, tandis que les mâles hémizygotes *dsp1*^{1} et hétérozygotes *Rm62*^{01086} montrent une augmentation du nombre de

transformations T3 vers T2 (1,3% par rapport à 0,7%). Pour les transformations A6 vers A5, 2% des mâles hétérozygotes *Rm62*^{01086} et 10% des mâles hémizygotes *dsp1*^{1} ont des soies sur le sternite A6. Ces pourcentages augmentent à 44% chez les individus hémizygotes *dsp1*^{1} et hétérozygotes *Rm62*^{01086}. Ces résultats indiquent que les produits des gènes *dsp1* et *Rm62* régulent ensemble les gènes *Ubx* and *Abd-B* en se comportant comme des TrxG.

f) Conclusion

Le gène *dsp1* interagit génétiquement avec les gènes *nurf-38, mod, RpLP0, Hsc70-4* et *Rm62*. Ces interactions nous ont permis de préciser quelles étaient les fonctions régulées par *nurf-38, mod,* Hsc70-*4, RpLP0* et *Rm62* (Tableau 10).

Tableau 10 : ***Les effets (PcG ou trxG) des interactions génétiques entre la mutation dsp1^{1} et les mutations nurf-38^{k16102}, Hsc70-4$^{54.1}$, Hsc70-4^{03550}, mod^{07570}, RpLP0^{01544}, Rm62^{01086} sur les gènes Scr, Ubx, Abd-B (locus iab 6)***.

Interaction avec la mutation *dsp1*^{1}	Gène régulé		
	Scr	*Ubx*	*Abd-B (iab6)*
nurf-38^{k16102}	-	-	*trxG*
Hsc70-4$^{54.1}$	-	-	-
Hsc70-4^{03550}	*PcG*	-	*trxG*
mod^{07570}	*trxG*	-	-
RpLP0^{01544}	-	-	*PcG*
Rm62^{01086}	-	*trxG*	*trxG*

2. Caractérisation des interactions entre DSP1 et ses partenaires.

Nous avons caractérisé une interaction génétique entre la mutation *dsp1*^{1} et les mutations dans les gènes *nurf-38, mod, RpLP0, Hsc70-4* et *Rm62* ce qui nous a permis de préciser les gènes qu'ils régulent avec la protéine DSP1. Ces protéines ayant été identifiées comme partenaires potentielles de la protéine DSP1, il faut confirmer l'interaction entre la protéine DSP1 et les protéines Rm62, NURF-38, Modulo, HSC70-4. De plus, je dispose d'anticorps dirigés contre la protéine Pontin pour laquelle je n'ai pas de mutant. Les travaux effectués sur l'interaction entre DSP1 et Rm62 faisant l'objet d'une publication, ces résultats sont présentés séparément.

a) **DSP1 et ses partenaires dans les complexes**.

La protéine DSP1 fait partie de complexes multiprotéiques d'une taille de 100 à 1 MDa. De plus, la taille du complexe contenant la protéine DSP1 varie au cours du temps. Nous avons voulu savoir si les protéines identifiées lors de l'immunopurification pouvaient faire partie de complexes contenant la protéine DSP1. Sur gradient de glycérol, j'ai séparé les complexes protéiques extraits d'embryons âgés de 3 à 12 h et de 12 à 24 h. A l'aide d'anticorps appropriés, les protéines DSP1, NURF-38, Pontin, Modulo et HSC70-4 ont été repérées dans les fractions des gradients de glycérol (Figure 42).

Dans les embryons âgés de 3 à 12 heures, la protéine DSP1 est présente dans les fractions 5 à 15 correspondant à des poids moléculaires de 50 kDa à 669 kDa et plus. Au moins dans la fraction 5, la protéine DSP1 serait présente à l'état libre dans l'embryon. Dans les fractions supérieures, DSP1 est présente dans les complexes protéiques allant de 100 à 669 kDa et plus.

La protéine HSC70-4 est présente dans les fractions 8 à 10 correspondant à des poids moléculaires de 150 à 200 kDa. Il n'y aurait pas de forme libre de la protéine HSC70-4 puisque celle-ci apparaît à un poids moléculaire de 70 kDa en Western Blot. HSC70-4 est associée à des complexes allant de 150 à 200 kDa dans les embryons âgés de 3 à 12 heures.

Modulo est présente dans les fractions 5 à 15 correspondant à des poids moléculaires de 50 kDa à 669 kDa et plus. Le poids moléculaire observé de la protéine Modulo est de 75 kDa. Dans les fractions 5 et 6, Modulo est présente à l'état libre. La protéine Modulo est associée à des complexes protéiques dont le poids moléculaire est compris entre 100 et 669 kDa et plus.

La protéine NURF-38 est présente dans les fractions 2 à 15 correspondant à des poids moléculaires allant de 40 kDa à 669 kDa et plus. Le poids moléculaire observé de la protéine NURF-38 est de 40 kDa. Dans les premières fractions du gradient, NURF-38 se retrouve à l'état libre dans les extraits protéiques embryonnaires. Elle est aussi associée à des complexes multiprotéiques dont le poids moléculaire est compris entre 50 kDa et 669 kDa et plus.

La protéine Pontin est présente dans les fractions 10 à 15 correspondant à des poids moléculaires de 200 kDa à 669 kDa et plus indiquant qu'il n'y a pas de forme libre de la protéine Pontin car le poids moléculaire observé de Pontin est de 55 kDa. La protéine Pontin est présente dans des complexes dont le poids moléculaire est compris entre 200 kDa et 669 kDa et plus.

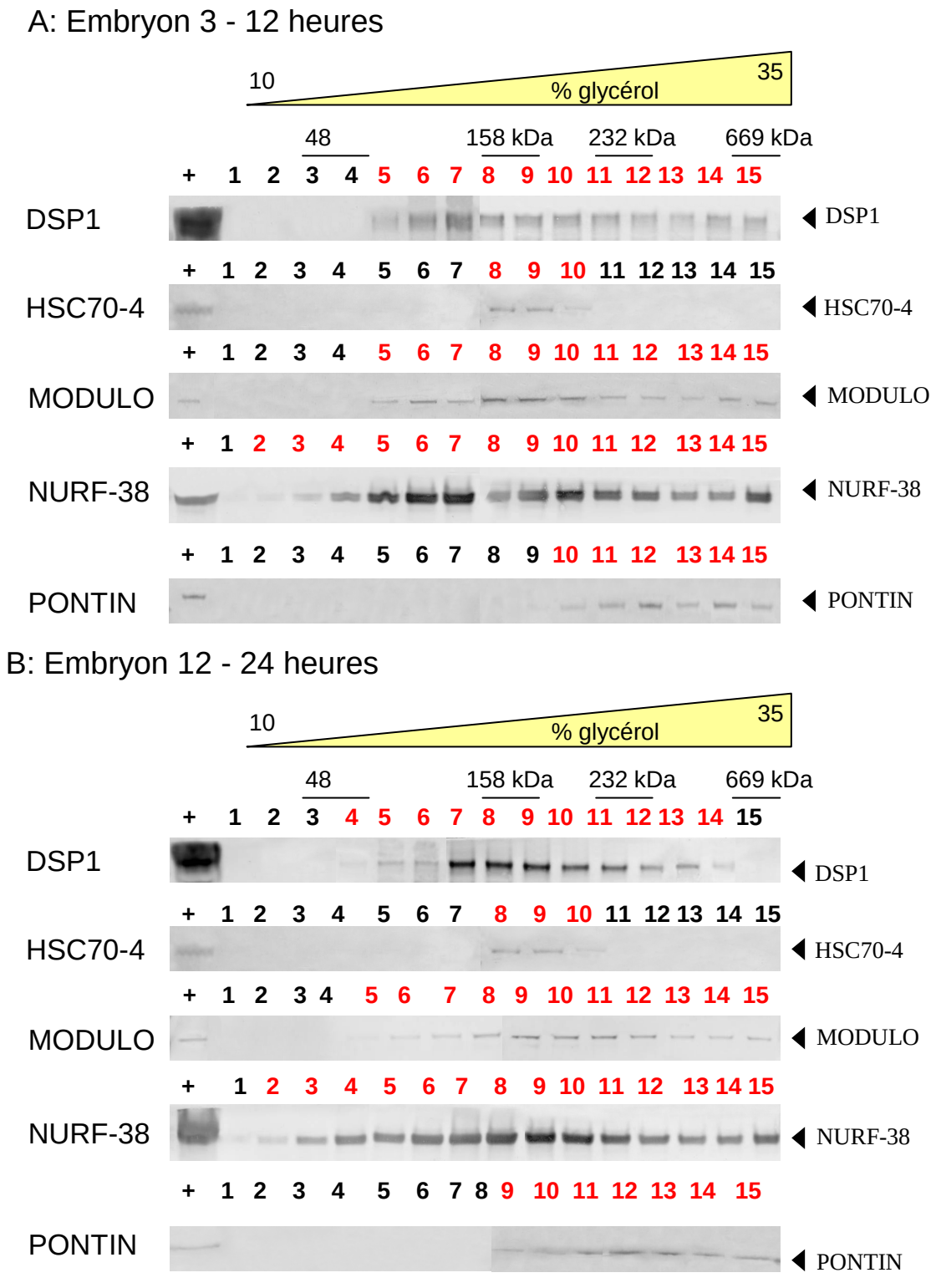


Figure 42: ***Western blot avec des anticorps anti-DSP1, HSC70-4, Modulo, NURF 38 et Pontin sur les fractions issues du gradient de glycérol****. **A**: extrait des embryons âgés de 3-12h et **B**: extrait des embryons âgés de 12-24h. Les numéros correspondent aux différentes fractions. Les fractions où sont présentes les protéines sont indiquées en rouge.*

Dans les embryons âgés de 12 à 24 heures, le profil des protéines HSC70-4, Modulo, NURF-38 et Pontin est sensiblement le même que celui des gradients de glycérol avec les extraits protéiques d'embryons 3 à 12 heures. Seul le profil de la protéine DSP1 change. En effet, la protéine DSP1 est présente dans les fractions 4 à 14 correspondant à des tailles de 50 à 600 kDa. La protéine DSP1 n'est pas présente au fond du tube dans les gradients de glycérol séparant les extraits protéiques d'embryons âgés de 12 à 24 heures. Donc, le poids moléculaire des complexes contenant la protéine DSP1 varie au cours du temps. Dans les embryons âgés de 3 à 12 heures, la protéine DSP1 est présente dans des complexes de 100 à 669 kDa et plus alors que dans les embryons âgés de 12 à 24 heures, DSP1 est présente dans des complexes d'un poids moléculaire inférieur compris entre 100 et 600 kDa.

Premièrement, toutes les protéines HSC70-4, Modulo, NURF-38 et Pontin partagent des fractions communes avec la protéine DSP1 que ce soit dans les embryons âgés de 3 à 12 heures ou dans ceux âgés de 12 à 24 heures. Dans l'embryon, DSP1 peut faire partie de complexes contenant ces quatre protéines.

Pour les protéines HSC70-4, NURF-38 et Pontin, le profil des complexes contenant ces protéines a déjà été publié. Pour la protéine HSC70-4, Mollaaghababa et ses collaborateurs ont séparé les protéines extraites d'embryons âgés de 3 à 12 heures par tamisage moléculaire sur une colonne Superose 6 (Mollaaghababa *et al*., 2001). La présence de la protéine HSC70-4 est ensuite repérée dans les fractions par Western Blot. Le poids moléculaire des complexes contenant HSC70-4 est compris entre 66 kDA et 669 kDa et plus. Dans mon expérience, la protéine HSC70-4 est associée à des complexes allant de 150 à 200 kDa. Le poids des complexes contenant la protéine HSC70-4 est bien inférieur à celui observé par Mollaaghababa *et al*. La différence pourrait s'expliquer par la sensibilité de la révélation du Western Blot. Mollaaghababa utilise la chimiluminescence dont le seuil de détection est supérieur à la révélation par colorimétrie que j'utilise. Dans notre expérience, je n'observerais que le pic majoritaire de la protéine HSC70-4 observé par Mollaaghababa et ses collaborateurs. La différence observée pourrait également s'expliquer par les conditions d'extraction des protéines qui sont différentes. À la différence de Mollaaghababa, je n'extrairais des noyaux qu'une faible quantité de protéine HSC70-4.

Le profil des complexes embryonnaires contenant la protéine Pontin a été publié par (Diop *et al*., 2008). Bien qu'il n'y ait pas d'indication de taille, le fait que la protéine Pontin soit présente dans les mêmes fractions que la protéine BRM donne une indication sur la taille du complexe contenant Pontin. La taille du complexe BRM est de 1 à 2 MDa. Dans notre

expérience, la protéine Pontin est présente dans des complexes dont le poids moléculaire est compris entre 200 kDa et 669 kDa et plus. Ce résultat est compatible avec celui publié par Diop et ses collaborateurs.

La protéine NURF-38 fait partie du complexe de remodelage de la chromatine NURF (NUcleosome Remodeling Factor). La taille du complexe NURF est de 500 kDA dans les embryons âgés de 0 à 12 heures (Tsukiyama et Wu, 1995). Dans les embryons de 3 à 24 heures, la protéine NURF-38 fait partie de complexes dont le poids moléculaire est compris entre 40 kDa à 669 kDa et plus. Ce résultat, en accord avec celui publié par Tsukiyama et Wu, indique que la protéine NURF-38 interagirait avec des complexes d'une taille plus importante que le complexe NURF.

Aucune donnée moléculaire sur la taille des complexes contenant la protéine Modulo n'a été publiée. La protéine Modulo est présente dans des complexes dont le poids moléculaire est compris entre 100 kDa et 669 kDa et plus. Ceci est en accord avec le fait que Modulo interagit avec PRC1 qui est un complexe dont la taille est supérieur à 1 MDa (Saurin *et al*., 2001).

En conclusion, les protéines DSP1, HSC70-4, Modulo, NURF-38 et Pontin partagent des fractions communes : elles pourraient faire partie de complexes communs. J'ai décidé d'approfondir l'étude des interactions entre DSP1 et Rm62 au vu des résultats génétiques.

b) Avec la protéine Rm62.

(1) Introduction à l'article.

Nous nous sommes intéressés à l'interaction entre la protéine DSP1 et Rm62. Les premiers résultats d'interaction génétique entre *dsp1* et *Rm62* ont montré que les produits de ces gènes régulent ensemble deux cibles communes : les gènes *Ubx* et *Abd-B*. Cette forte interaction génétique nous a poussé vers la caractérisation de l'interaction physique entre DSP1 et Rm62. La protéine Rm62 est une ARN hélicase à boîtes DEAD. Les hélicases sont des protéines qui rompent les interactions double brin entre ADN, ARN et les duplex ARN-ADN en utilisant l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP. Les hélicases sont regroupées en cinq superfamilles nommées SF1 à SF5. Les ARN hélicases à boîtes DEAD sont classées dans la famille SF2 dont les protéines sont actives à l'état de monomère ou de dimère. Les noms de ces hélicases sont dérivés de la séquence d'acides aminés D-E-A-D (Asp–Glu–Ala–Asp). Les ARN hélicases à boîtes DEAD sont associées à tous les processus impliquant l'ARN (Cordin *et al*., 2006). Ces protéines, souvent multifonctionnelles, sont des cofacteurs (coactivateur ou corepresseur) des protéines impliquées dans la régulation de la transcription des gènes (Fuller-Pace, 2006). A ma connaissance, Rm62 serait la première ARN hélicase à boîtes DEAD identifiée comme régulant les gènes homéotiques. C'est pourquoi, nous avons voulu caractériser l'interaction entre les protéines DSP1 et Rm62. Puis, nous avons précisé génétiquement le rôle du produit du gène *Rm62*. Ce travail a fait l'objet d'un article publié par le journal Genesis « Rm62, A DEAD-Box RNA Helicase, Complexes With DSP1 in Drosophila Embryos » (Lamiable *et al* 2010).

genesis
The Journal of Genetics and Development

Rm62, a DEAD box RNA helicase, complexes with DSP1 in Drosophila embryos

Journal:	*genesis*
Manuscript ID:	gen-2009-0105.R1
Wiley - Manuscript type:	Article
Date Submitted by the Author:	
Complete List of Authors:	Lamiable, Olivier; CBM Rabhi, Makhlouf; CBM Péronnet, Frédérique; UPMC Locker, Daniel; CBM Decoville, Martine; CBM
Keywords:	Drosophila melanogaster, dsp1, Rm62, RNA helicase, Enhancer of trithorax and Polycomb, chromatin, multimeric protein complex

scholarONE™
Manuscript Central

For Review

Rm62, a DEAD box RNA helicase, complexes with DSP1 in *Drosophila* embryos

Lamiable O*., Rabhi M*., Peronnet F§., Locker D*. and Decoville M*.

*Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR 4301, conventionnée avec l'Université d'Orléans, 45071 Orléans, France.

§ Université Pierre et Marie Curie-Paris6, UMR7622 Paris, F-75005 France; Centre Nationale de la Recherche Scientifique, UMR7622, Laboratoire de Biologie du Développement, Equipe Chromatine et Développement, Paris, F-75005 France

For Peer Review

Summary

Two main classes of proteins, Polycomb group (PcG) and Trithorax group (TrxG) play a key role in the regulation of homeotic genes. These proteins act in multimeric complexes to remodel chromatin. A third class of proteins named Enhancers of Trithorax and Polycomb (ETP) modulates the activity of TrxG and PcG, but their role remains largely unknown. We previously identified an HMGB-like protein, DSP1 (Dorsal Switch Protein 1), which was classified as an ETP. Preliminary studies have revealed that DSP1 is involved in multimeric complexes. Here we identify a DEAD box RNA helicase, Rm62, as partner of DSP1 in a 250 kDa complex. Coimmunoprecipitation assays performed on embryo extracts indicate that DSP1 and Rm62 are associated in 3 to 12h embryos. Furthermore, DSP1 and Rm62 colocalize on polytene chromosomes. Consistent with these results a mutation in *Rm62* enhances a null mutation of *dsp1* and also mutations of *trxG* or *PcG*, suggesting that Rm62 has characteristics of an ETP. We show here for the first time that an RNA helicase is involved in the maintenance of homeotic genes.

Keywords : *Drosophila melanogaster*; *dsp1; Rm62;* RNA helicase; Enhancer of trithorax and Polycomb; chromatin; multimeric protein complex

INTRODUCTION

Initially discovered in *Drosophila melanogaster* as regulators of homeotic genes (*Hox* genes), Polycomb group (PcG) proteins and Trithorax group (TrxG) proteins act on chromatin modification and ensure the maintenance of gene expression patterns during development. These two classes of proteins have antagonist functions; PcG proteins maintain transcriptional repression whereas TrxG proteins maintain transcriptional activation. In addition to their role in *Hox* gene regulation, PcG and TrxG proteins are involved in many developmental processes and diseases. These proteins are present in mammals, insects and plants where they regulate hundreds of genes (Rajasekhar and Begemann, 2007; Sparmann and van Lohuizen, 2006).

PcG and TrxG proteins act at the chromatin level as part of multimeric complexes (Grimaud *et al.*, 2006; Schuettengruber *et al.*, 2007). Three PcG complexes have been biochemically characterized: PhoRC, Polycomb repressive complexes 1 and 2 (PRC1, PRC2). The PhoRC complex includes the sequence specific DNA binding protein Pleiohomeotic (Pho) and dSfmbt which binds to mono and dimethylated lysine 9 of histone H3 (H3K9) and lysine 20 of histone H4 (H4K20) (Klymenko *et al.*, 2006). The core complex of PRC2 contains Extra Sex Combs (ESC), Suppressor of zeste 12 [Su(Z)12], Enhancer of zeste [E(Z)] and Nurf-55. The E(Z) subunit contains a SET domain which trimethylates lysine 27 of histone H3 (H3K27me3). Additional proteins interact with PRC2 like the histone deacetylase RPD3 and Polycomblike (PCL) (Müller *et al.*, 2002; Tie *et al.*, 2001). The PRC1 complex binds H3K27me3 through the chromodomain of Polycomb (PC). PC is a subunit of the core complex of PRC1 which contains also Polyhomeotic (PH), Posterior sex combs (PSC) and dRING (Shao *et al.*, 1999). Additional proteins are associated to the core complex such as TBP-associated factors (TAFs) or the DNA binding protein Zeste (Saurin *et al.*, 2001).

In *Drosophila*, two TrxG complexes have been purified so far. The BRM complex is an ATP-dependent chromatin remodelling complex which contains the SWI/SNF protein Brahma (BRM) and the proteins Moira, Osa and Snf5-Related 1 (Papoulas *et al.*, 1998). The TAC1 (Trithorax Acetylation Complex) complex contains Trithorax (TRX) which trimethylates lysine 4 of histone H3 (H3K4me3) through its SET domain, the CREB Binding Protein (dCBP) and SBF1 (Petruk *et al.*, 2001). Two other TrxG complexes have been identified: ASH1 and ASH2 complexes (Absent, Small, or Homeotic discs 1 or 2). The ASH1 protein also contains a SET domain and interacts with dCBP (Bantignies *et al.*, 2000; Papoulas *et al.*, 1998).

For Peer Review

The activity of PcG and TrxG proteins is modulated by a third class of maintenance proteins named Enhancers of Polycomb and Trithorax (ETP). This term was proposed by Gildea *et al.* (2000) who have shown that mutations in a set of 6 genes originally identified as *PcG* genes [*Asx, E(z), E(Pc), Psc, Scm and Su(z)2*], enhance *trxG* phenotypes. ETPs play a dual role in repression and activation of *Hox* genes, which is distinct from that of PcG and TrxG. Further studies identified other ETP proteins, such as GAF or Pho, which directly binds a PC-containing complex as well as the BRM complex (Mohd-Sarip *et al.*, 2002). However the mode of action of ETPs remained elusive. Some ETPs belong to PcG complexes [E(Z), PSC and SCM] but most of them [such as ASX, Corto, GAF and Su(Z)2] have not been found in PcG or TrxG complexes. One hypothesis is that ETPs by transiently interacting with PcG or TrxG complexes help their recruitment at target sites onto chromatin. Several ETPs have been found in the nucleus and on polytene chromosomes, and some of them (Corto, DSP1, ASX) bind to maintenance elements (ME) of *Hox* genes (Milne *et al.*, 1999; Salvaing *et al.*, 2006).

The *dsp1* gene was previously classified as an *ETP* (Decoville et *al.*, 2001). A null mutation in *dsp1* causes anterior transformations such as haltere to wing transformations which are *trxG* phenotypes, posterior transformation such as A4 transformed into A5 linked to *PcG* phenotype, and enhances several *trxG* mutations. The *dsp1* gene encodes a HMGB protein of 386 amino acids with two HMG boxes. HMGB proteins are known to bind to curved or distorted DNA and to bend DNA (Thomas and Travers, 2001).The DSP1 protein is ubiquitously expressed during development and is localised in the nucleus. DSP1 is found at 170 sites on polytene chromosomes, some of which are common with those of PcG or TrxG proteins. However, DSP1 has not been found stably associated with PcG or TrxG complexes. DSP1 has been shown to bind to maintenance elements of *Hox* genes, in particular to the ME of *Scr* (Salvaing *et al.*, 2006) and to the minimal Polycomb Response Element *Fab-7* where it is necessary for the recruitment of PH (Déjardin et *al.*, 2005). In a preliminary study, we have shown that DSP1 was part of stable complexes in embryos (Rappailles *et al.*, 2002).

Here we characterise DSP1-containing complexes. We have shown that DSP1 is involved in different complexes during embryonic development. We performed an immunopurification of embryonic complexes using anti DSP1 antibodies to identify the partners of DSP1. Several proteins were revealed by mass spectrometry analysis of the DSP1 interacting partners. Among them, Rm62, a mammalian homolog of the DEAD-box RNA helicase P68, is detected. To date RNA helicases have never been implicated in PcG or TrxG complexes. Therefore, we performed genetics and biochemical studies to try to understand the

For Peer Review

biological function of Rm62 in PcG or TrxG regulation. Our results suggest that Rm62 is a novel ETP and regulates homeotic genes together with DSP1.

RESULTS

DSP1 is present in a new complex

Genetic interaction studies have suggested that DSP1 could physically be involved in multimeric complexes (Decoville *et al*, 2001). To date, DSP1 has not been found in the different PcG or TrxG complexes identified. In a preliminary study we have shown that DSP1 was not in a monomeric form *in vivo*, but was mostly involved in a multimeric complex of about 200 kDa in size (Rappailles *et al.*, 2002). In addition, a faint signal was also detected in high molecular weights (1MDa), suggesting that DSP1 could be associated with different complexes, some of them being of very high molecular weight. To identify DSP1–associated proteins, we isolated DSP1 complexes from 1 to 20h embryonic extracts by immunoaffinity purification using purified antibodies directed against DSP1 fixed on agarose beads. After elution, the fractions were separated on SDS PAGE. Several discrete bands not found in the control experiment (IgG coated beads) were resolved after staining with Coomassie blue (Fig. 1a). The most intense band appeared to be DSP1, judging from its mobility and detection with anti DSP1 antibodies (data not shown). Proteins corresponding to other bands were identified by mass spectrometry. Among them, the analysis revealed the presence of Rm62, a DEAD-box putative RNA helicase. Since this protein family has not been previously found involved in PcG or TrxG complexes, we focused our study on Rm62. Other DSP1 interacting proteins will be described elsewhere. To validate the interaction between DSP1 and Rm62, we engineered a transgenic strain expressing a C-term FLAG-tagged DSP1. Embryonic nuclear extracts (1 to 20h) were fixed on FLAG antibodies coated agarose beads. After elution by competition with a FLAG peptide, the eluted proteins were analysed by Western blot using anti-FLAG antibodies and anti-Rm62 antibodies (Fig. 1b). A control experiment was performed using embryonic extracts from the w^{1118} strain without the transgene. It clearly appears that Rm62 coprecipitates with FLAG-DSP1. This result confirmed that DSP1 and Rm62 physically interact in *Drosophila* embryos.

In order to determine the size of the complex containing DSP1 and Rm62 and to better understand their association, we fractionated embryonic extracts (0 to 24h) on a 10-35% glycerol gradient and performed immunoprecipitation from pooled fractions (Fig. 1c, d). As previously shown by fractionation on a Sepharose 400 column, complexes containing DSP1

were found in fractions 7 to 11 (150 to 250 kDa) and also in the bottom of the gradient (> 669 kDa). Rm62 and DSP1 co-fractionated, as Rm62 is found in fractions 9 to 15. The broad distribution of DSP1 and Rm62 suggests that these proteins are probably involved in multiple different complexes. To determine the size of the complex containing both DSP1 and Rm62, we carried out immunoprecipitation from pooled fractions 8-9, 11-12 and 14-15 (Fig. 1d). As shown, anti-DSP1 antibodies coimmunoprecipitated Rm62 mainly from the pooled fractions 11-12, but not from the pooled fractions 14-15. These data indicate that DSP1 and Rm62 are only associated in a 250 kDa complex and not in larger ones.

Ubiquitous expression of Rm62

We have previously shown that DSP1 is ubiquitously expressed throughout the embryonic development. It is also expressed in imaginal discs and salivary glands of third instar larvae, and in head and ovaries of adults (Mosrin-Huaman *et al.*, 1998). Rm62 is expressed in ovaries of adults, in larvae, salivary glands and in 0 to 12h embryos (Buszczak and Spradling, 2006). To obtain a more precise pattern of expression of Rm62, we performed Western blot experiments with anti-Rm62 antibodies, using extracts of staged embryos, various imaginal discs from third instar larvae and several adult tissues (Fig. 2). Two bands were detected with the anti Rm62 antibodies as described by Buszczak and Spradling (2006), which could correspond to two Rm62 isoforms. Rm62 is present at every embryonic stages, in all the larval imaginal discs tested (T1 and T3 legs, wings, halteres) and in adult head, testis, and ovaries. The presence of Rm62 in ovaries, in non-fertilized eggs and in 0 to 3h old embryos indicates that Rm62 is maternally flowed into oocytes such as DSP1. Therefore, DSP1 and Rm62 are simultaneously expressed, except in adult testis where DSP1 is undetectable.

DSP1 and Rm62 are involved in different complexes during embryogenesis

Several PcG complexes have been shown to undergo dynamic changes during embryogenesis (Tie *et al.*, 2003). In order to determine the temporal pattern of the interaction between DSP1 and Rm62, we performed fractionation of staged embryo extracts on glycerol gradient followed by coimmunoprecipitation assays. The fractionation of nuclear extracts from 8 to 12h embryos, shown in Fig.3, revealed that the sedimentation profiles of DSP1 and Rm62 partially overlap in fraction 8 to 15. In 12 to 24h embryos, DSP1 was no longer detected in large complexes (669 kDa), in contrast, Rm62 was mostly detectable in large complexes suggesting that DSP1 and Rm62 are not involved in the same complex at this

For Peer Review

stage. The two proteins showed a broad distribution, suggesting that they are involved in multiple different complexes.

Coimmunoprecipitation experiments using anti-DSP1 antibodies and staged embryos showed that the Rm62/DSP1 complex was found in young embryos (3 to 12 h). The weak intensity of the Rm62 band suggests that only a small fraction of Rm62 is involved in the DSP1/Rm62 complex at this time of development.

The DSP1/Rm62 complex is involved in regulation of *Hox* gene expression

Next, we performed genetic studies to understand the biological function of the DSP1/Rm62 complex. DSP1 was previously shown to be involved in maintenance of several *Hox* genes. We analyzed the interaction between a null mutation of *dsp1 (dsp1^{1})* and a loss of function mutation of *Rm62* (*Rm62^{01086}*). The resulting phenotypes were studied in males hemizygotes for *dsp1^{1}* and heterozygous for *Rm62^{01086}* because Rm62 is essential for development (Table 1).

First, we looked for transformations of halteres into wings [thoracic segment 3 (T3) to thoracic segment 2 (T2) transformation] which reflect a lower expression of *Ubx* in T3 than in the wild-type. Males heterozygous *Rm62^{01086}*/+ did not show any T3 to T2 transformation, and 0.7% of males hemizygous for *dsp1^{1}* display T3 to T2 transformations. In contrast, in 1.3% of males hemizygous for *dsp1^{1}* and heterozygous for *Rm62^{01086}* T3 to T2 transformations are observed. We also searched for A6 (abdominal segment 6) to A5 (abdominal segment 5) transformations which are characterized by bristles on male A6 due to defect in the *iab-6* regulatory element of the *Abd-B* gene. We observed bristles on A6 in 8% of hemizygous *dsp1^{1}/Y* males and in 3% of heterozygous *Rm62^{01086}*/+ males. The frequency was increased to 38% in males *dsp1^{1}/Y; Rm62^{01086}*/+. These results indicate that the DSP1/Rm62 complex could be involved in the regulation of *Abd-B*, and more precisely through the *iab6* cis-regulatory element for the *Abd-B* gene.

Chromosomal colocalization of DSP1 and Rm62

We have previously described the binding of DSP1 onto polytene chromosomes, where it associates with 173 specific chromosomal sites (Salvaing *et al.*, 2006). Rm62 has also been reported to be associated with puffs on polytene chromosomes (Buszczak and Spradling, 2006). To further investigate the association of DSP1 and Rm62 *in vivo*, we examined the co-localization of DSP1 and Rm62 on polytene chromosomes. As shown in Figure 4, the two proteins bound many sites as expected. Rm62 colocalized with many but not all DSP1 sites. The inverse was also true, DSP1 did not colocalize with all the Rm62 binding sites. These results are consistent with biochemical and genetics data presented above.

For Peer Review

In order to investigate the role of DSP1 in Rm62 recruitment to chromosomal sites, we attempted localization of Rm62 on polytene chromosomes from *dsp1*^{1} mutants. Unfortunately, polytene chromosomes from *dsp1*^{1} mutants were of poor quality and did not allow to determine precisely if Rm62 binding sites were lost in the absence of DSP1. Nevertheless these results indicate that DSP1, or the chromatin complexes associated with it, are involved in the integrity of the chromosomes.

Rm62 has characteristics of an ETP

As we showed that a loss of function mutation in *Rm62* is able to enhance the phenotype associated with a null mutation of *dsp1*, we next asked whether the *Rm62*^{01086} mutation is also an enhancer of other *trxG* or *PcG* mutations. To address this question we crossed *Rm62*^{01086}*/TM3* males with females heterozygous for a *trxG* or *PcG* mutation and we analysed the phenotypes of the doubly heterozygous in the offspring (Table 1). When crossing with *trxG* mutants, we focused on T3 to T2 and A6 to A5 homeotic transformations that reflect *Ubx* and *Abd-B* misregulation, respectively. When crossing with *PcG* mutants, we examined the number of T3 and T2 leg transformations into T1 leg and the number of teeth per sex-comb, these phenotypes reflecting the activity of the *Sex combs reduced* (*Scr*) gene.

Interaction with *trxG* genes was studied with mutant alleles of *trx* (*trx*^{E2}, an amorph allele) and *brm* (*brm*^{2}, an amorph allele). No increase in the number of transformations of halteres into wings or A6 into A5 was observed in males doubly heterozygous for *Rm62*^{01086} and *brm*^{2}. In contrast, transformation of halteres into wings, and to a lesser extend of A6 into A5, was observed in the doubly heterozygous *trx*^{E2}*/ Rm62*^{01086}. We also studied the interaction between *Rm62*^{01086} and another allele *trx*^{1}, but no increase of homeotic transformations was observed. This can be explained by the hypomorph nature of the *trx*^{1} allele which probably produces normal TRX protein but at a reduced level (Breen and Harte, 1991; Ingham, 1985; Ingham and Whittle, 1980).

Interaction with *Pc* displayed an enhanced extra sex comb phenotype of *Pc*: 95% of males heterozygous *Rm62*^{01086}*/Pc*^{1} showed T2 and T3 transformed into T1 instead of 64% in males *Pc*^{1}/+ and 0% in *Rm62*^{01086}/+. We also examined the number of teeth of the extra sex comb on T2 and T3 legs. The average number of teeth on T2 was 2.4 in the double mutant *Rm62*^{01086}*/Pc*^{1} *vs.* 1.5 in the single mutant *Pc*^{1}/+. A similar result was observed for T3 legs (0.9 teeth in doubly heterozygous males *vs.* 0.4 in single mutant). These data reveal that the *Rm62*^{01086} mutant is able to enhance the phenotype of *trxG* or *PcG* mutants, and therefore that Rm62 displays characteristics of an ETP.

For Peer Review

DISCUSSION

DSP1 is a HMGB protein which behaves as an Enhancer of Trithorax and Polycomb. Indeed, a *dsp1* null allele enhances the haltere to wing transformation of several *trxG* mutants (*ash1, trx*), whereas male hemizygotes for this allele exhibit transformation of A4 segment into a more posterior one, which is a *PcG* phenotype (Decoville *et al.*, 2001). Furthermore, using chromatin immunoprecipitation (ChIP) coupled with genome wide high-density tilling arrays Schuettengruber *et al.* (2009) have shown that DSP1 binds to 225 PcG and 1182 TrxG binding sites as expected for an ETP. DSP1 is also involved in the recruitment of PcG proteins at the *Fab-7* locus (Déjardin *et al.*, 2005). Little is know about the mode of action of ETP. To date, DSP1 has not been found in any PcG or TrxG complex purified. Considering these data, we asked whether DSP1 was also associated with other proteins in a multimeric complex. Analysis of embryonic protein extracts by gel filtration revealed that DSP1 was not in a monomeric form. DSP1 showed a broad distribution (150 kDa to > 669 kDa) suggesting that it is involved in complexes of different sizes. This is consistent with the observation that DSP1 exhibits physical and genetic interactions with different factors. Moreover, the *dsp1* mutant displays a pleiotropic phenotype, suggesting that DSP1 can direct various functions by interacting with different complexes. For example, it has been demonstrated that DSP1 interacts with the Bicoid protein in very young embryos to regulate the gap segmentation gene *knirps* (Daulny *et al.*, 2003). Moreover, DSP1 has been found to play a repressive role in innate immune response in *Drosophila* by forming a repressosome complex with dAP-1 and Stat92E (Kim *et al.*, 2007). This complex is recruited with HDAC1 to the promoter regions of NF-κB target genes and inhibits transcription.

During embryogenesis, the size of DSP1 complexes differs. DSP1 was mostly found in a complex of about 200 kDa, but also in a higher molecular mass one (> 669 kDa). The association of DSP1 with this high molecular mass complex is only transient as DSP1 is no longer found in > 669 kDa complex in 12 to 24h embryonic extracts. DSP1 shows the same distribution in embryonic extracts from 3 to 8h or 8 to 12h embryos (data not shown). In addition we have observed that DSP1 is only found in low molecular mass fractions (< 200 kDa) in very young embryos (0 to 3h) extracts (data not shown). One of the functions of DSP1 is to recruit PcG proteins. This can explain why DSP1 is not always associated with a > 669 kDa complex, if considering that DSP1, once PcG proteins recruited, dissociates. Similarly, PCL or RPD3, components of the 1 MDa PRC2 complex, show a transient association with the 1 MDa PRC2 complex (Tie *et al.*, 2003).

For Peer Review

DSP1 belongs to the HMGB family, which has several members in *Drosophila*. Apart from the uncharacterized CG7045 and CG7046, the others HMGB proteins have been implicated in chromatin remodelling. SSRP1 is a component of the FACT complex (Shimojima *et al.*, 2003), BAP111 and Polybromo (BAP180) are part of the BRM complex (Mohrmann *et al.*, 2004; Papoulas *et al.*, 2001), and *HmgD/Z* have been shown to genetically interact with *brm* (Ragab *et al.*, 2006). This is not true for *dsp1* as it interacts with *trx* but not with *brm*. Mass spectrometry analysis of the proteins immunopurified along with DSP1 did not reveal any peptides corresponding to known TrxG proteins (data not shown). This is consistent with the size of the complex containing DSP1 which does not correspond to any identified complex. This could indicate that different HMGB proteins participate in chromatin remodelling at specific subset of promoters. This was also suggested by results of genetic interactions. *dsp1* enhances the *trx* phenotype but not the *brm* one, in opposition to *HmgD/Z* (Ragab *et al.*, 2006).

DSP1 interacts with the DEAD-box RNA helicase Rm62.

As DSP1 is part of new multimeric complexes, we then identified the proteins interacting with DSP1 using immunoprecipitation. Mass-spectrometry analysis of DSP1 associated proteins revealed the presence of Rm62, a DEAD-box putative RNA helicase (also named Dmp68). Rm62 is encoded by an essential gene *Rm62* also called *Lighten up (Lip)*. The *Lighten up* gene has been identified in a mutagenic screen to detect dominant second site modifiers of white-blood, a retrotransposon induced allele of the white eye colour locus (Csink *et al.*, 1994). It has also been shown to be a suppressor of position effect variegation, suggesting a role in chromatin remodelling. In addition, Rm62 regulates negatively the gypsy insulator activity, suggesting that it plays a role in nuclear architecture and chromatin organisation (Lei and Corces, 2006). Recently, Buszczak *et al.*, (2006) have shown that Rm62 regulates transcriptional deactivation. In *Rm62* mutants, *hsp70* mRNAs accumulate in the nucleus near its sites of transcription following heat-shock, indicating that Rm62 is required to rapidly remove transcripts from chromatin, allowing shutting-down of gene activity. In addition, Rm62 is required for efficient RNAi in S2 cells (Ishizuka *et al.*, 2002) and Zambon et *al.* (2006) have shown that Rm62 is essential for antiviral RNAi response in Drosophila. Park et al. (2004) have also identified Rm62 as an alternative splicing regulator. Rm62 is the fly homolog of mammalian p68 DEAD-box RNA helicase. p68 was one of the first proteins shown to have *in vitro* RNA helicase activity (Ford *et al.*, 1988; Hirling *et al.*, 1989). A second DEAD-box RNA helicase, p72, is very similar to p68 (90% amino acid sequence identity over the conserved core), co-localizes and interacts with p68 (Lamm *et al.*, 1996).

For Peer Review

These two proteins exhibit multiple functions. p68 and p72 are involved in both pre-mRNA and pre-rRNA processing. Similarly to Drosophila Rm62, p68 is involved in alternative splicing (Camats *et al.*, 2008). More interestingly, p68 and p72 are implicated as co-regulators of transcription. They co-activate the estrogen-receptor α (ERα) and p53 (Bates *et al.*, 2005; Endoh *et al.*, 1999). Furthermore, p68 was found to interact with the CBP coactivator and RNA polymerase II (Rossow and Janknecht, 2003). Wilson *et al.* (2004) demonstrated that p68 and p72 can also function as co-repressors depending of the promoter and associate with histone deacetylase 1 (HDAC1). Interestingly, their RNA helicase activity is not required for co-activation or co-repression. Studies about the implication of p68 or p72 on the regulation of ERα or MyoD suggest that these two proteins play a critical role in promoting assembly of of the initiation complex and in chromatin remodelling (Caretti *et al.*, 2006, 2007; Endoh *et al.*, 1999).

In this work, we show that Rm62 stably associates with DSP1, an ETP, in a complex of about 250 kDa in size. However, the DSP1/Rm62 complex is only a small fraction of all DSP1 or Rm62 complexes. Genetic interaction experiments further confirmed this association. Transformation of A6 into A5 was enhanced in males hemizygous for $dsp1^{1}$ and heterozygous for $Rm62^{01086}$. These results suggest that the two proteins are involved in the activation of *Abd-B* through the *iab-6 cis*-regulatory element. As expected, the two proteins share binding sites on polytene chromosomes. As *Rm62* interacts with *dsp1* which is an *ETP*, we asked whether *Rm62* would interact with other *trxG* or *PcG*. We show that doubly heterozygotes $Rm62^{01086}/trx^{E2}$, but not $Rm62^{01086}/brm^{2}$ ones, exhibit transformation of T3 into T2, suggesting that *Rm62* participates, together with *trx*, to *Ubx* regulation. Furthermore, it shows that *Rm62* interacts specifically with *trx*, similarly to *dsp1*. TRX is part of the Trithorax Acetylation Complex (TAC1), which is composed of three proteins: TRX, dCBP and SBF1, and acetylates core histones in nucleosomes (Petruk *et al.*, 2001). On the other hand, we show that *Rm62* is also able to enhance the *Pc* sex-comb phenotype, suggesting that it would act as a repressor of *Sex combs reduced*, in opposition to *dsp1* which suppresses this *Pc* phenotype. Thus it is tempting to draw a parallel between Rm62 and p68 which acts also as a co-activator or a co-repressor depending of the promoter. Synergism between p68 and CBP has already been observed (Rossow and Janknecht, 2003) and p68 has been shown to interact with HDAC1 in human. In *Drosophila* HDAC1 plays an essential role in homeotic gene silencing, in particular *HDAC1* enhances the extra sex-comb *Pc* phenotype.

For Peer Review

Our results have two implications: first, in *Drosophila*, Rm62 (like p68/p72 in mammals) can act as a co-activator or a co-repressor depending of the considered locus; secondly, DSP1 and Rm62 regulate the same *Hox* genes but in different ways according to the *Hox* gene. We have demonstrated that *Rm62* has characteristics of an *ETP* as it enhances *trx* and *Pc* mutations. This is the first time that an RNA helicase is shown to be involved in the regulation of *Hox* gene expression maintenance. Further work will address the relevance of Rm62 RNA helicase activity for its function.

MATERIALS AND METHODS

Drosophila strains and genetics

Fly stocks were raised at 22°C on standard cornmeal-agar-yeast medium. Oregon-R, w^{1118}, P{PZ}$Rm62^{01086}$ ry^{506}/TM3, ry^{RK} Sb^{1} Ser^{1} and *da::Gal4* were obtained from the Bloomington Fly Stock Center. The $dsp1^{1}$ null mutation was described in Mosrin-Huaman *et al.* (1998). Oregon-R was used as wild-type reference strain. Crosses were performed according to standard procedures at 22°C. The *UAS::dsp1-3xFLAG* line was constructed by cloning the cDNA encoding DSP1 into the drosophila Gateway vector pPWF and established by standard P-element mediated transformation (EMBL). To express the tagged DSP1 protein, we tried to construct a strain containing the driver *da::Gal4* and the *UAS::dsp1-3xFLAG* transgene. We used a line with the *UAS::dsp1-3xFLAG* transgene inserted in the second chromosome. As we never obtained doubly homozygous flies, we maintained a strain heterozygous for *da::Gal4* and homozygous for *UAS::dsp1-3xFLAG*: *UAS::dsp1-3xAG/UAS::dsp1-3xFLAG ;da::Gal4/TM3.*

Preparation of embryonic nuclear extracts

Different stages of embryos were collected from w^{1118} or *UAS::dsp1-3xFLAG; da::Gal4/TM3* strains. Nuclear extracts were prepared as described in Klymenko et *al.* (2006). Briefly, dechorionated embryos were homogenized with a glass Dounce homogenizer in buffer NU1 (15 mM HEPES pH 7.6, 10 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 0.1 mM EDTA pH 7.9, 0.5 mM EGTA pH 7.9, 350 mM Sucrose, 2 mM DTT, 0.2 mM PMSF). Lysate was filtered through miracloth and nuclei were pelleted by centrifugation in Superlite GSA rotor at 9000 rpm for 15 minutes. After discarding the supernatant, the nuclei pellet was resuspended in low-salt buffer (15 mM HEPES, 20% glycerol, 1.5mM $MgCl_2$, 20 mM KCl, 0.2 mM EDTA pH 7.9, 1 mM DTT, "complete" protease inhibitor cocktail (Roche) and lysed by addition of high-salt buffer (15 mM HEPES, 20% glycerol, 1.5 mM $MgCl_2$, 800 mM KCl, 0.2 mM EDTA pH 7.9, 1 mM DTT). Soluble nuclear material was separated from insoluble chromatin

For Peer Review

and lipids by centrifugation in SW55 rotor at 35000 rpm for 1 hour. After dialysis against NE200 buffer (15 mM HEPES, 20% glycerol, 1.5 mM $MgCl_2$, 200 mM KCl, 0.2 mM EDTA pH 7.9, 1mM DTT) soluble nuclear extract was removed, quick-frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C.

Immunoaffinity purification of DSP1 complexes

Purification of DSP1 complexes was performed on 0 to 20h embryonic nuclear extracts from w^{1118} strain. Ten milliliters of embryonic nuclear extract were incubated with 200 µL of AminoLink® Plus Coupling Gel (Pierce) coupled with rabbit anti-DSP1 antibodies or rabbit IgG for 2 h at 4°C. Beads were washed four times with PA buffer (10mM Tris-HCL pH 8.0, 150 mM NaCL, 0,1% NP40, 2 mM $MgCl_2$, 0,1 mM EDTA, 0,5 mM DTT). Proteins were eluted with ImmunoPure® IgG Elution Buffer pH 2.8 (Pierce). After precipitation by cold acetone, proteins were taken in 1x SDS–Laemmli buffer and loaded on an exponential 4/12% SDS-PAGE gel. Bands of interest were subjected to in-gel trypsin digestion and LC1D-nanoESI-Q-TOF mass spectrometry at Plateforme de Protéomique Analytique et Fonctionnelle du Centre de Recherches INRA Nouzilly.

Co-immunoprecipitation

Five-hundred micrograms of embryonic protein extract were incubated with 20 µL of DSP1 antibodies coupled with AminoLink® Plus Coupling Gel (Pierce) for 2 h at 4°C. Immunoprecipitates were washed four times with PA buffer. Proteins were eluted with ImmunoPure® IgG Elution Buffer pH 2.8 (Pierce). Samples were analyzed by Western blotting. For immunoprecipitation of DSP1-3xFLAG, embryonic nuclear extracts from *da::Gal4/TM3; UAS::dsp1-3xFLAG/ UAS::dsp1-3xFLAG* embryos or w^{1118} embryos (control) were incubated with 20 µL of ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel (Sigma) 2h at 4°C. After washing with PA buffer, proteins retained on the gel were eluted with 100 µg/ml 3X FLAG peptide in TBS (Sigma) 8h at 4°C. The presence of proteins of interest was analyzed by Western blotting.

Glycerol gradient sedimentation analysis

Embryonic extract (1 mg of proteins in 200 µL) was directly loaded onto 4.6 mL of 10%–35% glycerol gradients in 5 mM Tris HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8. Sedimentation was done by centrifugation for 18 h at 35000 rpm in a Beckman SW 55 Ti rotor at 4°C. Fractions (300 µL) were collected and analyzed by Western blotting. Thyroglobulin (669 kDa), catalase (232 kDa), aldolase (158 kDa), and ovalbumine (48 kDa) were fractionated on separate gradients that were run in parallel.

Western blot analysis

For Peer Review

Larval and adult tissues were crushed in 10 µl of water, and SDS-Laemmli buffer was immediately added. Samples were boiled for 5 min prior to loading on a 8% SDS polyacrylamide gel. Western blotting was performed using the standard method. Briefly, after electrophoresis, proteins were electrotransferred onto nitrocellulose membranes using a Tris-Glycine-Methanol buffer (Tris base 48 mM, glycine 39 mM, SDS 0.037%, methanol 20%). The blot was blocked for 1h in 3% BSA/PBS, and incubated overnight at 4°C with the primary antibody in 1% milk/PBS. The filter was washed three times in PBS and incubated for 30 min at room temperature with the secondary antibody in PBS. For the detection, the filter was stained with NBT and BCIP reagents as described by Promega. Antibodies were used at the following concentrations: rabbit anti-DSP1 (1:50000, Agrobio), guinea pig anti-Rm62 (1:3000; kind gift from Busczak, Carnegie Institution of Washington, Baltimore, USA), mouse anti-FLAG® M2 (1:5000; Sigma-Aldrich), mouse anti-HP1 (1:5000; DSHB), goat anti-guinea pig IgG-AP (1:7500, Sigma-Aldrich), goat anti-mouse IgG-AP (1:7500, Promega), goat anti-rabbit IgG-AP (1:7500, Promega).

Immunolocalisation of proteins on polytene chromosomes

Squashes of third instar larvae salivary glands and immunostaining were performed as described by G. Cavalli (http://www.igh.cnrs.fr/equip/cavalli/link.labgoodies.html). The w^{1118} strain was used for these assays. Rabbit affinity purified anti-DSP1 (1:150) and guinea pig anti-Rm62 (1:500) were used as primary antibodies. Secondary antibodies (Alexa Fluor® 594 goat anti-rabbit IgG and Alexa Fluor® 488 goat anti-guinea pig IgG, Molecular Probes) were used at a 1:1000 dilution.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank V. Labas and Dr. S. Ronsseray for mass spectrometry analysis and immunolocalisation of proteins on polytene chromosomes, respectively. We particularly thank Dr. M. Buszczak for Rm62 antibodies. The HP1 antibody developed by Dr. L.L.Wallrath was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD and maintained by The University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA 52242. Comments from N. Locker helped improve the manuscript. This work was supported by Conseil Regional Centre and by a grant from MRT to O. L.

Correspondence and requests for materials should be addressed to M. Decoville, decovil@cnrs-orleans.fr

For Peer Review

LITERATURE CITED

Bantignies F, Goodman RH, Smolik SM. 2000. Functional interaction between the coactivator Drosophila CREB-binding protein and ASH1, a member of the trithorax group of chromatin modifiers. Mol. Cell. Biol 20:9317-9330.

Bates GJ, Nicol SM, Wilson BJ, Jacobs AF, Bourdon J, Wardrop J, Gregory DJ, Lane DP, Perkins ND, Fuller-Pace FV. 2005. The DEAD box protein p68: a novel transcriptional coactivator of the p53 tumour suppressor. EMBO J 24:543-553.

Breen TR, Harte PJ. 1991. Molecular characterization of the trithorax gene, a positive regulator of homeotic gene expression in Drosophila. Mech. Dev 35:113-127.

Buszczak M, Spradling AC. 2006. The Drosophila P68 RNA helicase regulates transcriptional deactivation by promoting RNA release from chromatin. Genes Dev 20:977-989.

Camats M, Guil S, Kokolo M, Bach-Elias M. 2008. P68 RNA helicase (DDX5) alters activity of cis- and trans-acting factors of the alternative splicing of H-Ras. PLoS ONE 3:e2926.

Caretti G, Lei EP, Sartorelli V. 2007. The DEAD-box p68/p72 proteins and the noncoding RNA steroid receptor activator SRA: eclectic regulators of disparate biological functions. Cell Cycle 6:1172-1176.

Caretti G, Schiltz RL, Dilworth FJ, Di Padova M, Zhao P, Ogryzko V, Fuller-Pace FV, Hoffman EP, Tapscott SJ, Sartorelli V. 2006. The RNA helicases p68/p72 and the noncoding RNA SRA are coregulators of MyoD and skeletal muscle differentiation. Dev. Cell 11:547-560.

Csink AK, Linsk R, Birchler JA. 1994. The Lighten up (Lip) gene of Drosophila melanogaster, a modifier of retroelement expression, position effect variegation and white locus insertion alleles. Genetics 138:153-163.

Daulny A, Rappailles A, Landemarre L, Locker D, Decoville M. 2003. DSP1 interacts with bicoid for knirps enhancement. Genesis 36:104-113.

Decoville M, Giacomello E, Leng M, Locker D. 2001. DSP1, an HMG-like protein, is involved in the regulation of homeotic genes. Genetics 157:237-244.

Déjardin J, Rappailles A, Cuvier O, Grimaud C, Decoville M, Locker D, Cavalli G. 2005. Recruitment of Drosophila Polycomb group proteins to chromatin by DSP1. Nature 434:533-538.

Endoh H, Maruyama K, Masuhiro Y, Kobayashi Y, Goto M, Tai H, Yanagisawa J, Metzger D, Hashimoto S, Kato S. 1999. Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor alpha. Mol. Cell. Biol 19:5363-5372.

Ford MJ, Anton IA, Lane DP. 1988. Nuclear protein with sequence homology to translation initiation factor eIF-4A. Nature 332:736-738.

For Peer Review

Gildea JJ, Lopez R, Shearn A. 2000. A screen for new trithorax group genes identified little imaginal discs, the Drosophila melanogaster homologue of human retinoblastoma binding protein 2. Genetics 156:645-663.

Grimaud C, Nègre N, Cavalli G. 2006. From genetics to epigenetics: the tale of Polycomb group and trithorax group genes. Chromosome Res 14:363-375.

Hirling H, Scheffner M, Restle T, Stahl H. 1989. RNA helicase activity associated with the human p68 protein. Nature 339:562-564.

Ingham PW. 1985. A clonal analysis of the requirement for the trithorax gene in the diversification of segments in Drosophila. J Embryol Exp Morphol 89:349-365.

Ingham P, Whittle R. 1980. Trithorax: a new homeotic mutation of Drosophila melanogaster causing transformations of abdominal and thoracic imaginal segments. Mol Gen Genet 179:607-614.

Ishizuka A, Siomi MC, Siomi H. 2002. A Drosophila fragile X protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins. Genes Dev 16:2497-2508.

Kim LK, Choi UY, Cho HS, Lee JS, Lee W, Kim J, Jeong K, Shim J, Kim-Ha J, Kim Y. 2007. Down-regulation of NF-kappaB target genes by the AP-1 and STAT complex during the innate immune response in Drosophila. PLoS Biol 5:e238.

Klymenko T, Papp B, Fischle W, Köcher T, Schelder M, Fritsch C, Wild B, Wilm M, Müller J. 2006. A Polycomb group protein complex with sequence-specific DNA-binding and selective methyl-lysine-binding activities. Genes Dev 20:1110-1122.

Lamm GM, Nicol SM, Fuller-Pace FV, Lamond AI. 1996. p72: a human nuclear DEAD box protein highly related to p68. Nucleic Acids Res 24:3739-3747.

Lei EP, Corces VG. 2006. RNA interference machinery influences the nuclear organization of a chromatin insulator. Nat. Genet 38:936-941.

Milne TA, Sinclair DA, Brock HW. 1999. The Additional sex combs gene of Drosophila is required for activation and repression of homeotic loci, and interacts specifically with Polycomb and super sex combs. Mol. Gen. Genet 261:753-761.

Mohd-Sarip A, Venturini F, Chalkley GE, Verrijzer CP. 2002. Pleiohomeotic can link polycomb to DNA and mediate transcriptional repression. Mol. Cell. Biol 22:7473-7483.

Mohrmann L, Langenberg K, Krijgsveld J, Kal AJ, Heck AJR, Verrijzer CP. 2004. Differential targeting of two distinct SWI/SNF-related Drosophila chromatin-remodeling complexes. Mol. Cell. Biol 24:3077-3088.

Mosrin-Huaman C, Canaple L, Locker D, Decoville M. 1998. DSP1 gene of Drosophila melanogaster encodes an HMG-domain protein that plays multiple roles in development. Dev Genet 23:324-34.

For Peer Review

Müller J, Hart CM, Francis NJ, Vargas ML, Sengupta A, Wild B, Miller EL, O'Connor MB, Kingston RE, Simon JA. 2002. Histone methyltransferase activity of a Drosophila Polycomb group repressor complex. Cell 111:197-208.

Papoulas O, Beek SJ, Moseley SL, McCallum CM, Sarte M, Shearn A, Tamkun JW. 1998. The Drosophila trithorax group proteins BRM, ASH1 and ASH2 are subunits of distinct protein complexes. Development 125:3955-3966.

Papoulas O, Daubresse G, Armstrong JA, Jin J, Scott MP, Tamkun JW. 2001. The HMG-domain protein BAP111 is important for the function of the BRM chromatin-remodeling complex in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 98:5728-5733.

Park JW, Parisky K, Celotto AM, Reenan RA, Graveley BR. 2004. Identification of alternative splicing regulators by RNA interference in Drosophila. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 101:15974-15979.

Petruk S, Sedkov Y, Smith S, Tillib S, Kraevski V, Nakamura T, Canaani E, Croce CM, Mazo A. 2001. Trithorax and dCBP acting in a complex to maintain expression of a homeotic gene. Science 294:1331-1334.

Ragab A, Thompson EC, Travers AA. 2006. High mobility group proteins HMGD and HMGZ interact genetically with the Brahma chromatin remodeling complex in Drosophila. Genetics 172:1069-1078.

Rajasekhar VK, Begemann M. 2007. Concise review: roles of polycomb group proteins in development and disease: a stem cell perspective. Stem Cells 25:2498-2510.

Rappailles A, Landemarre L, Locker D, Decoville M. 2002. DSP1 is part of a new large multiprotein complex. Dros. Inf. Serv. 85:7-8.

Rossow KL, Janknecht R. 2003. Synergism between p68 RNA helicase and the transcriptional coactivators CBP and p300. Oncogene 22:151-156.

Salvaing J, Decoville M, Mouchel-Vielh E, Bussière M, Daulny A, Boldyreva L, Zhimulev I, Locker D, Peronnet F. 2006. Corto and DSP1 interact and bind to a maintenance element of the Scr Hox gene: understanding the role of Enhancers of trithorax and Polycomb. BMC Biol 4:9.

Saurin AJ, Shao Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Kingston RE. 2001. A Drosophila Polycomb group complex includes Zeste and dTAFII proteins. Nature 412:655-660.

Schuettengruber B, Chourrout D, Vervoort M, Leblanc B, Cavalli G. 2007. Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. Cell 128:735-745.

Schuettengruber B, Ganapathi M, Leblanc B, Portoso M, Jaschek R, Tolhuis B, van Lohuizen M, Tanay A, Cavalli G. 2009. Functional anatomy of polycomb and trithorax chromatin landscapes in Drosophila embryos. PLoS Biol 7:e13.

Shao Z, Raible F, Mollaaghababa R, Guyon JR, Wu CT, Bender W, Kingston RE. 1999. Stabilization of chromatin structure by PRC1, a Polycomb complex. Cell 98:37-46.

For Peer Review

Shimojima T, Okada M, Nakayama T, Ueda H, Okawa K, Iwamatsu A, Handa H, Hirose S. 2003. Drosophila FACT contributes to Hox gene expression through physical and functional interactions with GAGA factor. Genes Dev 17:1605-1616.

Sparmann A, van Lohuizen M. 2006. Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. Nat. Rev. Cancer 6:846-856.

Thomas JO, Travers AA. 2001. HMG1 and 2, and related 'architectural' DNA-binding proteins. Trends Biochem. Sci 26:167-174.

Tie F, Furuyama T, Prasad-Sinha J, Jane E, Harte PJ. 2001. The Drosophila Polycomb Group proteins ESC and E(Z) are present in a complex containing the histone-binding protein p55 and the histone deacetylase RPD3. Development 128:275-286.

Tie F, Prasad-Sinha J, Birve A, Rasmuson-Lestander A, Harte PJ. 2003. A 1-megadalton ESC/E(Z) complex from Drosophila that contains polycomblike and RPD3. Mol. Cell. Biol 23:3352-3362.

Wilson BJ, Bates GJ, Nicol SM, Gregory DJ, Perkins ND, Fuller-Pace FV. 2004. The p68 and p72 DEAD box RNA helicases interact with HDAC1 and repress transcription in a promoter-specific manner. BMC Mol. Biol 5:11.

Zambon RA, Vakharia VN, Wu LP. 2006. RNAi is an antiviral immune response against a dsRNA virus in Drosophila melanogaster. Cell. Microbiol 8:880-889.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. DSP1 and Rm62 are part of a 250 kDa complex in embryos**. (a)** Coomassie staining of material from nuclear embryonic extracts immunopurified with antibodies directed against DSP1 (IP) or control IgG (C). **(b)** Coimmunoprecipitation of Rm62 and DSP1-3xFLAG. Material eluted from a FLAG affinity resin was probed by Western blotting with Rm62 or FLAG specific antibodies (IP), (IN) input material. A control was performed with extracts from w^{1118} strain. **(c)** Extracts derived from 0 to 20h w^{1118} embryos were separated on a 10-35% glycerol gradient and probed with antibodies against DSP1 or Rm62. Sedimentation of control proteins is indicated on the top. **(d)** Co-immunoprecipitation of DSP1 and Rm62 performed on fractions of the glycerol gradient shown in (c). (IN) input material, (C) immunoprecipitation with control IgG, (IP) immunoprecipitation with antibodies against DSP1. Pooled fractions used are indicated on the top.

Fig. 2. Rm62 is expressed in embryos, larvae and adult tissues. Western blot probed with anti-Rm62 and anti-HP1 (loading control) antibodies. (1) non-fertilized eggs, (2) 0 to 3h embryos, (3) 3 to 12h embryos, (4) 12 to 24h embryos, (5) T1 leg imaginal discs, (6) wing imaginal

discs, (7) haltere imaginal discs, (8) T3 leg imaginal discs, (9) adult head, (10) ovaries, (11) testis. Rm62 appears as two migrating bands which could correspond to two isoforms of Rm62 (Buszcak and Spradling, 2006).

Fig. 3. DSP1 and Rm62 are only associated in 3 to 12h embryos. Western blot of embryonic extracts separated on a 10-35% glycerol gradient probed with DSP1 or Rm62 antibodies. **(a)** 3 to 12h embryos, **(b)** 12 to 24h embryos. Sedimentation of control proteins is indicated on the top. **(c)** Co-immunoprecipitation of DSP1 and Rm62 with DSP1 antibodies in 3 to 12h embryos (IN): input material, (C) immunoprecipitation performed with control IgG, (IP) immunoprecipitation performed with DSP1 antibodies.

Fig. 4. DSP1 and Rm62 partially colocalize on w^{1118} polytene chromosomes. **(a-c)** Simultaneous detection of DSP1 (red), Rm62 (green) on polytene chromosomes stained with DAPI (blue). Overlaps appear yellow. (D) Magnification of chromosome 2L extremity labeled with anti-DSP1 (red) and anti-Rm62 (green). Sites shared by DSP1 and Rm62 are shown by yellow arrows whereas single DSP1 sites are shown by red arrows and single Rm62 sites are shown by green arrows.

Table 1. Interactions of the $Rm62^{01086}$ allele with *trx-G* and *Pc* mutations. $Rm62^{01086}$*/TM3* males were crossed with *trxG* or *Pc* mutant females. Resulting male progeny was examined for homeotic transformations. Data are presented as the percentage of flies showing homeotic transformations. The numbers in parentheses indicate the number of flies scored.

For Peer Review

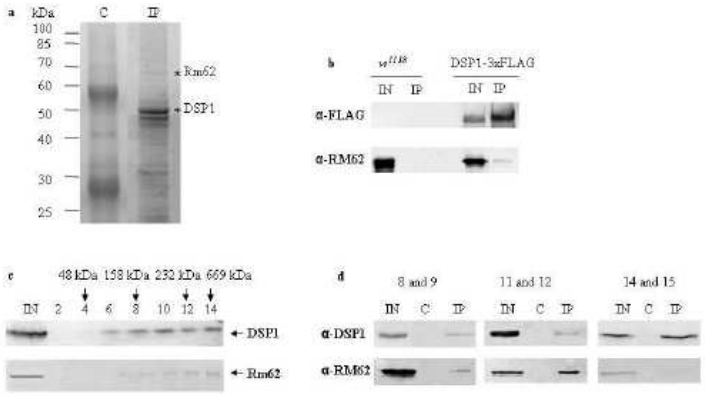


Figure 1:

74x43mm (300 x 300 DPI)

er Review

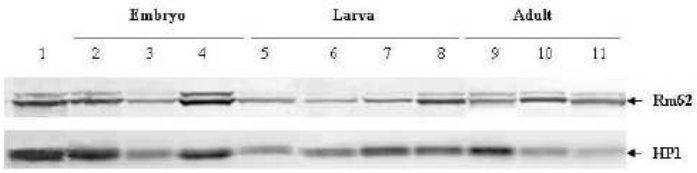


Figure 2.

62x18mm (300 x 300 DPI)

For Peer Review

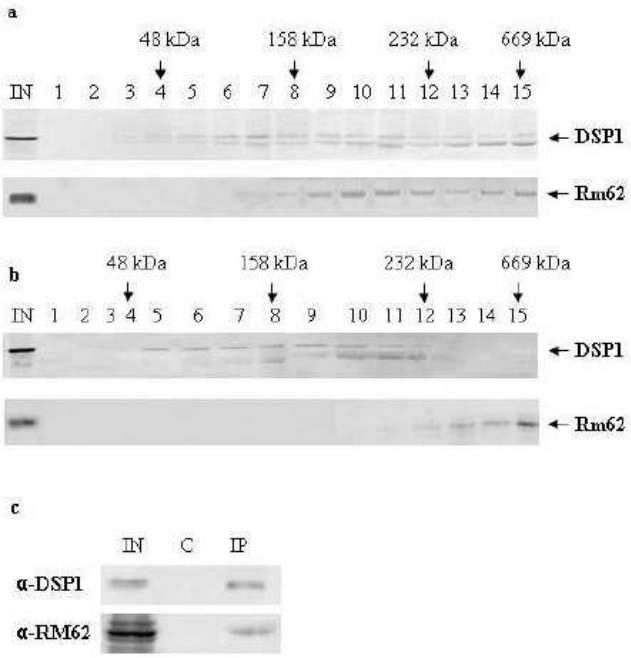


Figure 3 :

49x51mm (300 x 300 DPI)

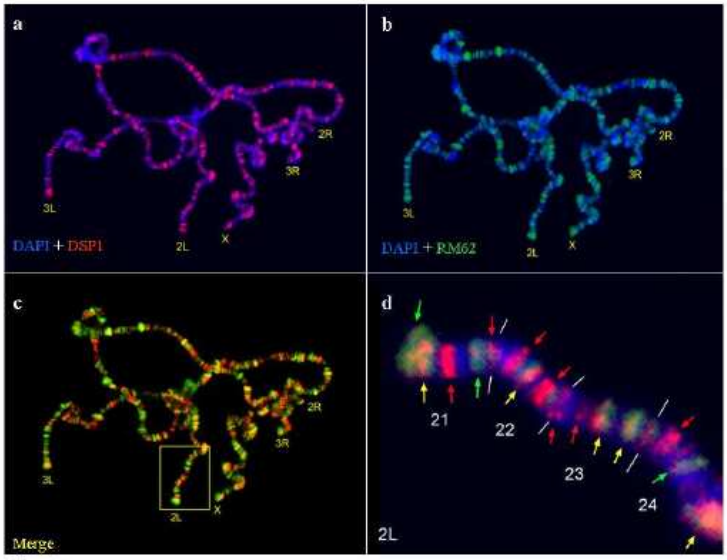


Figure 4 :

73x58mm (300 x 300 DPI)

John Wiley & Sons, Inc.

Genotypes	Homeotic transformations		
	haltere into wing T3 into T2	A6 into A5	T3 or T2 leg into T1
dsp1^{1}/Y; +/+	0.7% (863)	8% (157)	-
+/Y; *Rm62*^{01086}/+	0% (259)	3% (200)	0% (128)
dsp1^{1}/Y ; *Rm62*^{01086}/+	1.3% (554)	38% (246)	-
+/Y ; *brm*^{2}/+	0% (127)	0% (127)	-
+/Y ; *brm*^{2}/*Rm62*^{01086}	0% (196)	4.6% (196)	-
+/Y ; *trx*^{1}/+	0% (153)	0% (153)	-
+/Y ; *trx*^{1}/*Rm62*^{01086}	0% (245)	0.8% (245)	-
+/Y ; *trx*^{E2}/+	0% (132)	0% (132)	-
+/Y ; *trx*^{E2}/*Rm62*^{01086}	6.6% (121)	7.7% (112)	-
+/Y ; *Pc*^{1}/+	-	-	64% (107)
+/Y ; *Pc*^{1}/*Rm62*^{01086}	-	-	95% (78)

Table 1 :

49x44mm (300 x 300 DPI)

John Wiley & Sons, Inc.

(2) Comparaison de l'immunoprécipitation des protéines DSP1 simple et double étiquetée.

Dans les travaux présentés dans « Rm62 a DEAD box RNA helicase and DSP1 are component of a novel protein complex in *Drosophila* embryos.», nous avons caractérisé l'interaction entre DSP1 et Rm62 de deux manières complémentaires. La première a été d'utiliser les anticorps anti DSP1 pour purifier les partenaires de DSP1. Ces partenaires, dont Rm62 faisait partie, ont été ensuite identifiées par spectrométrie de masse. Parallèlement, j'ai confirmé les interactions entre DSP1 et Rm62 par une simple immunopurification de la protéine DSP1 étiquetée 3 FLAG en C-terminale et par une double immunopurification de la protéine DSP1 étiquetée 3FLA3HA en N-terminale. La présence des protéines DSP1 et Rm62 dans l'élution a été repérée par Western Blot (Figure 43).

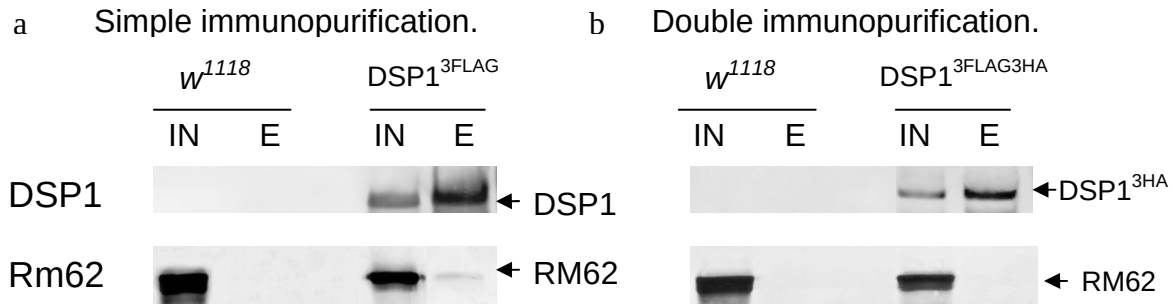


Figure 43 : ***Rm62 interagit avec la protéine DSP1^{3FLAG} mais pas avec la protéine DSP1^{3FLAG3HA}****. Western blot repérant les protéines DSP1 et Rm62 après (**a**) l'immunopurification de la protéine DSP1^{3FLAG} avec des anticorps anti FLAG et (**b**) l'immunopurification de la protéine DSP1^{3FLAG3HA} avec des anticorps anti HA.*

Dans l'expérience de simple immunopurification des complexes contenant la protéine DSP1^{3FLAG}, les protéines DSP1 et Rm62 sont présentes parmi les protéines éluées (43a). Cela confirme l'interaction physique entre la protéine DSP1 et Rm62. Dans l'expérience de double immunopurification des complexes contenant la protéine DSP1^{3FLAG3HA}, la protéine DSP1 est bien présente dans les élutions (43b), mais la protéine Rm62 est absente des protéines éluées. La protéine Rm62 interagit avec la protéine DSP1 étiquetée en C-terminale par trois peptides FLAG, mais pas avec DSP1 étiquetée en N-terminale par trois peptides HA et trois peptides FLAG. Plusieurs interprétations peuvent être données afin d'expliquer ce résultat. La première explication est qu'il y a une étape de purification supplémentaire pour la purification des complexes contenant la protéine DSP1^{3FLAG3HA} par rapport à la purification pour la protéine DSP1^{3FLAG}. L'interaction entre DSP1 et Rm62 serait faible. L'étape supplémentaire

serait rédhibitoire pour purifier Rm62 avec la protéine DSP1. La seconde possibilité est que l'étiquette trois FLAG trois HA placée en N-Terminale perturbe la capacité de la protéine DSP1 à se lier avec la protéine Rm62 bien que la protéine DSP1^{3FLAG3HA} soit présente au sein de complexes protéiques comme la protéine DSP1 endogène. Troisièmement, Rm62 est associée avec DSP1^{3FLA3HA} mais nous sommes en dessous du seuil de détection de la protéine Rm62. Afin de discriminer ces trois hypothèses, il serait possible de faire une seule étape d'immunopurification avec des extraits plus concentrés en protéine DSP1^{3FLAG3HA}. Si la protéine Rm62 est présente dans les élutions, c'est donc bien la seconde étape de purification qui est rédhibitoire pour la détection de l'interaction entre DSP1^{3FLAG3HA} et Rm62. A l'inverse, si la protéine Rm62 n'est pas présente dans les élutions, la double étiquette perturbe la capacité de DSP1 à se lier à Rm62. Ce résultat démontre l'importance de placer l'étiquette en C et N terminale de la protéine lorsque l'on veut tester des interactions protéine-protéine à l'aide d'une protéine possédant une étiquette peptidique.

(3) Fixation de la protéine Rm62 sur les chromosomes polyténiques en contexte mutant dsp1^{1}.

Dans l'article, nous avons montré que les protéines DSP1 et Rm62 étaient présentes sur des sites communs sur les chromosomes polyténiques de glandes salivaires de larve de troisième stade. Puis, nous avons cherché à savoir si la protéine DSP1 était capable de recruter Rm62 sur les chromosomes. Pour ce faire, nous avons effectué l'immunolocalisation de la protéine Rm62 sur les chromosomes polyténiques en contexte *w^{1118}* et mutant *dsp1^{1}* (Figure 44).

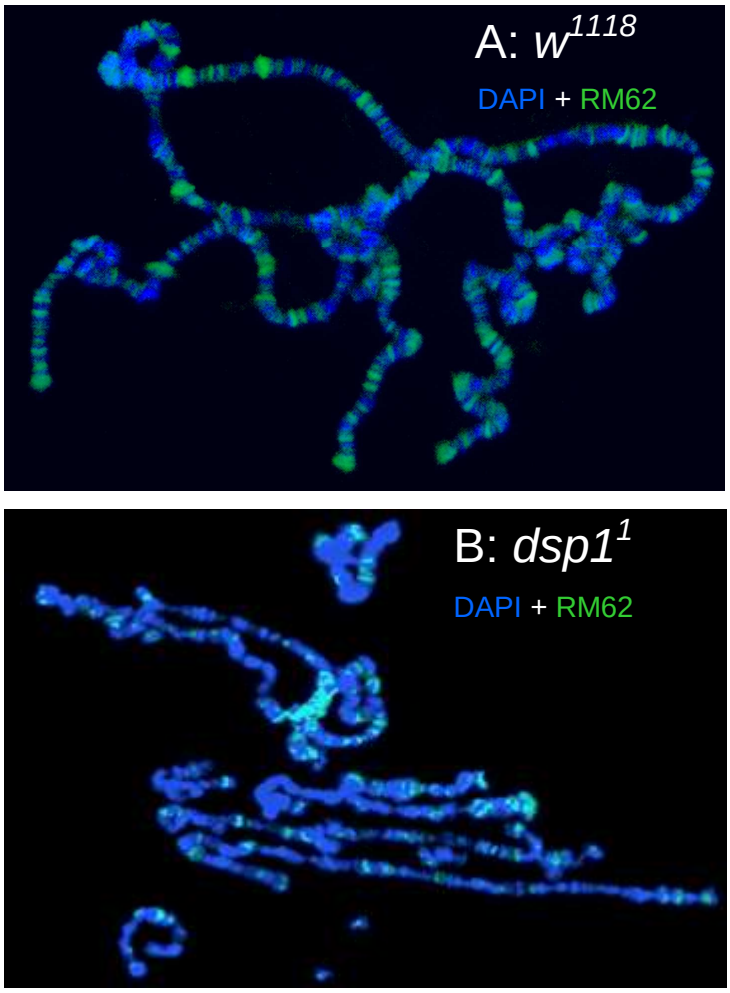


Figure 44 : ***Immunofluorescence de la protéine Rm62 sur les chromosomes polyténiques de glandes salivaires de larves de 3ème stade en contexte w1118 (A) et mutant dsp11 (B).*** *Détection de la protéine Rm62 (vert) et de l'ADN coloré au DAPI (bleu).*

En comparant les deux expériences, on peut voir que la protéine Rm62 se fixe sur les chromosomes polyténiques en contexte *w*^{1118} et mutant *dsp1*^{1}. Globalement, Rm62 se fixe toujours sur les chromosomes polyténiques mais on ne peut pas détecter si l'absence de DSP1 est susceptible de conduire à l'absence de Rm62 sur des cibles particulières notamment les complexes des gènes homéotiques. Au vu de la qualité des chromosomes en contexte mutant *dsp1*^{1}, il ne nous est pas possible de repérer des zones particulières sur les chromosomes polyténiques.

(4) Conclusion

Nous avons choisi de nous focaliser sur l'interaction entre DSP1 et Rm62. Des expériences de co-immunoprécipitation et de séparation des complexes sur gradient de glycérol nous ont permis de déterminer que les protéines DSP1 et Rm62 interagissent dans un complexe d'une taille de 250 kDa au cours de l'embryogénèse. Cette interaction a lieu dans les embryons âgés de 3 à 12 heures mais pas dans les embryons âgés de 12 à 24 heures. Dans la larve, DSP1 et Rm62 ont des sites de fixation communs sur les chromosomes polyténiques des glandes salivaires. Cela suggère que DSP1 et Rm62 participent ensemble à la régulation de certains gènes. Les expériences d'interaction génétique entre les mutants des gènes *dsp1* et *Rm62* ont montré que DSP1 et Rm62 régulent ensemble les gènes homéotiques *Ubx* et *Abd-B*. En croisant le mutant *Rm62* avec des mutants des gènes *Pc*, *trx* et *brm*, nous montrons que l'absence d'une dose de Rm62 aggrave le phénotype des mutants *PcG* et *TrxG*. Ces expériences nous ont permis de déterminer une nouvelle fonction pour la protéine Rm62, celle d'ETP.

II. Contribution à l'étude structurale de la protéine DSP1.

Nous avons produit la protéine DSP1 afin d'étudier sa structure tridimensionnelle Sa structure primaire peut être divisée en deux parties (Figure 45).

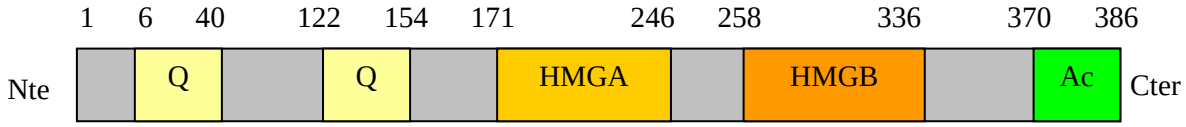


Figure 45: ***Schéma de la structure primaire la protéine DSP1****. Q : Correspond aux régions riches en résidus glutamine. HMG A et B : Boîtes High Mobility Group. Ac : correspond à la région riche en acides aminés acides.*

A l'extrémité N-terminale, la protéine DSP1 possède deux régions d'une trentaine d'acides aminés riches en glutamines. La seconde partie est composée de deux boîtes HMG désignées par A et B et d'une queue acide. Cette seconde moitié présente une forte homologie avec les protéines HMGB 1 et 2 de mammifère (Lehming *et al*., 1994). La structure des boîtes HMG est déjà connue (Thomas et Travers, 2001). La particularité de la protéine DSP1 par rapport aux protéines HMGB est la partie riche en glutamines. Cette partie de la protéine est retrouvée spécifiquement chez les diptères (Sessa et Bianchi, 2007). Nous savons peu de choses sur cette partie de la protéine. L'étude de la structure 3D de la protéine DSP1 nous permettrait peut être de mieux comprendre l'apport de cette partie dans la fonction de la protéine DSP1. Nous avions besoin également de la protéine DSP1 pour étudier *in vitro* les interactions entre DSP1 et ses partenaires potentielles.

A. Clonage de l'ADNc dsp1 dans le vecteur pET31b afin de produire la protéine DSP1 étiquetée six histidines en C-terminale.

Nous avons inséré l'ADNc de *dsp1* dans les sites de restriction *NdeI* et *XhoI* du vecteur pET31b. Nous avons choisi ce vecteur pour plusieurs raisons. Premièrement, ce vecteur possède une séquence de 6 histidines en position C-terminale après le site de restriction *Xho*I. La séquence 6 histidines va faciliter la purification de la protéine DSP1. Deuxièmement, ce vecteur possède le promoteur du phage T7 permettant d'exprimer fortement la protéine d'intérêt qu'il contrôle. Cela implique d'utiliser des bactéries *Escherichia coli* dont le génome possède la séquence de l'ARN polymérase du phage T7 sous

le contrôle de l'opérateur lactose. Par ajout d'IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside), un analogue du lactose, l'expression de l'ARN polymérase T7 est induite. Cette dernière va initier la transcription du gène introduit dans le vecteur pET31b avec un fort niveau d'expression. Ainsi, une grande quantité de protéine recombinante est produite.

B. Expression de la protéine DSP1-6 His.

Nous disposions d'une collection de souches dérivées d'*E. coli (DE3)*. Leurs noms et leurs différentes caractéristiques sont regroupés dans le tableau 11.

Tableau 11 : **Les différentes souches d'*Escherichia coli utilisées* au laboratoire**.

Nom de la souche	Fournisseur	Caractéristique
BL21(DE3)	Novagen	Déficiente pour les protéases Lon et *ompT*
BL21(DE3)pLysS	Novagen	BL21(DE3) ayant intégré le plasmide pACYC184 codant pour le lysozyme T7. Ce dernier réprime l'expression basale des gènes sous le contrôle du promoteur du phage T7.
Rosetta	Novagen	Permet l'expression de protéines au codon rare chez *E.coli.*
Rosetta pLysS	Novagen	Rosetta ayant intégré le plasmide pACYC184.
Origami pLysS	Novagen	BL21(DE3) muté pour les gènes *trxB* et *gor*. Compatible avec la formation du pont disulfure. Intègre le plasmide pACYC184.
C41	OverExpress	Cette souche a au moins une mutation non caractérisée, empêchant la mort cellulaire associée à l'expression de protéines recombinantes toxiques.
C43	OverExpress	Cette souche a au moins deux mutations non caractérisées, empêchant la mort cellulaire associée à l'expression de protéines recombinantes toxiques.

Ces sept souches de bactéries *E.coli* ont été transformées avec le vecteur pET31b *dsp1*. Après avoir induit l'expression de la protéine DSP1-6 His, sa présence dans les différentes souches a été repérée par une électrophorèse SDS-PAGE après coloration au bleu de coomassie (Figure 46):

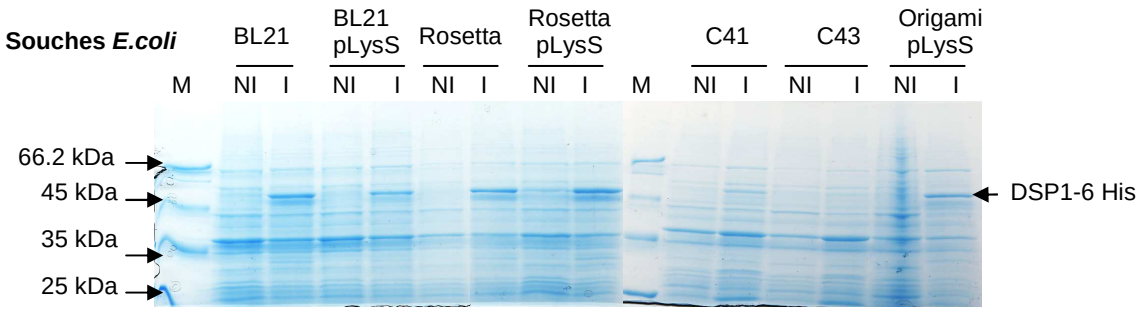


Figure 46 : ***Induction de la protéine DSP1-6 histidines dans différentes souches de bactéries E. coli transformées par le plasmide pET31b dsp1.*** *Les souches E coli sont les souches BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, Rosetta, Rosetta pLysS, C41, C43 et Origami pLysS. M : marqueur de poids moléculaire, NI : l'expression de la protéine DSP1-6 His n'est pas induite, I : l'expression de protéine DSP1-6 His est induite par ajout d'IPTG. La protéine DSP1-6 His est repérée par une flèche.*

La protéine recombinante DSP1-6 His apparaît à un poids moléculaire apparent de 50 kDa compatible avec ce qui est observé en Western Blot avec la protéine DSP1 dans des extraits d'embryons de drosophile. Cinq souches ayant été transformées par le plasmide pET31b *dsp1* expriment la protéine DSP1-6 His : BL21, BL21 pLysS, Rosetta, Rosetta pLysS et Origami pLysS. Les souches C41 et C43 ne semblent pas exprimer DSP1-6 His. Au niveau de l'expression de la protéine DSP1-6 His, ce sont les souches BL21 et Rosetta pLys qui sont le mieux adaptées à la production. En plus du fait d'avoir une croissance plus rapide que les autres souches, elles expriment fortement la protéine DSP1-6 His. Pour la suite des expériences, j'ai choisi abitrairement la souche BL21. Néanmoins, j'ai conservé les clones Origami pLysS pET31b dsp1 car la protéine DSP1 posséde 3 cystéines dans sa séquence. Il est possible que des ponts disulfures se forment.

C. Purification de la protéine DSP1-6 His sur une résine de nickel.

La première étape de purification de la protéine DSP1-6 His a été de passer l'extrait de protéine sur une colonne contenant une résine Ni-NTA^{TM} (Ni+, QIAGEN) suivant le protocole standard. Cette résine se lie avec les groupements imidazoles des histidines de manière non covalente. Grâce à son étiquette 6 histidines, la protéine DSP1-6 His est retenue par la résine. L'ajout d'imidazole permet de décrocher la protéine DSP1-6 His. La protéine DSP1 6 His a été repérée par une électrophorèse SDS-PAGE après coloration au bleu de coomassie (Figure 47).

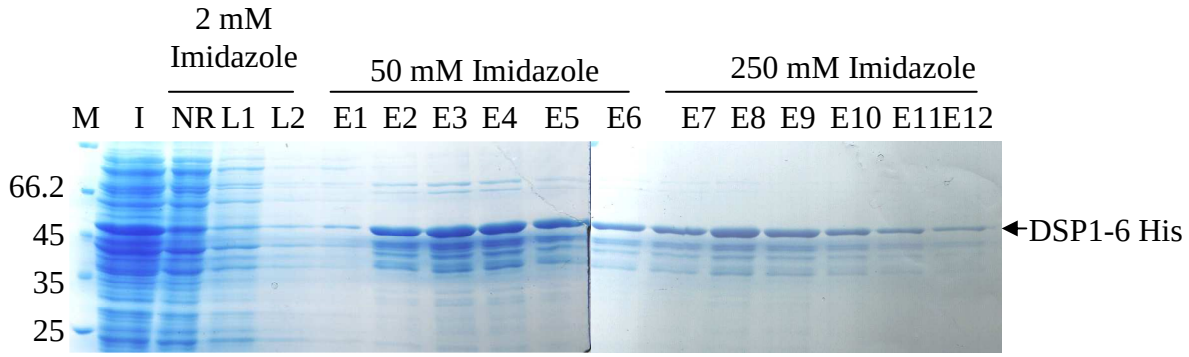


Figure 47 : ***Purification de la protéine DSP1 6 histidines exprimée dans la souche de bactéries E coli BL21 pET31 dsp1 sur résine Ni-NTA™****. M : marqueur de poids moléculaire en kDa, I : Induit, NR : Non retenue, Lx : Lavage tampon 2 mM imidazole, E1 à E6 : Élution tampon 50 mM imidazole, E7 à E12 : Elution tampon 250 mM imidazole. La protéine DSP1-6 His est repérée par une flèche.*

La protéine DSP-6 His est présente dans les protéines non retenues (NR) par la résine. La quantité de résine utilisée a été trop faible. Si tous les sites de liaison de la résine sont saturés, la protéine DSP1-6 His ne s'est pas totalement accrochée à la résine. A la suite de cette expérience, la fraction non retenue a été repassée sur la résine Ni-NTA afin de ne pas perdre de la protéine DSP1-6 His. Une petite quantité de protéine DSP1 est aussi présente dans les solutions de lavage. Cela est dû également à la saturation de la résine en protéines. La protéine DSP1-6 His a bien été purifiée par la résine Ni-NTA (Piste E1 à E12). Avec la protéine DSP1-6 His, il y a d'autres protéines contaminantes. Leur présence oblige à une seconde étape de purification.

D. Purification de la protéine DSP1 6 histidines sur chromatographie échangeuse d'ions.

Afin d'éliminer les contaminants, j'ai passé l'extrait purifié sur une colonne échangeuse de cations HiTrap SP XL. Le point isoélectrique de la protéine DSP1-6 His est de 8.52 (estimé sur Expasy.org). Placée dans un tampon à pH 7, DSP1-6 His est chargée positivement. C'est pourquoi, j'avais choisi de purifier la protéine DSP1-6 His sur une colonne échangeuse de cations. Elle a été éluée par un gradient linéaire de NaCl de 0,05 mM à 0,5M. La protéine DSP1 6 His a été repérée par une électrophorèse SDS-PAGE après coloration au bleu de coomassie (Figure 48). La protéine DSP1-6 His est présente dans les fractions 5 à 12. Mais d'autres protéines sont éluées par la colonne HiTrap SP XL. Elles ont une masse moléculaire inférieure à la protéine DSP1-6 His (entre 45 et 30 kDa sur gel SDS

PAGE). Je n'ai pas réussi à séparer la protéine DSP1-6 His des autres protéines par un passage sur colonne échangeuse de cations. La masse moléculaire des contaminants étant plus petite, j'ai séparé ces protéines selon leur masse moléculaire par tamisage moléculaire.

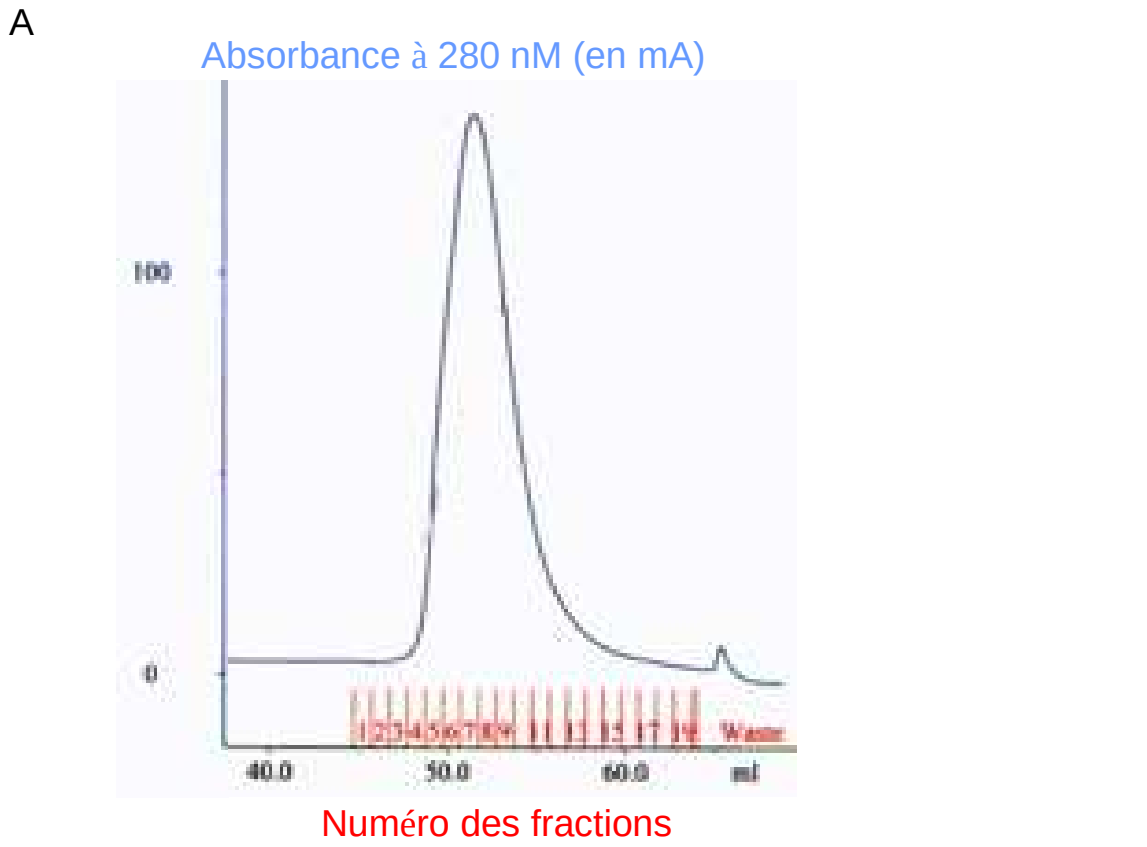


Figure 48 : ***Purification de la protéine DSP1 6 histidines déjà purifiée sur colonne Ni-NTA sur colonne HiTrap SP XL****. (**A**) Profil d'élution des protéines à 280 nm (**B**) Gel SDS Page puis coloration au bleu de coomassie. M: marqueur de masse moléculaire, Ex : DSP1 6 His avant son passage sur la colonne. 4 à 13: Numéro des fractions. La protéine DSP1-6 His est repérée par une flèche.*

E. Dimérisation de la protéine DSP1.

1. Purification de la protéine DSP1 6 histidines par tamisage moléculaire.

Les fractions passées sur colonne échangeuse de cations sont réunies et concentrées dans un millilitre puis chargées sur une colonne Hiload 16/60 Superdex 75. Une fois les élutions récupérées, la protéine DSP1-6 His a été repérée par une électrophorèse SDS-PAGE après coloration au bleu de coomassie (Figure 49).

Deux pics correspondant à des protéines sont récupérés à la sortie de la colonne (49a). Le premier pic sorti de la colonne est élué à un volume entre 35 et 40 mL. Lorsque l'on passe les fractions correspondant à ce volume d'élution sur gel SDS-PAGE après une coloration au bleu de coomassie, il n'y a aucune bande colorée au sein du gel (donnée non montrée). L'origine de ce pic est inconnue. Le second pic est sorti de la colonne entre les volumes d'élution 45 et 65 mL. Passées sur SDS PAGE, ces fractions contiennent la protéine DSP1-6 His dans les volumes d'élution 49 à 62 mL (49b). Cela correspond à une masse moléculaire comprise entre 90 et 40 kDa. Seule la fraction 49 contient la protéine DSP1-6 His seule. Dans les autres fractions, la protéine DSP1-6 His est éluée avec des protéines dont le poids moléculaire est plus faible (entre 45 et 30 kDa sur gel SDS PAGE). Ce profil d'élution a apporté plusieurs informations. Premièrement, la protéine DSP1-6 His seule a été éluée de la colonne à un volume correspondant à des protéines de masse moléculaire de 90 kDa. Sur gel SDS-PAGE et en Western Blot, la protéine DSP1 apparaît à une masse moléculaire d'environ 50 kDa. Ce résultat indique que la protéine DSP1 est un dimère en solution. Ce résultat avait été déjà décrit par Lehming et ses collaborateurs (Lehming *et al*., 1994). Ils ont purifié la protéine DSP1 produite par des bactéries *E. coli* par tamisage moléculaire sur une colonne superdex 200 (le résultat n'a pas été montré). Ils avaient indiqué que le volume d'élution à laquelle la protéine DSP1 était sortie correspondait à des protéines dont la masse est de 100 kDa. Cela suggérait que la protéine DSP1 s'associe en dimère. Nos expériences confirment le fait que la protéine DSP1 se dimérise en solution. Les boîtes HMG ont la possibilité de s'associer en dimère et les zones riches en résidus glutamines sont généralement associées à l'interaction entre protéines. Si DSP1 reste en dimère sous forme cristalline, l'analyse des cristaux au rayon X nous indiquerait quelles sont les régions responsables de l'association en dimère de la protéine DSP1. Deuxièmement, la protéine DSP1-6 His est éluée avec d'autres protéines à des masses moléculaires entre 85 et 45 kDa. DSP1-6 His formerait avec les contaminants un agrégat de protéines.

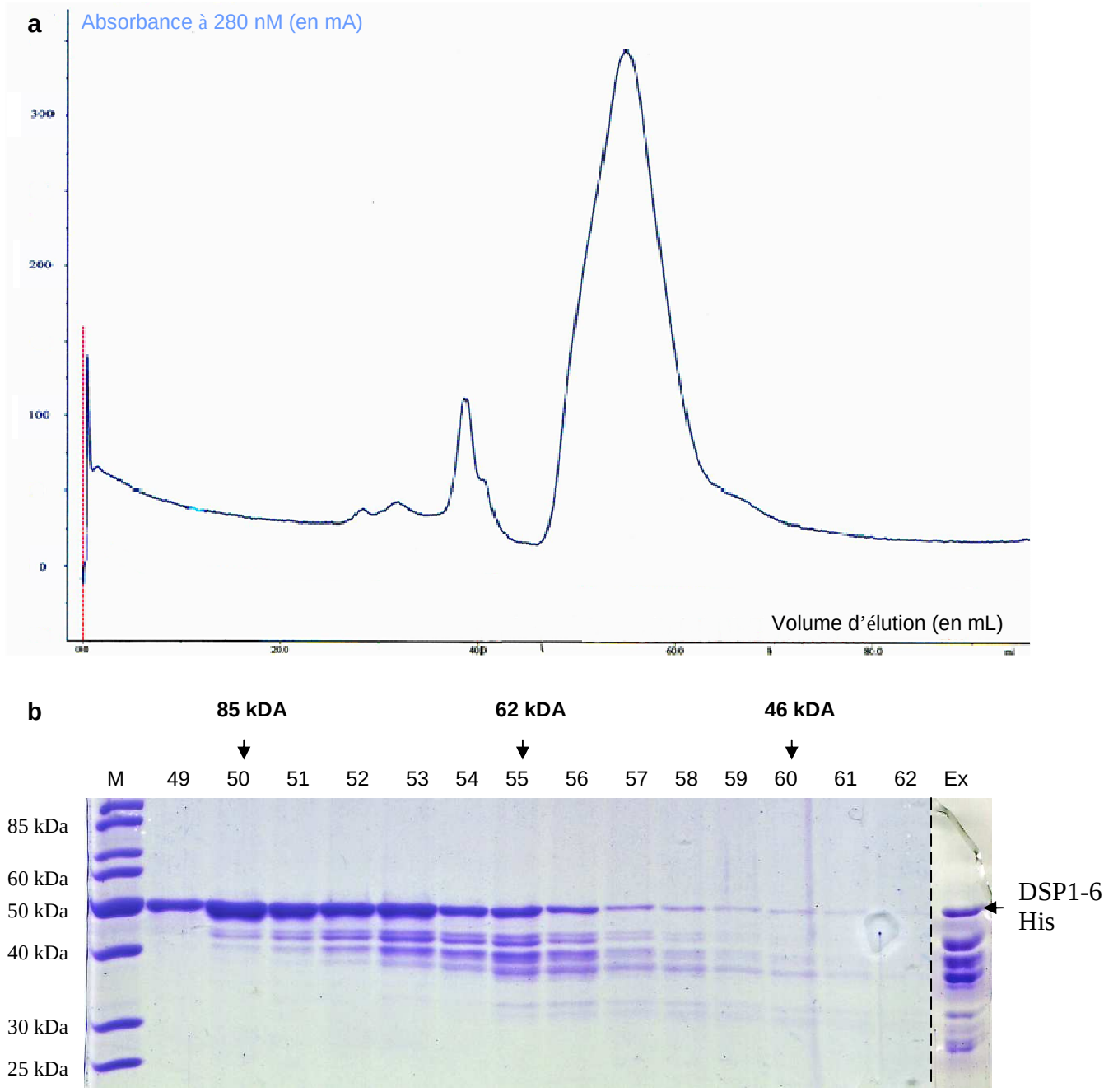


Figure 49 : ***Purification de la protéine DSP1 6 histidines par tamisage moléculaire (Hiload 16/60 Superdex 75)****. (**a**) Profil d'élution des protéines à 280 nm (**b**) Gel SDS Page puis coloration au bleu de coomassie. M: marqueur de masse moléculaire, Ex : DSP1-6 His avant son passage sur la colonne. 49 à 62: numéro des fractions correspondant au volume d'élution. La protéine DSP1-6 His est repérée par une flèche.*

2. Diffusion dynamique de lumière de la protéine DSP1-6 His.

Afin de s'assurer de la dimérisation de la protéine DSP1-6His, nous avons étudié la fraction 49 issue du tamisage moléculaire par diffusion dynamique de lumière ou Dynamic Light Scattering (DLS). Brièvement, la technique de diffusion dynamique de la lumière consiste à envoyer un faisceau laser à travers un échantillon et à analyser les fluctuations de l'intensité de la lumière diffusée en fonction du temps. Cela permet de mesurer le mouvement brownien des molécules présentes dans l'échantillon et, par des équations mathématiques, de déterminer le diamètre de ces molécules. Le DLS est utilisé pour déterminer le profil de distribution de la taille des particules en solution soit l'homogénéité de la solution et, dans le cas des protéines, leur masse moléculaire. Le résultat obtenu est indiqué sur la figure 50.

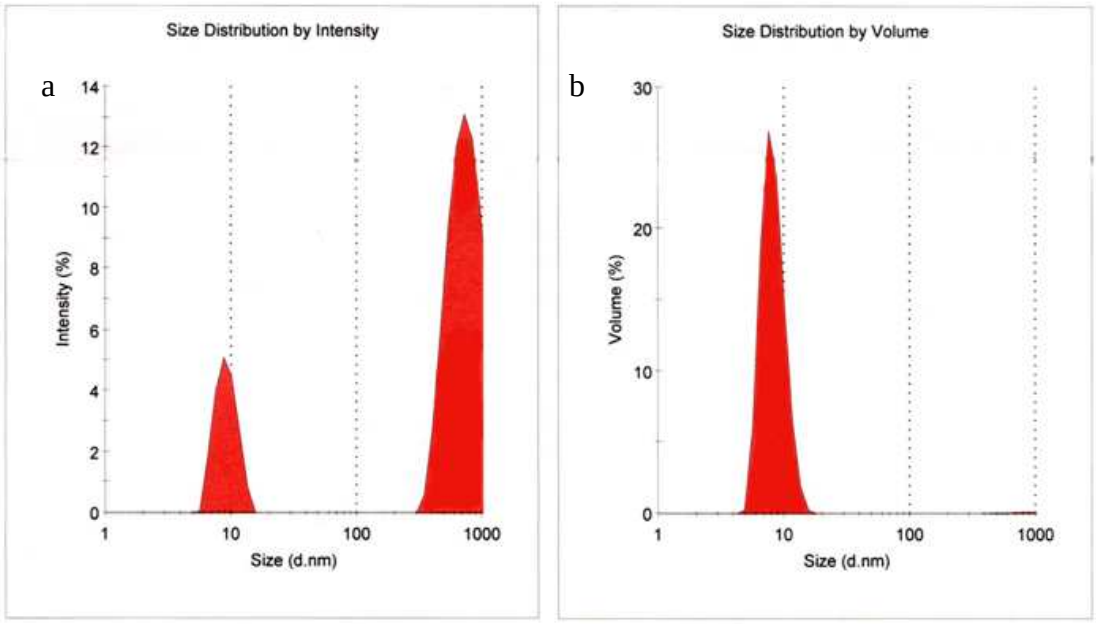


Figure 50 : ***Diffusion dynamique de lumière de la protéine DSP1-6 His.***

Le DLS nous indique qu'il y a deux espèces distinctes dans la solution apparaissant sur le graphique de la distribution de la taille en fonction de l'intensité (50a). Le second pic, de diamètre et d'intensité importants mais représentant peu de volume de la solution (50b), correspond certainement à une poussière présente dans la cuve. Le premier pic correspond à la protéine DSP1-6 His qui apparaît sous forme « mono-disperse », c'est-à-dire homogène, indiquant la présence d'une seule taille de protéine dans la fraction 49. La masse moléculaire estimée de la protéine DSP1-6 His est comprise entre 94 kDa et 120 kDa. Cela confirme que la protéine DSP1 est bien sous forme de dimère en solution.

3. Oligomérisation de la protéine DSP1.

Afin de savoir si la protéine DSP1-6His a la possibilité de s'oligomériser au-delà d'un dimère, une expérience de pontage de la protéine DSP1 recombinante est menée (Figure 51).

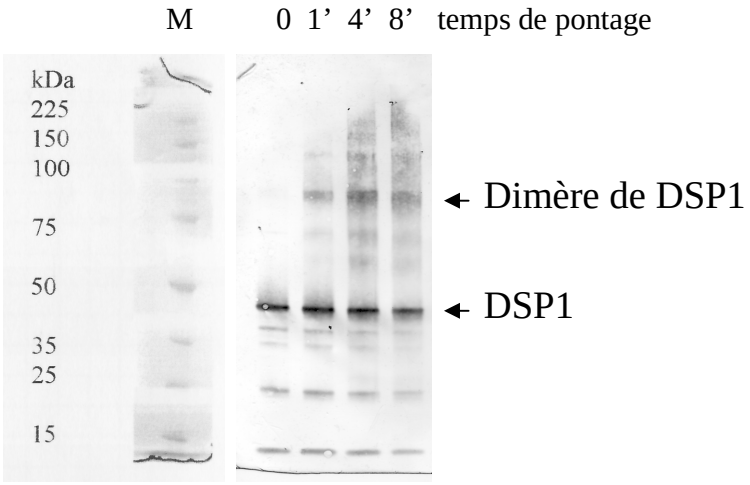


*Figure 51 : **Oligomérisation de la protéine DSP1**. Western Blot avec anticorps anti DSP1 après un pontage de la protéine DSP1 recombinante avec le glutaraldéhyde 0,01%, à la température de la pièce. M : marqueur de masse moléculaire.*

Le glutaraldéhyde permet de stabiliser les oligomères en formant des liaisons covalentes entre les résidus lysines. Cela permet de voir les interactions entre des protéines même en condition dénaturante comme c'est le cas ici. En utilisant le glutaraldéhyde comme agent pontant, on observe que la protéine DSP1-6 His a la capacité de former des oligomères. Sur la figure 51, la protéine DSP1-6 His forme majoritairement des dimères. Mais les bandes apparaissant au dessus de la forme dimérique indiquent que la protéine DSP1 recombinante a la possibilité de former des trimères voire des tétramères. Le résultat obtenu par tamisage moléculaire confirme ces résultats de pontage au glutaraldéhyde : la protéine DSP1 est sous forme de dimère au moins *in vitro*.

F. Etude structurale de la protéine DSP1-6 His en dichroïsme circulaire (CD).

Afin d'estimer la bonne conformation tridimensionnelle de la protéine DSP1-6 His, j'en ai fait l'étude en dichroïsme circulaire. Le spectre obtenu est présenté dans la figure 52.

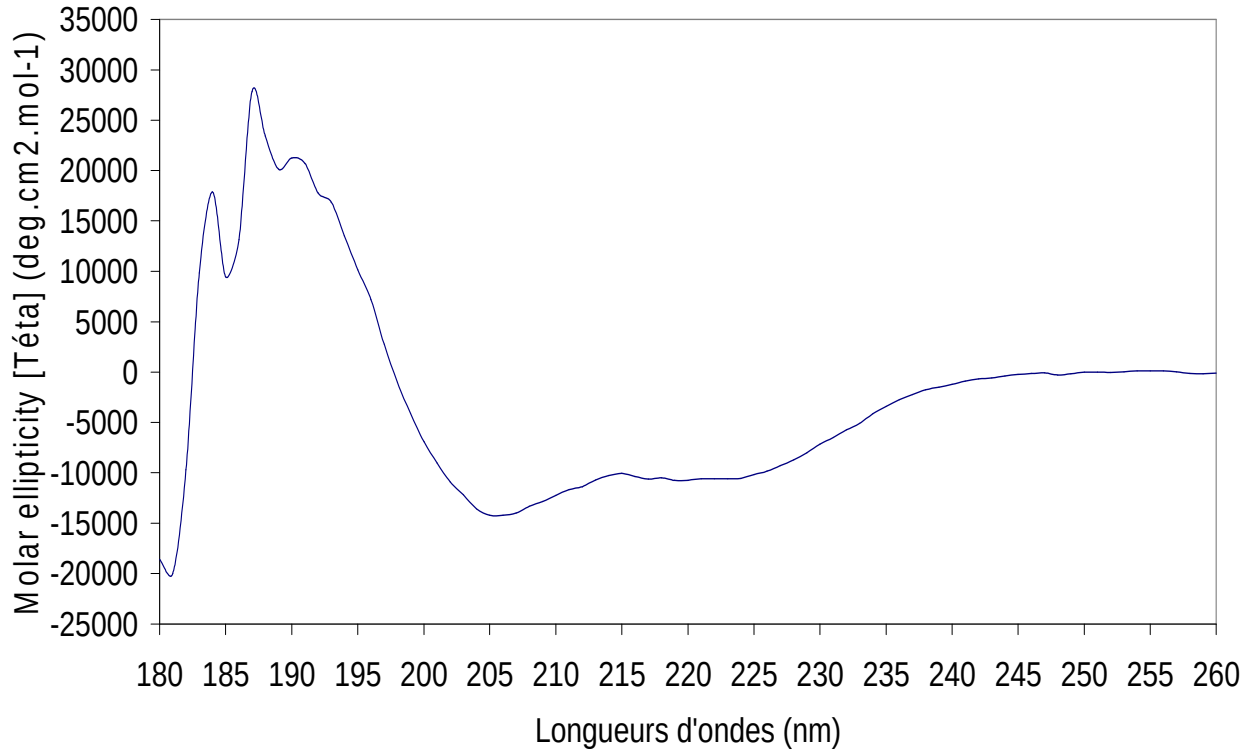


Figure 52 : ***Spectre de dichroïsme circulaire de la protéine DSP1-6 His.*** *Le spectre présenté en molar ellipticity (exprimé en deg·cm^2·dmol^{-1}) est obtenu à une température de 20°C. La concentration de la protéine DSP1 est de 1,07 mM (0,126 mg/mL) dans un tampon 20 mM NaPO4 pH 7,2 10 mM NaCl.*

L'analyse de ce spectre montre que 90 acides aminés seraient impliqués dans une hélice α et 55 dans des feuillets β. Le spectre CD de la protéine DSP1-6 His est similaire à celui obtenu par Janke et ses collaborateurs (89 pour les hélices α et 58 pour les feuillets β, Janke *et al*., 2003). La présence de l'étiquette six histidines ne perturbe pas la capacité de la protéine DSP1 à maintenir une conformation tridimensionnelle correcte.

G. Etude de la stabilité de la protéine DSP1-6 His.

Les protéines d'une taille inférieure à DSP1-6 his étaient co-purifiées avec DSP1-6 His à chaque étape de purification. Ces protéines pouvaient être des fragments de la protéine DSP1-6 His qui auraient été coupés. C'est pourquoi, je voulais savoir si la protéine DSP1-6 his était stable. La fraction 49 contenant seulement la protéine DSP1 a été laissée à température

ambiante toute une nuit en présence d'inhibiteur de protéase. Une fois ce délai dépassé, cette solution est analysée sur gel SDS-PAGE (Figure 53).

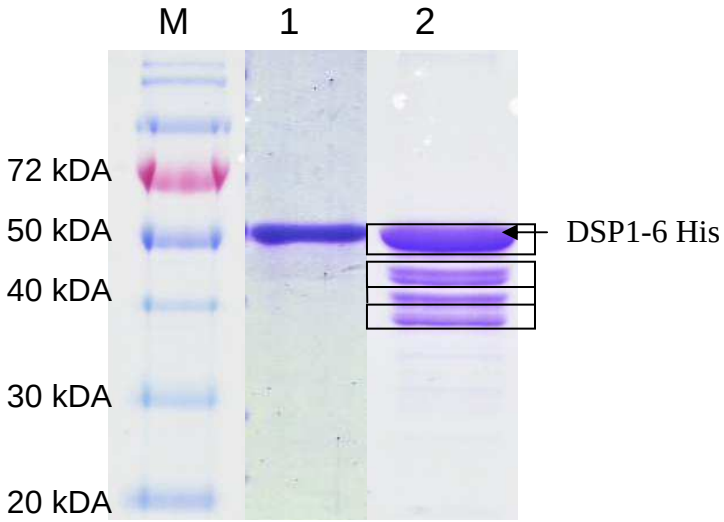


Figure 53 ***: Etude de la stabilité de la protéine DSP1-6 His. Gel SDS Page puis coloration au bleu de coomassie****. (1) Protéine DSP1-6 His issue de la fraction 49 purifiée par tamisage moléculaire. (2) La même fraction après une nuit à température ambiante. La protéine DSP1-6 His est repérée par une flèche.*

La protéine DSP1-6 His avait été purifiée par tamisage moléculaire. Après une nuit à 4°C, des protéines de masse moléculaire inférieure à la protéine DSP1-6 His sont apparues. Afin de vérifier si ces protéines sont issues du clivage de la protéine DSP1, j'ai découpé les bandes colorées du gel comme indiqué sur la figure 53. Ensuite, ces bandes ont été analysées par spectrométrie de masse. La conclusion a été la suivante : pour l'ensemble des 4 échantillons, la protéine DSP1 a pu être identifiée, sans aucune ambiguïté, avec de nombreux peptides.

Les bandes présentes dans le gel en dessous de la protéine DSP1-6 His étaient des morceaux clivés de DSP1. Cette expérience a montré que la protéine DSP1-6 His n'était pas stable en solution. Le projet de l'équipe est de produire la protéine DSP1 afin d'obtenir la structure de la protéine DSP1 entière par rayon X. Mais la faible stabilité de la protéine DSP1-6 His n'est pas compatible avec la cristallisation. Cette étude a permis de déterminer certaines caractéristiques biochimiques de la protéine DSP1 comme son instabilité et sa dimérisation en solution.

Discussion

I. Caractéristiques de la protéine DSP1 : implications fonctionnelles.

A. DSP1 est sous forme dimérique.

Au cours de la purification de la protéine DSP1 produite par des bactéries *E.coli*, j'ai observé que celle-ci était sous forme de dimère par des expériences de tamisage moléculaire et de pontage à la glutaraldéhyde. Bien que les concentrations *in vitro* et *in vivo* ne soient pas les mêmes, la question est de savoir si DSP1 est sous forme de dimère *in vivo*. Lorsque l'on extrait les protéines des embryons, on observe que la protéine DSP1 est sous forme de complexes allant de 100 à 669 kDa et plus. La protéine DSP1 faisant 46 kDa, il y a une possibilité qu'elle soit sous forme de dimère *in vivo*. L'interaction entre deux protéines DSP1 a des implications fonctionnelles fortes. DSP1 fait partie de la famille des protéines HMGB. Cette famille a la particularité d'interagir avec l'ADN de manière non spécifique. De plus, cette interaction va entraîner des courbures dans l'ADN (Murphy *et al*., 1999). DSP1 est capable de remodeler la chromatine en interagissant physiquement avec elle. L'homodimérisation de la protéine DSP1 aiderait celle-ci à maintenir une structure particulière de la chromatine. Cette idée avait déjà été évoquée dans la thèse d'Aurélien Rappailles (Rappailles, 2005). Il faisait l'hypothèse que DSP1 faciliterait et stabiliserait l'interaction entre des régions régulatrices par la formation de boucles d'ADN. La formation de dimère de DSP1 permettrait de maintenir la structure mise en place lors de la formation d'une boucle entre un PRE/TRE et un promoteur (Figure 54). La dimérisation de DSP1 aiderait à maintenir des conformations spécifiques de la chromatine.

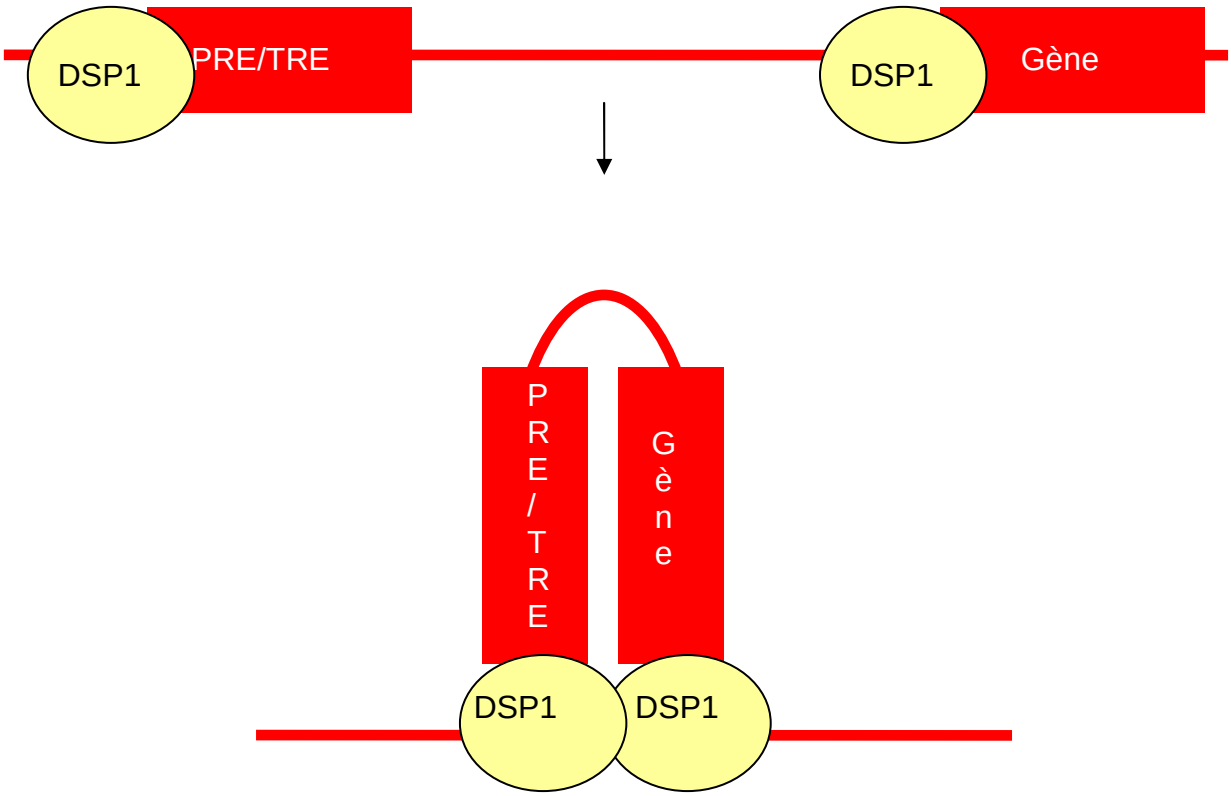


Figure 54: ***Modèle de rapprochement d'un PRE/TRE et d'un gène par DSP1****. Lors de la formation d'une boucle rapprochant le PRE/TRE et un promoteur, l'interaction entre les deux protéines DSP1 permettrait de stabiliser cette conformation de la chromatine. Cela permettrait aux protéines PcG ou TrxG fixées au PRE/TRE de réguler le gène cible*. Extrait de Rappailles, (2005).

B. Stabilité de la protéine DSP1.

Lors de la purification de la protéine DSP1-6 His, nous avons observé que celle-ci se clivait à des sites bien déterminés au cours de la purification. Ce résultat mène à nous poser plusieurs questions. La coupure de la protéine DSP1 recombinante reflète-t'elle une réalité *in vivo* ? Deux réponses peuvent être faites à cette question :

- Non, les produits de dégradation sont des artefacts dus aux expériences de production de protéines par des bactéries. La protéine DSP1-6 His recombinante n'est pas stable parce qu'elle a une mauvaise structure tertiaire. L'homologue de la protéine DSP1 chez l'homme est la protéine HMGB1 qui possède un pont disulfure entre ses cystéines 22 et 44 et qui joue un rôle dans la stabilité de la structure tertiaire de cette protéine (Sahu *et al*., 2008). Or la protéine DSP1 possède 3 cystéines en position 186, 206 et 274 qui sont conservées de la drosophile à l'homme (indiquées en rouge sur la figure 55). Il se pourrait que la protéine DSP1 ait un pont disulfure entre les deux cystéines 186 et 206 aidant à stabiliser sa structure.

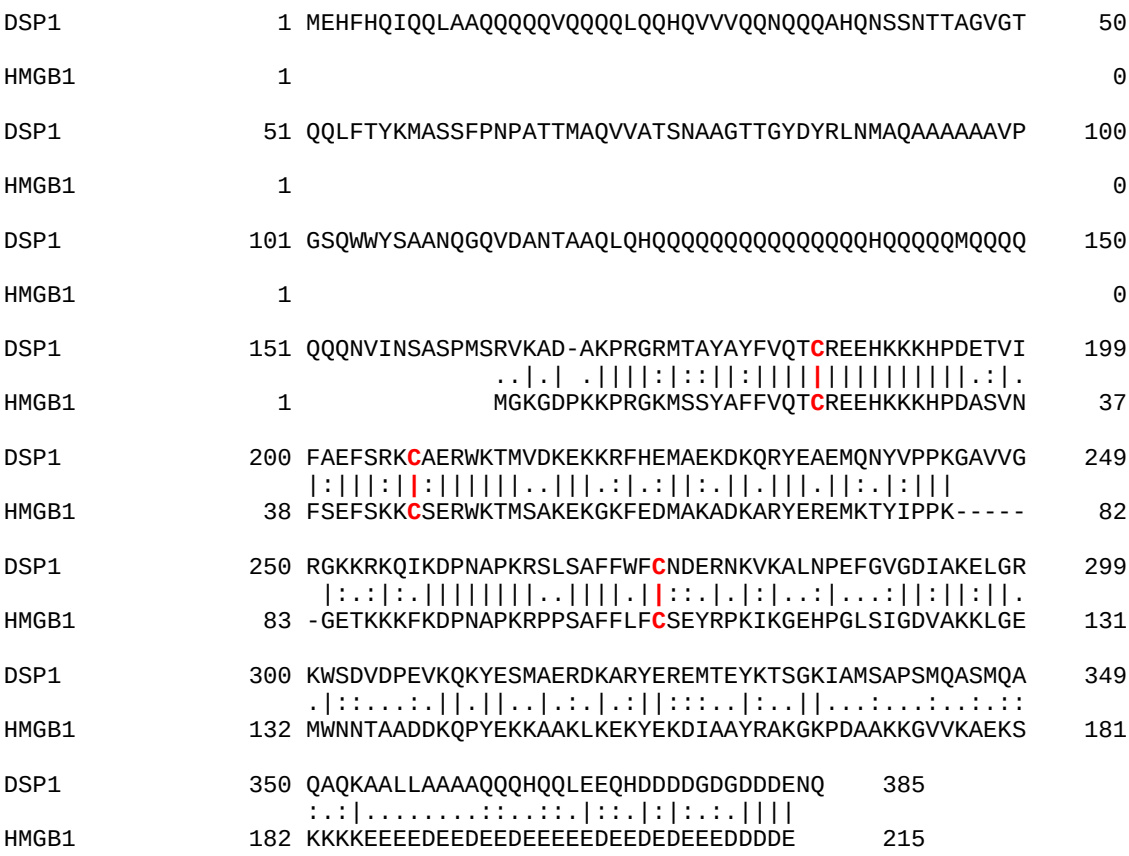


Figure 55 : ***Alignement des séquences des protéines DSP1 de drosophile et HMGB1 humaine****. Les cystéines sont indiquées en rouge dans la séquence des deux protéines. Réalisé avec le logiciel EMBOSS Pairwise Alignment Algorithms.*

Dans notre système, nous avons produit la protéine DSP1 dans une souche de bactérie E.Coli BL21DE3 non compatible avec la formation de ponts disulfures. La protéine DSP1-6 His n'ayant donc pas de pont disulfure, il se pourrait qu'il soit indispensable à la stabilité de la protéine. Produire la protéine DSP1-6 His dans la souche Origami, qui est une souche compatible avec la formation de pont disulfure, permettrait de vérifier si, premièrement, le pont disulfure est présent dans la structure tertiaire. Pour ce faire, on peut tester la présence des ponts disulfure en condition réductrice ou non sur la protéine DSP1-6 His par spectrométrie de masse. Deuxièmement, une fois la présence de ponts disulfures confirmée, on teste si la protéine est stabilisée en sa présence. Mais il se peut que ce soit la partie N-terminale qui soit responsable de l'instabilité de la protéine DSP1. La protéine DSP1 sans la partie riche en acides aminées acides (sans les 162 acides aminés N-Terminale : $DSP1^{-162}$) est stable lors de sa manipulation. De plus, les protéines DSP1 clivées sont retenues sur la colonne de nickel, ce qui reflète le fait qu'elles ont conservé l'étiquette 6 histidines située en C-Terminale. Ces deux paramètres nous indiquent que c'est la partie N-terminale qui se clive et qui n'est pas stable. Un séquençage N-terminale d'Edman des produits de dégradation de la

protéine DSP1 semble nécessaire. Cela permettrait de savoir quels sont les acides aminés impliqués dans les coupures. L'un des objectifs de l'obtention de la structure 3D de la protéine DSP1 était de mieux connaître les fonctions de la partie N-terminale. Mais la protéine DSP1 entière n'étant pas stable, il est difficile d'obtenir sa structure 3D. Pour remédier à ces défauts, on pourrait obtenir la structure 3D de $DSP1^{-162}$ contenant seulement les boîtes HMG et la queue acide. On peut étudier *in vivo*, la contribution de la partie N-terminale à la fonction de DSP1 en construisant des transgènes contenant la séquence codant la protéine DSP1 entière ou la protéine $DSP1^{-162}$ qui serait intégrée dans le génome de drosophile $dsp1^{1}$. Nous aurions deux types de drosophiles exprimant spécifiquement chaque forme de la protéine DSP1 et permettant de discriminer le rôle la partie N-terminale notamment dans les interactions protéine-protéine (immunopurification) ou/et protéine-chromatine (ChIP).

- Oui, les produits de dégradation de la protéine DSP1 recombinante sont une réalité *in vivo*. Ces produits seraient dus à l'activité protéolytique endogène de la protéine DSP1. On sait que lors de la purification de la protéine DSP1 embryonnaire et de western blot, les anticorps anti DSP1 reconnaissent deux formes de la protéine DSP1 : l'une à 49 kDa et l'autre à 47 kDa ce qui laisse la possibilité qu'*in vivo*, DSP1 existe sous deux formes. Deux hypothèses peuvent expliquer ce phénomène. La première est qu'*in vivo* la protéine DSP1 serait clivée ce qui donnerait au moins deux formes de la protéine DSP1. Le fait d'observer, *in vitro*, des formes clivées de la protéine DSP1 recombinante serait en accord avec cette hypothèse. Les formes clivées de la protéine DSP1 pourraient avoir des activités différentes de manière similaire à la protéine Trx qui est clivée en deux formes Trx-C et Trx-N ayant des activités transcriptionnelles opposées. L'autre possibilité pour expliquer ce phénomène est l'existence d'épissage alternatif dans le gène *dsp1* (Canaple *et al*., 1997). L'épissage alternatif produit deux types d'ARNm *dsp1* qui vont être traduits en deux protéines de taille différente qui sont reconnues de manière similaire par les anticorps anti DSP1. Mais les deux ARNm *dsp1* donnent des protéines DSP1 avec une différence de 8 acides aminées ce qui semble faible pour détecter cette différence en western blot. Afin de valider cette hypothèse, il serait nécessaire de cloner les ADNc des deux ARNm du gène *dsp1* pour les associer à un vecteur d'expression puis de les insérer dans le génome de drosophile mutante pour le gène *dsp1*. Nous aurions deux types de drosophiles exprimant spécifiquement chaque isoforme de la protéine DSP1 et permettant de discriminer les tailles, puis les rôles des isoformes.

II. Les partenaires de la protéine DSP1.

L'équipe dans laquelle j'effectue ma thèse s'attache à mettre en évidence les rôles biologiques de la protéine DSP1. Les études précédentes ont permis de révéler l'implication de la protéine DSP1 dans la régulation des gènes du développement. DSP1 participe au maintien de l'expression des gènes homéotiques avec les protéines PcG et TrxG. Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés aux partenaires protéiques de la protéine DSP1. Grâce à des techniques d'immunoaffinité, j'ai pu identifier un certain nombre de protéines partenaires notamment la protéine Rm62. J'ai précisé le rôle de celle-ci dans la régulation des gènes homéotiques. L'ensemble de ces résultats nous permet de définir un modèle d'action concernant la protéine DSP1.

A. Les complexes contenant la protéine DSP1 évoluent au cours du développement embryonnaire.

Dans l'article, nous montrons que DSP1 est présent au sein de complexes d'une taille allant de 100 à 669 kDa et plus dans les embryons âgés de 3 à 12 heures tandis que leur taille se réduit entre 100 et moins de 669 kDa dans les embryons âgés de 12 à 24 heures. Nous savons que l'expression de la protéine DSP1 se régionalise dans les embryons plus âgés alors qu'elle est exprimée de manière ubiquitaire dans l'embryogénèse précoce. L'interaction entre DSP1 et Rm62 ne se produit que dans les embryons entre 3 à 12 heures. L'ensemble de ces résultats suggère que DSP1 jouerait un rôle dans la mise en place de systèmes de régulation de l'expression des gènes au cours de l'embryogénèse précoce. Pour cela, elle interagit avec des complexes de haut poids moléculaire. Une fois son action effectuée, comme par exemple le recrutement des PcG et TrxG sur les cibles, DSP1 ne serait plus nécessaire à l'activité de ces protéines. Au cours de l'embryogénèse tardive, le rôle de la protéine DSP1 serait plus spécifiquement lié à certains processus cellulaires. Il serait intéressant de voir si les gènes cibles de la protéine DSP1 évoluent au cours du temps comme les complexes contenant la protéine DSP1. Par exemple, il serait possible de faire des expériences de ChIP on chip avec la protéine DSP1 sur des embryons 3 – 12 heures et 12 – 24 heures.

B. Les partenaires de la protéine DSP1 dans l'embryon.

1. DSP1 et les protéines PcG et TrxG.

Il a été montré que la protéine DSP1 régule les gènes homéotiques avec les protéines PcG et TrxG. En effet, le gène *dsp1* interagit génétiquement avec les gènes *Pc*, *trx*, *ash1* et *osa* (Decoville *et al*., 2001). De plus, DSP1 a été identifiée comme étant un recruteur des complexes PcG (Déjardin *et al*., 2005). Peu de protéines classées comme PcG et TrxG interagissent avec DSP1. Seules les protéines HSC70-4, Modulo, Nurf 38, Pontin et Actin jouent un rôle dans le maintien des gènes avec les protéines PcG et TrxG.

- Génétiquement, *Hsc70-4,* qui code une protéine chaperonne, interagit avec les gènes *PcG* mais pas avec le gène *brm* (Mollaaghababa *et al*., 2001). La protéine HSC-70 4 a été purifiée avec les complexes PRC1 et PRC2 (Saurin *et al*., 2001; Nekrasov *et al*., 2007). Elle est associée de manière stable avec la protéine Ph dans les cellules de drosophile Kc1. Le rôle de HSC-70 4 serait de stabiliser les interactions au sein du complexe PRC1 (Wang et Brock, 2003).

- Modulo a été purifiée avec le complexe PRC1 et la protéine dCBP dans des extraits de protéines embryonnaires (Saurin *et al*., 2001; Bantignies *et al*., 2002). Exprimée spécifiquement dans certaines cellules, le rôle de Modulo n'est pas connu. Elle a été montrée comme suppresseur de variégation et, à ce titre, jouerait un rôle dans la structure de la chromatine (Garzino *et al*., 1992).

- Les protéines Pontin et Actin sont des membres du complexe dINO80, homologue du complexe de remodelage de la chromatine INO80 de levure. dINO80 a été purifié avec la protéine PHO au cours de l'embryogénèse (Klymenko *et al*., 2006). Pontin est la sous-unité ATPase, avec la protéine Reptin, du complexe dINO80. La protéine Actin se lie aux protéines Arp5 et Arp8. Ces dernières participent à l'interaction entre le nucléosome et le complexe INO80. L'activité du complexe dINO80 n'est pas caractérisée chez la drosophile. Dans la levure, INO80 se lie au variant d'histone H2A. Ce complexe joue un rôle dans la régulation de la transcription ou la réparation des dommages dans l'ADN (Morrison et Shen, 2009). Le gène *pontin* (*pont*) est indispensable à la bonne expression des gènes homéotiques. Il peut être classé comme un *trxG* car une mutation nulle du gène *pont* augmente le phénotype dû à une mutation dans le gène *brm* et diminue celui dû à des mutations dans le gènes *Pc* et *Psc*. La protéine Pontin interagit physiquement avec le complexe BRM (Diop *et al*., 2008).

- La protéine NURF 38 est un membre du complexe NURF (NUcleosome Remodeling Factor) impliqué dans des fonctions liées au maintien de la transcription avec les

protéines TrxG (Badenhorst *et al*., 2002). Une autre protéine appartenant au complexe NURF, la protéine NURF-55 (aussi identifiée sous les noms de p55 et Chromatin assembly factor 1 subunit (CAF1) a été purifiée avec le complexe PRC2 (Tie *et al*., 2001).

L'étude de l'interaction entre DSP1 et des protéines HSC70-4, Modulo, Nurf 38, Pontin permettra de préciser les rôles moléculaires de DSP1 dans la régulation des gènes homéotiques. Nous pouvons spéculer sur un rôle possible de la protéine DSP1 dans le recrutement des protéines PcG et TrxG.

L'activité de recruteur de DSP1 ne doit pas se faire par un contact direct entre DSP1 et les protéines PcG et Trx. Le rôle possible de la protéine DSP1 serait de créer un environnement chromatinien favorable à la fixation des protéines PcG et TrxG sur leurs cibles (Figure 56). La fixation dans le petit sillon de l'ADN de la protéine DSP1 va permettre de déstabiliser les nucléosomes autour du PRE. Cette activité est renforcée par les complexes de remodelage de la chromatine NURF et INO80. Une fois l'ADN accessible, les facteurs de liaison à l'ADN séquences spécifiques peuvent se fixer aux PRE/TRE permettant le recrutement des complexes PcG et TrxG. Après un certain nombre de divisions, le recrutement des complexes PcG et TrxG sur leurs cibles n'est plus assuré par la protéine DSP1 et les complexes de remodelage de la chromatine. D'autres systèmes tels que les marques épigénétiques ou les ARNnc prennent le relais.

En absence de la protéine DSP1, la fonction des complexes de remodelage de la chromatine serait plus difficile mais elle serait toujours possible. Cela pourrait expliquer pourquoi l'absence de la protéine DSP1 n'est pas indispensable à la survie des drosophiles. Ce modèle ne prend pas en compte une nouvelle protéine identifiée comme une partenaire de DSP1, la protéine Rm62.

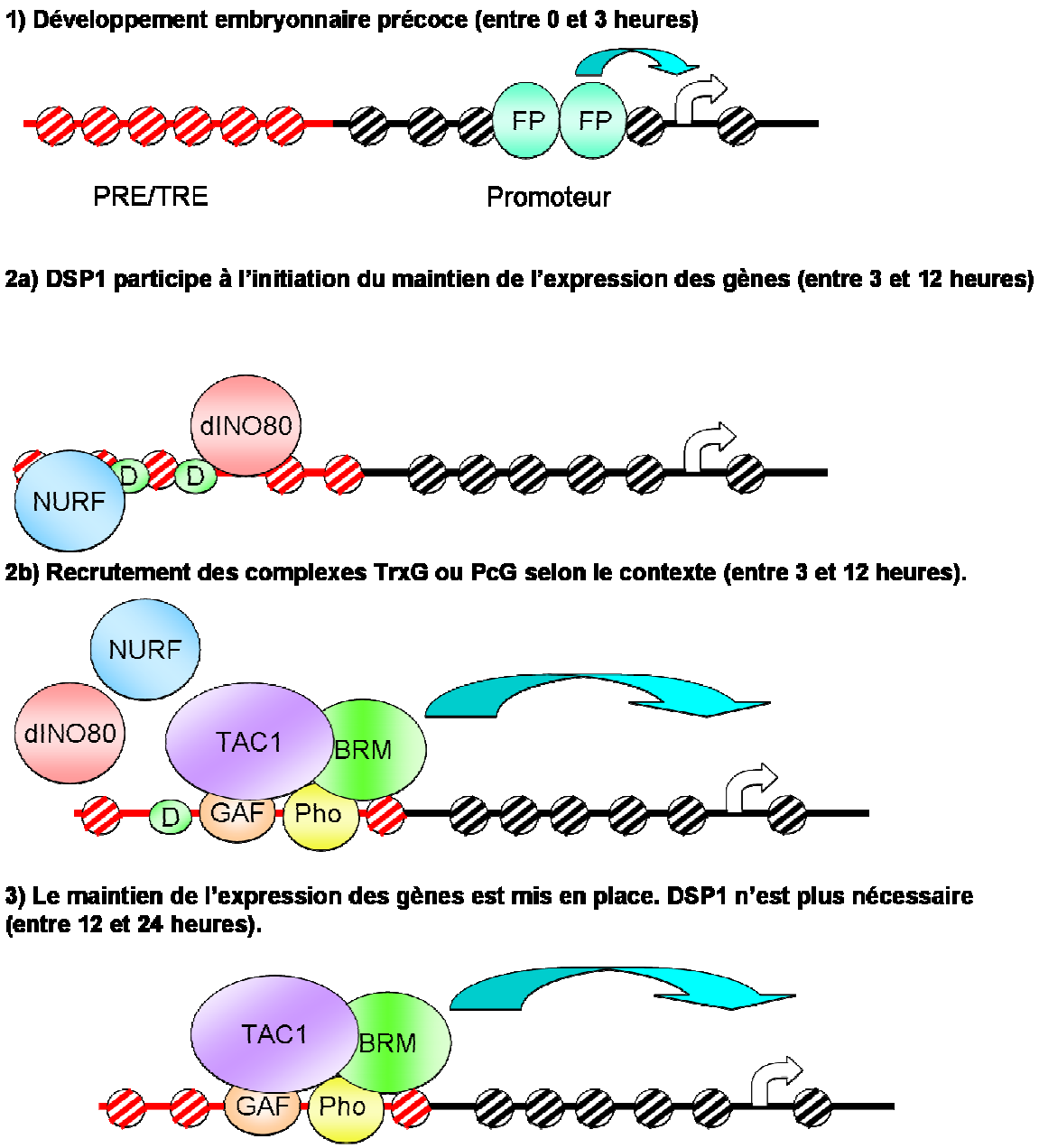


Figure 56: ***Modèle d'action de la protéine DSP1 dans le maintien de l'expression des gènes avec les protéines TrxG****. 1) Lors du développement précoce, les facteurs précoces (FP) mettent en place les profils d'expression génique en se fixant sur les promoteurs. 2a) Lorsque les FP disparaissent, la protéine DSP1 avec l'aide des complexes de remodelage de la chromatine dINO80 et NURF déstabilisent les nucléosomes autour des séquences PRE/TRE. 2b) L'ADN est maintenant accessible aux facteurs de liaison à l'ADN spécifiques tels que Pho et GAF. Ces derniers vont recruter les complexes PcG ou TrxG selon le contexte (sur le schéma, les complexes TrxG TAC1 et BRM sont recrutés). 3) Le maintien de l'expression des gènes étant mis en place, il n'y a plus besoin de la protéine DSP1 sur les PRE/TRE. Le recrutement des complexes se ferait de manière différente (marques épigénétiques, ARNnc).*

2. Les ETP DSP1 et Rm62 interagissent au sein d'un complexe dans l'embryon.

a) Interaction entre DSP1 et Rm62.

La protéine Rm62 fait partie des 23 protéines identifiées par l'immunoprécipitation des partenaires de la protéine DSP1. Au cours de ma thèse, j'ai choisi de me focaliser sur l'interaction entre DSP1 et Rm62. Des expériences de co-immunoprécipitation et de séparation des complexes sur gradient de glycérol m'ont permis de déterminer que les protéines DSP1 et Rm62 interagissent dans un complexe d'une taille de 250 kDa au cours de l'embryogénèse. Cette interaction se produit dans les embryons âgés de 3 à 12 heures mais pas dans les embryons âgés de 12 à 24 heures. De plus, le fait que DSP1 pourrait être à l'état de dimère dans les complexes donne des informations supplémentaires. En effet, le complexe contenant les protéines DSP1 et Rm62 présente un poids moléculaire de 250 kDa. La taille de Rm62 étant de 68 kDa et celle de DSP1 de 46 kDa, d'autres protéines seraient associées dans ce complexe. Il faudrait purifier spécifiquement ce complexe dans les embryons 3-12 heures afin d'identifier la ou les protéines supplémentaires de ce complexe.

Dans la larve, DSP1 et Rm62 ont des sites de fixation communs sur les chromosomes polyténiques des glandes salivaires. Cela suggère que DSP1 et Rm62 participent ensemble à la régulation des gènes. Les expériences d'interaction génétique entre les mutants des gènes *dsp1* et *Rm62* ont montré que DSP1 et Rm62 régulent ensemble les gènes homéotiques *Ubx* et *Abd-B*. Dans le cas de l'interaction avec la protéine DSP1, le rôle de Rm62 pourrait être d'interrompre les interactions entre DSP1 et des ARN qui empêcheraient la protéine DSP1 de jouer son rôle. *In vitro*, les protéines HMG sont capables d'interagir avec des ARN via leurs boîtes HMG (Bell *et al*., 2008). Chez la drosophile, DSP1 pourrait interagir avec les ARN. Des expériences d'immunoprécipitation avec ou sans traitement aux RNases permettraient de savoir si l'interaction entre DSP1 et Rm62 est dépendante de l'ARN. De même, il serait intéressant de regarder si les colocalisations observées entre DSP1 et Rm62 sur les chromosomes polyténiques sont dépendantes de l'ARN en traitant ces chromosomes polyténiques à la RNase. Parmi les partenaires identifiées, il y a une autre protéine classée comme une hélicase à boîtes DEAD : c'est la protéine Pitchoune (Pit). Peu de chose sont connues sur le rôle de ce gène dans la drosophile. Les mutants homozygotes pour le gène *pit* montrent un arrêt de croissance au 3ème stade larvaire. La localisation de la protéine Pit dans le nucléole suggère un rôle dans la biogénèse des ribosomes et des ARNr (Zaffran *et al*., 1998).

Afin de continuer le travail sur l'association entre DSP1 et les ARN hélicases, il faudrait confirmer l'interaction entre Pit et DSP1.

b) Rm62 participe à la régulation des gènes avec les protéines Pc et trx.

En croisant le mutant *Rm62* avec des mutants des gènes *Pc*, *trx* et *brm*, nous montrons que l'absence d'une dose de Rm62 aggrave le phénotype des mutants *Pc* et *trx*. Ces expériences nous ont permis de classer *Rm62* parmi les *ETP*. Il faudrait préciser le rôle moléculaire de la protéine Rm62 dans la régulation des gènes avec les protéines PcG et TrxG. Nous avons vu que Rm62 partage des sites de fixation sur les chromosomes polyténiques avec la protéine DSP1. Afin de préciser le rôle de Rm62, nous pourrions regarder si Rm62 et les protéines Pc et Trx ont des sites de fixation en commun sur les chromosomes polyténiques.

L'une des questions principales de la participation de Rm62 à la régulation des gènes homéotiques porte sur le mécanisme d'action de la protéine Rm62. Rm62 est une ARN hélicase à boîte DEAD (peptide signature) (Dorer *et al.*, 1990). Les ARN hélicases ont pour rôle moléculaire de rompre les interactions entre les duplex ARN-ARN et ARN-protéine (Cordin *et al*., 2006). Rm62 a été identifiée comme suppresseur de variégation suggérant un rôle dans la structure de la chromatine (Dorer *et al*., 1990). Plus récemment, il a été montré que Rm62 joue un rôle dans la désactivation de la transcription. Après un choc thermique, les ARNm des gènes *hsp70* s'accumulent dans le noyau. Rm62 va nettoyer la zone génique des ARNm et permettre de rétablir la répression des gènes *hsp70* (Buszczak et Spradling, 2006). Dans les cellules S2, Rm62 est impliquée dans l'ARN interférence. La réduction du niveau d'expression de Rm62 par RNAi diminue le niveau d'inhibition par les protéines impliquées dans le processus RNAi (Ishizuka *et al*., 2002). Rm62 régule la formation des insulateurs chromatiniens via une interaction physique avec CP190 qui est dépendante de l'ARN (Lei et Corces, 2006). Les rôles de Rm62 identifiés chez la drosophile sont liés à l'ARN.

Le rôle de la protéine Rm62 serait d'interrompre les interactions entre les ARN et les gènes cibles des protéines PcG et TrxG. Des études ont montré l'importance des ARN non codants dans la régulation des gènes homéotiques (Brock *et al*., 2009). Par exemple, l'expression ectopique de l'ARN non codant *mir-iab-8* peut réprimer le gène *Ubx* induisant des transformations haltères en ailes (Bender, 2008; Tyler *et al*., 2008). Le rôle de la protéine Rm62 pourrait être de nettoyer une cible génomique des PcG et TrxG des ARNm et ARNnc comme dans le cas d'un choc thermique sur le locus *hsp70*. Ou bien Rm62 permettrait d'interrompre les interactions entre les ARNs et les protéines PcG et TrxG. Un certain nombre

de protéines PcG et TrxG sont capables de fixer les ARN. Rm62 pourrait prévenir la fixation des ARN à ces protéines.

Mais le rôle de Rm62 pourrait être indépendant de sa fonction hélicase. p68, l'homologue mammifère de Rm62, joue plusieurs rôles indépendamment de l'ARN. Ainsi, p68 régule le gène *ERalpha* (*estrogen-receptor alpha*) en mettant en contact les protéines MyoD et SRA. Le complexe p68-MyoD-SRA va activer la transcription du gène *ERalpha* (Caretti *et al*., 2007). P68 est un co-activateur du suppresseur de tumeur p53 (Bates *et al*., 2005). Ces deux activités sont indépendantes de l'activité hélicase de la protéine p68. Comme p68, la protéine Rm62 activerait ou réprimerait les gènes homéotiques par des interactions protéine-protéine sans l'intervention de son activité hélicase. Ainsi, p68 interagit physiquement avec les protéines CBP et HDAC1 (Rossow et Janknecht, 2003; Wilson *et al*., 2004). Chez la drosophile, CBP est un membre du complexe TAC1 dont l'activité est de déposer des groupements acétyles sur les histones (Petruk *et al*., 2001). HDAC1 est l'homologue mammifère de la protéine RPD3. Membre du complexe PRC2, RPD3 a une activité de déacétylation des histones (Struffi et Arnosti, 2005). Rm62 pourrait interagir avec les protéines CBP ou RPD3 afin d'acétyler ou de déacétyler les histones selon le contexte chromatinien. Des mutants pour les gènes *CBP* et *RPD3* existent chez la drosophile. Il serait intéressant de voir s'il y a une interaction génétique avec le mutant *Rm62*.

3. Conclusion

A l'heure actuelle, les partenaires possibles de la protéine DSP1 sont identifiées tout comme ses cibles dans le génome. Dans l'embryon, DSP1 interagit avec plus de 23 partenaires pour réguler 1986 cibles dans le génome ce qui donne un aperçu de la complexité des fonctions de cette protéine. Nous disposons de l'ensemble des pièces du puzzle que constitue la régulation de l'expression des gènes par la protéine DSP1. Il faut maintenant assembler ces pièces afin de déterminer le tableau complet c'est-à-dire avec qui (avec quelles partenaires protéiques et sur quelles cibles), où (quels types cellulaires) et quand (à quel moment du cycle de développement) DSP1 agit.

Matériels et méthodes

Lignées de drosophiles.

Les différentes lignées de drosophiles ont été élevées à 22°C sur un milieu standard. Les mutations utilisées sont décrites dans la base de données FlyBase (http://flybase.org/). L'isolation du mutant *dsp1*^{1} a été décrite précédemment (Decoville *et al*., 2001; Mosrin-Huaman *et al*., 1998). Les souches Oregon-R-P2, *w*^{1118}, P{PZ}*Rm62*^{01086} *ry*^{506}*/TM3, ry*^{RK} *Sb*^{1} *Ser*^{1}, y^{1} w^{67c23}; P{lacW}Nurf-38^{k16102}/CyO, ru^{1} h^{1} th^{1} st^{1} Ki^{1} p^{p} P{PZ}Hsc70-4^{03550}/TM3, Sb^{1}, ru^{1} h^{1} th^{1} st^{1} cu^{1} Hsc70-4$^{54.1}$/TM6B, Tb+, P{PZ}RpLP0^{01544} ry^{506}/TM3, ry^{RK} Sb^{1} Ser^{1}, ry^{506} P{PZ}mod^{07570}/TM3, ry^{RK} Sb^{1} Ser^{1}, brm^{2} e^{s} ca^{1}/TM6B, Sb^{1} Tb^{1} ca^{1}, st^{1} trx^{1}/TM1, ru^{1} h^{1} th^{1} st^{1} trx^{E2} ca^{1}/TM6B, Tb^{1} ca^{1}, Pc^{1}/TM1, *y*^{1} *w*^{1118}*; P{GAL4-nos.NGT}, w*, P{GAL4-da.G32}UH1, w- ; Tm6 Ser/Drop, w- ; CyO/BlL* ont été obtenues par le Bloomington Fly Stock Center. La souche sauvage Oregon-R a été utilisée comme souche de référence.

Cages à drosophiles.

Afin de récolter des quantités importantes d'embryons, des cages à drosophiles ont été mises en place contenant environ 30000 drosophiles. Celles-ci sont nourries sur un milieu gélosé à base de jus de pomme (500 mL H2O, 15 g d'agar, 166.5 mL de jus de pomme, 16.65 g de saccharose et 1 g de Nipagine antifongique) où de la levure de boulangerie est étalée. Ce dispositif permet de récolter un gramme d'embryons par jour et par cage.

Extraction des protéines embryonnaires de drosophiles.

Les extractions de protéines d'embryons de drosophiles se font à 4°C.

1. **Extraction totale des protéines embryonnaires**.

A l'aide d'un bain d'hypochlorite de sodium NaClO 4% de deux minutes, on enlève le chorion d'un gramme d'embryons. Les embryons sont rincés à l'eau distillée, puis broyés dans 1 mL de tampon d'extraction (50 mM Hepes pH 7.6, 385 mM NaCl, 0.1 mM EGTA, 1.1 mM MgCl2, 0.1% Tween 20®, 1 mM PMSF et 1 Protease inhibitor cocktail tablet Complete Mini® des laboratoires Roche pour 100 mL de solution) dans un homogénéisateur de Dounce. L'extrait est centrifugé à 4°C à 50000g pendant 1h15 avec le rotor SW55Ti. Le surnageant est ajusté en glycérol 10% puis aliquoté et conservé à –80°C. La quantité de protéines est dosée par la méthode de Bradford (Sigma-Alderich). Approximativement 15 à 20 mg de protéines sont extraites par gramme d'embryons.

2. Extraction des protéines nucléaires d'embryons de drosophiles.

Les extraits de protéines nucléaires d'embryons de drosophiles sont préparés suivant le protocole décrit dans Klymenko *et al*., (2006). Au moins dix grammes d'embryons sont déchorionnés à l'aide d'un bain d'hypochlorite de sodium NaClO 4% pendant deux minutes. Les embryons sont rincés à l'eau distillée, puis broyés dans du tampon NU1 (15 mM Hepes pH 7.6, 10 mM KCl, 5 mM MgCl2, 0.1 mM EDTA pH 8, 0.5 mM EGTA pH 8, 350 mM Sucrose, 2 mM DTT, 0.2 mM PMSF) à raison de 1 ml par gramme d'embryons dans un homogénéisateur de Dounce. Le lysat obtenu est filtré à l'aide d'un entonnoir avec du papier Miracloth. Le papier est rincé avec trois volumes de tampon NU1. Le lysat est centrifugé à 13000 g pendant 15 minutes. Après avoir enlevé la couche lipidique et jeté le surnageant, le culot (où se trouvent les noyaux) est repris dans 0.5 mL de tampon LS (15 mM Hepes pH 7.6, 20 % Glycerol, 1.5 mM MgCl2, 20 mM KCl, 0.2 mM EDTA pH 8, 1 mM DTT, Complete inhibitor cocktail de chez ROCHE) par gramme d'embryons. Après ajout d'un volume 0.5 mL de tampon HS (15 mM Hepes pH 7.6, 20 % Glycerol, 1.5 mM MgCl2, 800 mM KCl, 0.2 mM EDTA pH 8, 1 mM DTT) par gramme d'embryons, la solution contenant les noyaux est agitée doucement sur une roue pendant 30 minutes. L'extrait est centrifugé à 4°C à 40000 rpm pendant 1h00 avec le rotor SW55Ti. Le surnageant est ensuite dialysé contre du tampon NE200 (15 mM Hepes pH 7.6, 20 % Glycerol, 1.5 mM MgCl2, 200 mM KCl, 0.2 mM EDTA pH 8, 1 mM DTT). Pour se débarrasser de la chromatine insoluble, l'extrait protéique nucléaire dialysé est centrifugé à 12500 rpm pendant 19 minutes avec le rotor SW55ti. Enfin, le surnageant est conservé à -80°C. Approximativement 10 mg de protéines nucléaires sont extraites par gramme d'embryons. La quantité de protéines est dosée par la méthode de Bradford (Sigma-Alderich).

Western blot.

Un protocole standard est utilisé. Nous utilisons les anticorps suivants:

- Des IgG anti-DSP1 polyclonaux purifiés produits chez le lapin sont fournis par AgroBio, utilisés après une dilution au 1/50000.
- Des IgG anti-RM62 polyclonaux produits chez le cochon d'inde sont fournis gracieusement par A C.Spradling, Carnegie Institution of Washington, Baltimore, USA, utilisés après une dilution 1/3000.
- Des IgG anti-Modulo LA9 monoclonaux produits chez la souris sont fournis gracieusement par J Pradel, Institut de Biologie du Développement de Marseille Luminy, utilisés après une dilution 1/233.

- Des IgG anti-Pontin polyclonaux produits chez le lapin sont fournis gracieusement par J Pradel, Institut de Biologie du Développement de Marseille Luminy, utilisés après une dilution 1/7500.
- Des IgG anti-Nurf 38 monoclonaux produits chez la souris utilisés après une dilution de 1/3000.
- Des IgG anti-HSC-70 4 monoclonaux produits chez la souris sont fournis par Stressgen utilisés après une dilution 1/200.
- Des IgG anti-peptide FLAG® (M2) monoclonaux produits chez la souris sont fournis par Sigma-Aldrich utilisés après une dilution 1/5000.
- Des IgG anti-peptide HA (HA-7) monoclonaux produits chez la souris sont fournis par Sigma-Aldrich utilisés après une dilution 1/10000.
- Des IgG anti-IgG de souris ou anti-IgG de lapins couplés à la phosphatase alcaline fournis par Promega, utilisés après une dilution au 1/7500.
- Des IgG anti-IgG de cochon d'inde couplés à la phosphatase alcaline fournis par Sigma-Aldrich, utilisés après une dilution au 1/7500.

Pontage des protéines sur la chromatine.

Deux cents milligrammes d'embryons sont récoltés. Ceux-ci sont déchorionnés à l'aide d'eau de javel diluée de moitié avec 0,4% NaCl et 0,03% Triton X-100 pendant 3 minutes. Après lavage dans une solution à 0,4% NaCl et 0,03% Triton X-100, les embryons sont transférés dans un tube et lavés dans une solution de PBS Triton X-100 0.01%. Puis la chromatine est pontée par 2 mL de solution de pontage (1.8% formaldéhyde, 50 mM Hepes , 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 100 mM NaCl, pH 8) en présence de 3 mL de n-Heptane pendant 15 minutes en agitant vigoureusement. En centrifugeant 10 minutes à 4000g, les embryons tombent au fond du tube. Le surnageant est éliminé. Le plus rapidement possible, la réaction de pontage est arrêtée avec 10 mL de PBS, Triton X-100 0.01%, glycine 0.125 M. Les embryons sont lavés avec 3 mL de solution A (10 mM Hepes, 10 mM EDTA, 1.5 mM EGTA, 0.25% Triton X-100, pH 8) pendant 10 minutes sous agitation puis avec 3 mL de solution B (10 mM Hepes, 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.1% Triton X-100, pH8) pendant 10 minutes. Les embryons sont repris dans 1.1 mL de tampon de sonication (10 mM Hepes, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, pH8). Après 4 à 6 cycles de sonication de 30 secondes à puissance maximale (Bioblock Vibra Cell 72405) et l'ajout de 0.5% de N-laurylsarcosine, le tube est centrifugé 5 minutes à 4°C à vitesse maximale (Sigma 1K15). Le

surnageant est gardé. Le volume du surnageant est ajusté à 1.6 mL avec du tampon de sonication 0.5% N-laurylsarcosine. La chromatine pontée va être séparée des autres constituants par ultracentrifugation sur gradient de chlorure de césium. Le chlorure de césium (1.14g) est ajouté à la solution. Celle-ci est ajustée à une densité moyenne de 1.42 g/cm^3 avec du tampon de sonication 0.5% N-laurylsarcosine (indice de réfraction 1.372). L'extrait est centrifugé à 20°C pendant 20 heures à 75000 rpm (rotor TLN 100). Le gradient est récupéré par fraction de 200 µL. L'indice de réfraction de toutes les fractions est mesuré. Celles ayant l'indice de réfraction 1.37 (1.40 g/cm^3) contiennent la chromatine pontée (Orlando *et al*., 1997). Enfin, ces fractions sont dialysées une nuit à 4°C (4% glycérol, 10 mM Tris HCl pH 8, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA). La présence de protéines spécifiques dans les fractions est testée en Western Blot.

Séparation des complexes sur gradient de glycérol par ultracentrifugation.

1.Préparation des gradients

Le gradient de glycérol 10-35 % doit être préétabli avant l'ultracentrifugation Les variations de densité sont obtenues en faisant varier la concentration du glycérol dans un tampon (5 mM Tris-Cl pH 8 et 1 mM EDTA). Les gradients sont établis de la façon suivante: on dépose au fond de chaque tube 2,3 ml de la solution de glycérol la plus concentrée, puis à la surface de cette solution on dépose délicatement 2,3 ml de la solution la moins concentrée en glycérol, puis les tubes sont placés à l'horizontale pendant 2 h 30 à 4°C. Le gradient s'établit par diffusion entre les deux couches de densités différentes de glycérol.

2.Séparation des protéines par sédimentation sur gradient de glycérol

Pour le calibrage, les marqueurs utilisés sont la Thyroglobuline (669 kDa), la Catalase (232 kDa), l'Aldolase (158 kDa) et l'Ovalbumine (48 kDa). On dépose toujours un milligramme de protéines sur la surface du gradient sans la perturber. Les tubes sont centrifugés à 35000 rpm en utilisant le rotor SW55 (Beckmam) pendant 18 heures. Après l'ultracentrifugation, des fractions de 300 µl sont collectées. Afin de vérifier la formation du gradient et sa stabilité lors de l'ultracentrifugation, l'indice de réfraction de chaque fraction est mesuré à l'aide d'un réfractomètre. Pour le calibrage, la densité optique à 280 nm des différentes fractions est mesurée au spectrophotomètre en prenant pour référence la solution de glycérol la plus concentrée. Lorsque les protéines embryonnaires sont séparées sur le gradient, la présence des protéines d'intérêt est évaluée par Western Blot.

Immunopurification des complexes contenant la protéine DSP1 endogène au cours de l'embryogènese.

La fixation des anticorps sur la résine AminoLink® Plus Coupling Gel (Pierce) se fait suivant le protocole fourni par Pierce. Deux types d'anticorps sont fixés à cette résine. Les premiers sont les anticorps anti DSP1 purifiés permettant de purifier les complexes contenant la protéine DSP1. Les seconds sont des anticorps IgG (fournis par Agrobio). Ces derniers servent pour l'expérience témoin. Environ dix millilitres d'extrait de protéines nucléaires (correspondent à 100 mg de protéines) sont incubés avec 200 µL de résines AminoLink® Plus Coupling Gel (Pierce) couplées avec des anticorps anti-DSP1 ou anti-IgG pendant quatre heures à 4°C. Les billes sont lavées quatre fois avec 10 mL de tampon de lavage (10mM Tris-HCL pH 8.0, 150 mM NaCL, 0,1% NP40, 2 mM MgCl2, 0,1 mM EDTA, 0,5 mM DTT). Les protéines immunoprécipitées sont éluées avec du tampon ImmunoPure® IgG Elution Buffer pH 2.8 (Pierce). Les protéines éluées sont précipitées par ajout d'acétone froid. Les protéines précipitées sont reprises dans un tampon de charge (4 % SDS, 100 mM DTT, 10 % Glycérol, 50 mM Tris HCl pH 6,8, Bleu de Bromophénol). Puis elles sont séparées par électrophorèse SDS PAGE sur un gel de polyacrylamide gradient 4/12% (Invitrogen). Les protéines présentes dans le gel sont colorées au bleu de coomassie Simply Blue Safe stain (Invitrogen). Enfin, les bandes présentes dans le gel sont découpées puis analysées par spectrométrie de masse.

Immunopurification des complexes contenant la protéine DSP1 étiquetée au cours de l'embryogènese.

1. Obtention de drosophiles transgéniques exprimant les protéines DSP1 étiquetées.

L'ADN complémentaire du gène dsp1 a été introduit dans deux plasmides de transgénèse issus de la Drosophila Gateway vector Collection (Department of Embryology. Carnegie Institution of Washington). Dans les deux plasmides, l'expression de la protéine DSP1 est sous le contrôle d'un promoteur inductible fort, grâce à des séquences UAS (Upstream Activation Sequence) issues de la levure. L'expression de la protéine est commandée par la présence de la protéine GAL4. Celle-ci va se fixer sur les séquences UAS et activer l'expression de la protéine DSP1 étiquetée. Le premier plasmide, nommé pPWF *dsp1*, exprime une protéine DSP1 étiquetée par trois peptides FLAG (DYKDDDDK) en position C terminale. Le second plasmide, appelé pPHWF *dsp1*, exprime la protéine DSP1 étiquetée par trois peptides FLAG et trois peptides HA (YPYDVPDYA) en position N-terminale. La transgénèse a été faite par le service de transgénèse du laboratoire européen de

biologie moléculaire (EMBL) situé à Heidelberg en Allemagne. Il nous a renvoyé des larves provenant de l'injection avec nos transgènes. La sélection et la localisation des transgènes dans le génome ont été réalisées au laboratoire.

2. Expression des protéines DSP1 simple et double étiquetées.

Afin d'exprimer les protéines DSP1 simple et double étiquetées, il fallait croiser les drosophiles portant les transgènes pPWF *dsp1* ou pPHWF *dsp1* avec une lignée de drosophiles exprimant la protéine GAL 4. Nous avions choisi une souche (*w*, P{GAL4-da.G32}UH1*) où l'expression de la protéine GAL4 est contrôlée par le promoteur du gène *daughterless* (*da*) ce qui permet l'expression de la protéine GAL4 pendant toute la durée de l'embryogénèse. En croisant cette souche avec les drosophiles transgéniques pPWF *dsp1* et pPHWF *dsp1*, leurs descendances expriment la protéine DSP1 étiquetée dans l'embryon. Afin d'éliminer la procédure de croisement, deux lignées possédant le driver daGAL4 et respectivement les transgènes pPWF *dsp1* et pPHWF *dsp1* à l'état homozygote ont été construites.

3. Mise au point.

A 500 µL d'extrait de protéines nucléaires contenant $DSP1^{3FLAG3HA}$, 10 µL de gel d'agarose couplé avec les anticorps sont ajoutés pendant quatre heures à 4°C. Puis la résine est lavée quatre fois avec 1 mL de tampon de lavage (10mM Tris-HCL pH 8.0, 150 mM NaCL, 0,1% NP40, 2 mM MgCl2, 0,1 mM EDTA, 0,5 mM DTT). Après lavage, l'entérokinase est ajoutée toute la nuit à 4 °C. Puis j'ai ajouté 10 µL de gel d'agarose couplé avec les anticorps anti HA à la solution de protéines éluées précédemment pendant quatre heures à 4°C. Après quatre lavages avec 1 mL de tampon de lavage, le peptide FLAG est ajouté aux billes à une concentration de 500µg par mL pendant toute la nuit à 4°C

4. Immunopurification des complexes contenant la protéine DSP1 étiquetée
    - Avec la lignée DSP1 étiquetée trois FLAG.

La purification des complexes contenant la protéine DSP1 simple étiquetée a été réalisée à l'aide d'anticorps dirigés contre les étiquettes trois FLAG. Environ dix millilitres d'extrait de protéines nucléaires (correspondent à 100 mg de protéine) d'embryons exprimant la protéine DSP1 3 FLAG et dix millilitres d'extrait de protéines nucléaires d'embryons w^{1118} (expérience contrôle) ont été incubés avec 200 µL d'ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel (Sigma) pendant 2 h à 4°C. Le surnageant a été éliminé. Les billes ont été lavées quatre fois avec 10

mL de tampon de lavage. Les protéines immunoprécipitées ont été éluées par coupure des peptides FLAG par l'entérokinase pendant 2 heures à 37°C. Après la coupure, les billes ont été lavées deux fois avec 3 mL de tampon de lavage afin de récupérer le maximum de protéines éluées. Enfin, les protéines présentes dans les élutions ont été analysées par Western Blot.

- Avec la lignée DSP1 étiquetée trois FLAG et trois HA.

La purification des complexes contenant la protéine DSP1 double étiquetée a été réalisée à l'aide d'anticorps dirigés contre le peptide FLAG puis d'anticorps dirigés contre le peptide HA. La première partie de cette expérience avec les anticorps anti FLAG est identique à celle réalisée pour la lignée DSP1 simple étiquetée. L'élution et les deux lavages ont été réunis puis mis en présence de 200 µL de résine Monoclonal Anti-HA−Agarose (Sigma Aldrich) pendant 2 h à 4°C. Le surnageant a été éliminé. Les billes ont été lavées quatre fois avec 10 mL de tampon de lavage. En ajoutant 2 mL de PBS contenant 500µg par mL de peptide 3x HA (500µg par mL) à 4°C pendant une nuit, les protéines fixées aux anticorps ont été éluées. Après élution, la résine a été lavée deux fois avec 3 mL de tampon de lavage. Enfin, les protéines présentes dans les élutions ont été analysées par Western Blot.

Co-immunoprécipitation.

500 µg d'extraits protéiques embryonnaires sont incubés avec 20 µL de billes AminoLink® Plus Coupling Gel (Pierce) couplées avec des anticorps anti-DSP1 ou anti-IgG (expérience contrôle) pendant deux heures à 4°C. Les billes sont lavées quatre fois avec du tampon de lavage. Les protéines immunoprécipitées sont éluées avec du tampon ImmunoPure® IgG Elution Buffer pH 2.8 (Pierce). Ensuite, les protéines éluées sont analysées par Western Blot.

Production et purification de la protéine DSP1 chez *Escherichia coli*.

1. Clonage de *dsp1* dans le vecteur pET31b afin de produire la protéine DSP1 étiquetée six histidines (DSP1-6 His).

La séquence codante pour la protéine DSP1 entière a été amplifiée de l'ADNc en utilisant les amorces suivantes 5'-CATATGGAACACTTTCAT_3' et 5'-CTCGAGTTGGTTCTCGTC-3'. Le protocole de PCR a été de 30 cycles : 94 °C pendant une minute, 50 °C pendant une minute et 70 °C pendant une minute et trente secondes. Le produit de PCR a été inséré dans le plasmide pCRII-TOPO (Invitrogen). La construction a été digérée par les enzymes de restriction *Nde*I (Eurogentec) et *Xho*I (Eurogentec). Le fragment d'une taille approximative de

1200 pb a été isolé et inséré dans le vecteur d'expression pET31b (Novagen). Cette construction a été utilisée pour transformer la souche de bactéries *Escherichia coli* BL21(DE3) (Novagen).

2. Test de l'expression de la protéine DSP1-6 His dans *Escherichia coli.*

Les souches d'*Escherichia coli* transformées par le plasmide pET31b-*dsp1* ont été multipliées dans une préculuture de 5 mL de milieu LB (Luria Broth) contenant 100 µg/mL d'ampicilline and 34 µg/mL de chloramphénicol pendant une nuit à 37°C. La préculture a été diluée cent fois dans 10 mL de milieu LB contenant les antibiotiques et cultivée à 37 °C. Quand la densité optique à 600 nm a été de 0.6, l'IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside) a été ajouté à une concentration finale de 1 mM. Après deux heures d'induction, les cellules ont été centrifugées. Le culot a été repris dans 100 µL de tampon de charge protéine. Ensuite, il a été chauffé à 95°C pendant 5 minutes. Les extraits bactériens ont été déposés sur un gel SDS-PAGE à 10%. Les protéines présentes dans le gel sont colorées au bleu de coomassie Simply Blue Safe stain (Invitrogen).

3. Purification de la protéine DSP1-6 His.

A 37°C sous agitation, 1,8 litre de milieu LB contenant 100 µg/mL d'ampicilline and 34 µg/mL de chloramphénicol a été inoculé avec 18 mL de préculture de bactérie BL21 (DE3) pET31b-dsp1. Quand la densité optique à 600 nm a été de 0.6, l'IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside) a été ajouté à une concentration finale de 1 mM. Après deux heures d'induction, les cellules ont été centrifugées 10 min à 4000 g à 4°C (Sorvall RC5C). Les culots ont été congelés à -80°C. Quatre grammes de culots de cellules congelées ont été repris dans 60 mL de tampon de lyse (50 mM NaH2PO4, Hcl pH8, 300 mM NaCl, 2 mM imidazole, lysozyme 1 mg/mL). Le lysat a été incubé une demi-heure à 37°C. Trois cycles de congélation/décongélation ont été nécessaires. Après, 50 mM de $MgCl_2$ et 0.1 mg/mL de DNAse I ont été ajoutés au lysat pendant 30 minutes à température ambiante. Ensuite, le lysat a été centrifugé à 16000 g pendant 20 min à 4 °C. Les protéines présentes dans le surnageant ont été précipitées par l'ajout de 32.6 g/100 mL de sulfate d'ammonium durant 45 min à 4 °C. Après centrifugation à 16000g pendant 30 minutes à 4°C, le culot a été repris dans 60 mL de tampon de lyse. La purification de la protéine DSP1-6 His a été réalisée en utilisant la résine Ni-NTA™ (Ni+, QIAGEN) suivant le protocole standard. La protéine DSP1 étiquetée six

histidines éluées a été repérée par SDS-PAGE et coloration au bleu de coomassie. Après ajout d'inhibiteurs de protéase (Complete inhibitor cocktail de chez ROCHE), les fractions contenant la protéine DSP1-6 His ont été dialysées contre du tampon 20 mM Tris Hcl pH 7, 20 mM NaCl. Puis, elles ont été concentrées dans un volume de 10 mL (Amicon cell concentrator). Par chromatographie FPLC (Amersham Bioscience), cette solution a été purifiée sur une colonne d'affinité avec une résine échangeuse de cations HiTrap SP XL. Cette colonne a été équilibrée à 4°C dans du tampon 20 mM Tris–HCl, pH 7, 20 mM NaCl. La protéine DSP1-6 His a été éluée par une augmentation linéaire de la concentration en NaCl de 20 à 500 mM avec un débit de 1 mL/min pendant 30 minutes. La protéine DSP1-6 His éluée a été repérée par SDS-PAGE et coloration au bleu de coomassie. Les fractions contenant DSP1-6 His ont été réunies puis concentrées dans un volume de un millilitre. DSP1-6 His a été séparée par tamisage moléculaire sur une colonne superdex 75 16/60 (Pharmacia). Le débit a été de 1 mL/min. La protéine DSP1-6 His éluée a été repérée par SDS-PAGE et coloration au bleu de coomassie. Les fractions contenant la protéine DSP1-6 His ont été congelées à – 80°C. La quantité de protéine DSP1-6 His a été évaluée en mesurant la densité optique de la solution à 280 nm corrigée par le coefficient d'extinction molaire de 44015 M-1 cm-1 (http://www.expasy.org/). La pureté de la solution contenant la protéine DSP1-6 His a été évaluée par spectrométrie de masse.

4. Diffusion dynamique de lumière ou Dynamic Light Scattering.

La diffusion dynamique de lumière a été effectuée sur l'appareil Dynapro–MSTC DLS. La concentration de la protéine DSP1 étiquetée six histidines était de 1.1 mM dans un tampon 20mM NaPO4 pH 7.2, 10 mM NaCl2. L'analyse a été effectuée à 4°C.

5. Etude de l'oligomérisation de la protéine DSP1.

A 50 mM de protéine DSP1 dans un tampon 50 mM NaCl, 25 mM Hepes pH 7,6, 0,1 mM EDTA, 12,5 mM $MgCl_2$, 0,05% NP40, 1 mM DTT et 10% glycerol est ajouté 0,01% de glutaraldéhyde pour un volume de réaction final de 20 µL. La réaction est arrêtée par ajout de tampon de charge protéine 2X. Puis l'oligomérisation de la protéine DSP1 est vérifiée par western blot avec des anticorps dirigés contre la protéine DSP1.

6. Spectrométrie de masse.

Les analyses de spectrométrie de masse ont été effectuées à la Plate-forme de Protéomique Analytique et Fonctionnelle du Centre de Recherches INRA de Tours à Nouzilly par Valérie

Labas. Les échantillons ont été digérés dans le gel par la trypsine pendant 2h à 37°C. Les extraits peptidiques ont été séchés puis analysés par spectrométrie de masse. Les échantillons ont été analysés par LC1D-nanoESI- Q-TOF. Les peptides issus de la digestion des bandes sont analysés par un système nanoHPLC CapLC (Waters, Manchester, UK) couplé à un spectromètre de masse Q-TOF Ultima Global (Waters Micromass, Manchester, UK) équipé d'une source d'ion en Z-spray. L'appareil est calibré à l'aide d'une solution de GluF à 500 fmol/µL (50% d'une solution d'acide formique 1% / 50 % acétonitrile, v/v)

Les échantillons sont dessalés et concentrés en ligne par une précolonne (Monolithic trap colonne, 0.3 mm I.D, Dionex).

La séparation des peptides est réalisée sur une colonne capillaire phase réverse (Atlantis dC18, 75 µm I.D., 15 cm de longueur, Waters) avec un débit de 200 nL/min.

Le profil du gradient est le suivant :

-Equilibration des colonnes avec 95% de solvant A (0.1% acide formique / 2% acétonitrile / 98% H2O, v/v) et 5% de solvant B (0.1% acide formique / 20% H2O / 80% acétonitrile, v/v)

-Gradient de 5 à 15% de B en 1 min

-Palier à 15% B pendant 4 min

-Gradient de 15% à 55% de B en 60 min

-Palier à 95% de B pendant 15 min.

L'acquisition des données se fait de façon automatique entre les modes MS et MS/MS (fragmentation) : un MS survey scan est suivi par 4 MS/MS scans sur les 4 pics détectés les plus intenses.

Les données brutes sont traitées par le logiciel ProteinLynx Global Server V 2.2.5 (PLGS) pour créer des fichiers .pkl comportant l'ensemble des précurseurs sélectionnés à la fragmentation ainsi que la liste des ions fragments associés.

Les données expérimentales sont confrontées à une banque de donnée à l'aide du logiciel MASCOT disponible sur le site de MASCOT SCIENCE (www.matrixscience.com).

Les recherches ont été réalisées en sélectionnant les critères suivants :

- banque de donnée : nr NCBI, Uniprot SwissProt
- enzyme : trypsine
- peptide charge : 2+ et 3+
- 2 miss cleavages
- 0.3 Da de précision de masse sur MS et MSMS

- Data format : pkl
- Instrument : ESI-QUAD-TOF
- carbamidométhylation et oxydation des méthionines en modifications partielles
- taxonomie : _all taxa_

7. Dichroïsme Circulaire.

Le Dichroïsme Circulaire a été réalisé sur un spectropolarimètre JASCO J-810 dans une cuve en quartz de 1 mm à 20 °C. Le spectre est présenté en molar ellipticity ($deg.cm^2.dmol^{-1}$). La concentration de la protéine DSP1 étiquetée six histidines était de 1.1 mM dans un tampon 20mM NaPO4 pH 7.2, 10 mM NaCl2. L'estimation de la structure secondaire a été effectuée en utilisant la suite logicielle CDPro (Sreerama et Woody, 2000).

Bibliographie

A

Adkins NL, Hagerman TA, Georgel P. 2006. GAGA protein: a multi-faceted transcription factor. Biochem. Cell Biol 84:559-567.

Agger K, Cloos PAC, Christensen J, Pasini D, Rose S, Rappsilber J, Issaeva I, Canaani E, Salcini AE, Helin K. 2007. UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development. Nature 449:731-734.

Albright SR, Tjian R. 2000. TAFs revisited: more data reveal new twists and confirm old ideas. Gene 242:1-13.

Americo J, Whiteley M, Brown JL, Fujioka M, Jaynes JB, Kassis JA. 2002. A complex array of DNA-binding proteins required for pairing-sensitive silencing by a polycomb group response element from the Drosophila engrailed gene. Genetics 160:1561-1571.

Armstrong JA, Papoulas O, Daubresse G, Sperling AS, Lis JT, Scott MP, Tamkun JW. 2002. The Drosophila BRM complex facilitates global transcription by RNA polymerase II. EMBO J 21:5245-5254.

Atchison L, Ghias A, Wilkinson F, Bonini N, Atchison ML. 2003. Transcription factor YY1 functions as a PcG protein in vivo. EMBO J 22:1347-1358.

B

Badenhorst P, Voas M, Rebay I, Wu C. 2002. Biological functions of the ISWI chromatin remodeling complex NURF. Genes Dev 16:3186-3198.

Bae E, Calhoun VC, Levine M, Lewis EB, Drewell RA. 2002. Characterization of the intergenic RNA profile at abdominal-A and Abdominal-B in the Drosophila bithorax complex. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 99:16847-16852.

Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, Kouzarides T. 2001. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. Nature 410:120-124.

Bantignies F, Goodman RH, Smolik SM. 2000. Functional interaction between the coactivator Drosophila CREB-binding protein and ASH1, a member of the trithorax group of chromatin modifiers. Mol. Cell. Biol 20:9317-9330.

Bantignies F, Goodman RH, Smolik SM. 2002. The interaction between the coactivator dCBP and Modulo, a chromatin-associated factor, affects segmentation and melanotic tumor formation in Drosophila. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 99:2895-2900.

Bantignies F, Grimaud C, Lavrov S, Gabut M, Cavalli G. 2003. Inheritance of Polycomb-dependent chromosomal interactions in Drosophila. Genes Dev 17:2406-2420.

Bates GJ, Nicol SM, Wilson BJ, Jacobs AF, Bourdon J, Wardrop J, Gregory DJ, Lane DP, Perkins ND, Fuller-Pace FV. 2005. The DEAD box protein p68: a novel transcriptional coactivator of the p53 tumour suppressor. EMBO J 24:543-553.

Beachy PA, Helfand SL, Hogness DS. 1985. Segmental distribution of bithorax complex proteins during Drosophila development. Nature 313:545-551.

Beisel C, Buness A, Roustan-Espinosa IM, Koch B, Schmitt S, Haas SA, Hild M, Katsuyama T, Paro R. 2007. Comparing active and repressed expression states of genes controlled by the Polycomb/Trithorax group proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 104:16615-16620.

Beisel C, Imhof A, Greene J, Kremmer E, Sauer F. 2002. Histone methylation by the Drosophila epigenetic transcriptional regulator Ash1. Nature 419:857-862.

Bejarano F, Busturia A. 2004. Function of the Trithorax-like gene during Drosophila development. Dev. Biol 268:327-341.

Bell AJ, Chauhan S, Woodson SA, Kallenbach NR. 2008. Interactions of recombinant HMGB proteins with branched RNA substrates. Biochem. Biophys. Res. Commun 377:262-267.

Bender W. 2008. MicroRNAs in the Drosophila bithorax complex. Genes Dev 22:14-19.

Benson M, Pirrotta V. 1988. The Drosophila zeste protein binds cooperatively to sites in many gene regulatory regions: implications for transvection and gene regulation. EMBO J 7:3907-3915.

Bernstein E, Duncan EM, Masui O, Gil J, Heard E, Allis CD. 2006. Mouse polycomb proteins bind differentially to methylated histone H3 and RNA and are enriched in facultative heterochromatin. Mol. Cell. Biol 26:2560-2569.

Beuchle D, Struhl G, Müller J. 2001. Polycomb group proteins and heritable silencing of Drosophila Hox genes. Development 128:993-1004.

Biggin MD, Tjian R. 1988. Transcription factors that activate the Ultrabithorax promoter in developmentally staged extracts. Cell 53:699-711.

Birve A, Sengupta AK, Beuchle D, Larsson J, Kennison JA, Rasmuson-Lestander A, Müller J. 2001. Su(z)12, a novel Drosophila Polycomb group gene that is conserved in vertebrates and plants. Development 128:3371-3379.

Bloyer S, Cavalli G, Brock HW, Dura J. 2003. Identification and characterization of polyhomeotic PREs and TREs. Dev. Biol 261:426-442.

Bray SJ, Kafatos FC. 1991. Developmental function of Elf-1: an essential transcription factor during embryogenesis in Drosophila. Genes Dev 5:1672-1683.

Breen TR, Duncan IM. 1986. Maternal expression of genes that regulate the bithorax complex of Drosophila melanogaster. Dev. Biol 118:442-456.

Breen TR, Harte PJ. 1993. Trithorax regulates multiple homeotic genes in the bithorax and Antennapedia complexes and exerts different tissue-specific, parasegment-specific and promoter-specific effects on each. Development 117:119-134.

Brehm A, Längst G, Kehle J, Clapier CR, Imhof A, Eberharter A, Müller J, Becker PB. 2000. dMi-2 and ISWI chromatin remodelling factors have distinct nucleosome binding and mobilization properties. EMBO J 19:4332-4341.

Breiling A, Turner BM, Bianchi ME, Orlando V. 2001. General transcription factors bind promoters repressed by Polycomb group proteins. Nature 412:651-655.

Brock HW, van Lohuizen M. 2001. The Polycomb group--no longer an exclusive club? Curr. Opin. Genet. Dev 11:175-181.

Brock HW, Hodgson JW, Petruk S, Mazo A. 2009. Regulatory noncoding RNAs at Hox loci. Biochem. Cell Biol 87:27-34.

Brower DL. 1987. Ultrabithorax gene expression in Drosophila imaginal discs and larval nervous system. Development 101:83-92.

Brown JL, Mucci D, Whiteley M, Dirksen ML, Kassis JA. 1998. The Drosophila Polycomb group gene pleiohomeotic encodes a DNA binding protein with homology to the transcription factor YY1. Mol. Cell 1:1057-1064.

Brown JL, Fritsch C, Mueller J, Kassis JA. 2003. The Drosophila pho-like gene encodes a YY1-related DNA binding protein that is redundant with pleiohomeotic in homeotic gene silencing. Development 130:285-294.

Brown JL, Grau DJ, DeVido SK, Kassis JA. 2005. An Sp1/KLF binding site is important for the activity of a Polycomb group response element from the Drosophila engrailed gene. Nucleic Acids Res 33:5181-5189.

Buchenau P, Hodgson J, Strutt H, Arndt-Jovin DJ. 1998. The distribution of polycomb-group proteins during cell division and development in Drosophila embryos: impact on models for silencing. J. Cell Biol 141:469-481.

Busturia A, Bienz M. 1993. Silencers in abdominal-B, a homeotic Drosophila gene. EMBO J 12:1415-1425.

Busturia A, Lloyd A, Bejarano F, Zavortink M, Xin H, Sakonju S. 2001. The MCP silencer of the Drosophila Abd-B gene requires both Pleiohomeotic and GAGA factor for the maintenance of repression. Development 128:2163-2173.

Buszczak M, Spradling AC. 2006. The Drosophila P68 RNA helicase regulates transcriptional deactivation by promoting RNA release from chromatin. Genes Dev 20:977-989.

Byrd KN, Shearn A. 2003. ASH1, a Drosophila trithorax group protein, is required for methylation of lysine 4 residues on histone H3. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 100:11535-11540.

C

Calgaro S, Boube M, Cribbs DL, Bourbon H. 2002. The Drosophila gene taranis encodes a novel trithorax group member potentially linked to the cell cycle regulatory apparatus. Genetics 160:547-560.

Canaple L, Decoville M, Leng M, Locker D. 1997. The Drosophila DSP1 gene encoding an HMG 1-like protein: genomic organization, evolutionary conservation and expression. Gene 184:285-290.

Cao R, Tsukada Y, Zhang Y. 2005. Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing. Mol. Cell 20:845-854.

Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jones RS, Zhang Y. 2002. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. Science 298:1039-1043.

Caretti G, Lei EP, Sartorelli V. 2007. The DEAD-box p68/p72 proteins and the noncoding RNA steroid receptor activator SRA: eclectic regulators of disparate biological functions. Cell Cycle 6:1172-1176.

Castrillon DH, Gönczy P, Alexander S, Rawson R, Eberhart CG, Viswanathan S, DiNardo S, Wasserman SA. 1993. Toward a molecular genetic analysis of spermatogenesis in Drosophila melanogaster: characterization of male-sterile mutants generated by single P element mutagenesis. Genetics 135:489-505.

Cavalli G, Paro R. 1998. The Drosophila Fab-7 chromosomal element conveys epigenetic inheritance during mitosis and meiosis. Cell 93:505-518.

Cavalli G, Paro R. 1999. Epigenetic inheritance of active chromatin after removal of the main transactivator. Science 286:955-958.

Cavarec L, Kamphausen T, Dubourg B, Callebaut I, Lemeunier F, Métivier D, Feunteun J, Fischer G, Modjtahedi N. 2002. Identification and characterization of Moca-cyp. A Drosophila melanogaster nuclear cyclophilin. J. Biol. Chem 277:41171-41182.

Chan CS, Rastelli L, Pirrotta V. 1994. A Polycomb response element in the Ubx gene that determines an epigenetically inherited state of repression. EMBO J 13:2553-2564.

Chen S, Birve A, Rasmuson-Lestander A. 2008. In vivo analysis of Drosophila SU(Z)12 function. Mol. Genet. Genomics 279:159-170.

Chen X, Hiller M, Sancak Y, Fuller MT. 2005. Tissue-specific TAFs counteract Polycomb to turn on terminal differentiation. Science 310:869-872.

Chinwalla V, Jane EP, Harte PJ. 1995. The Drosophila trithorax protein binds to specific chromosomal sites and is co-localized with Polycomb at many sites. EMBO J 14:2056-2065.

Chopra VS, Hong J, Levine M. 2009. Regulation of Hox gene activity by transcriptional elongation in Drosophila. Curr. Biol 19:688-693.

Chopra VS, Srinivasan A, Kumar RP, Mishra K, Basquin D, Docquier M, Seum C, Pauli D, Mishra RK. 2008. Transcriptional activation by GAGA factor is through its direct interaction with dmTAF3. Dev. Biol 317:660-670.

Classen A, Bunker BD, Harvey KF, Vaccari T, Bilder D. 2009. A tumor suppressor activity of Drosophila Polycomb genes mediated by JAK-STAT signaling. Nat. Genet 41:1150-1155.

Cléard F, Delattre M, Spierer P. 1997. SU(VAR)3-7, a Drosophila heterochromatin-associated protein and companion of HP1 in the genomic silencing of position-effect variegation. EMBO J 16:5280-5288.

Cléard F, Moshkin Y, Karch F, Maeda RK. 2006. Probing long-distance regulatory interactions in the Drosophila melanogaster bithorax complex using Dam identification. Nat. Genet 38:931-935.

Collins RT, Furukawa T, Tanese N, Treisman JE. 1999. Osa associates with the Brahma chromatin remodeling complex and promotes the activation of some target genes. EMBO J 18:7029-7040.

Cordin O, Banroques J, Tanner NK, Linder P. 2006. The DEAD-box protein family of RNA helicases. Gene 367:17-37.

Csink AK, Linsk R, Birchler JA. 1994. The Lighten up (Lip) gene of Drosophila melanogaster, a modifier of retroelement expression, position effect variegation and white locus insertion alleles. Genetics 138:153-163.

Czermin B, Schotta G, Hülsmann BB, Brehm A, Becker PB, Reuter G, Imhof A. 2001. Physical and functional association of SU(VAR)3-9 and HDAC1 in Drosophila. EMBO Rep 2:915-919.

Czermin B, Melfi R, McCabe D, Seitz V, Imhof A, Pirrotta V. 2002. Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. Cell 111:185-196.

D

Daubresse G, Deuring R, Moore L, Papoulas O, Zakrajsek I, Waldrip WR, Scott MP, Kennison JA, Tamkun JW. 1999. The Drosophila kismet gene is related to chromatin-remodeling factors and is required for both segmentation and segment identity. Development 126:1175-1187.

Daulny A, Rappailles A, Landemarre L, Locker D, Decoville M. 2003. DSP1 interacts with bicoid for knirps enhancement. Genesis 36:104-113.

DeCamillis M, Cheng NS, Pierre D, Brock HW. 1992. The polyhomeotic gene of Drosophila encodes a chromatin protein that shares polytene chromosome-binding sites with Polycomb. Genes Dev 6:223-232.

Decoville M, Giacomello E, Leng M, Locker D. 2001. DSP1, an HMG-like protein, is involved in the regulation of homeotic genes. Genetics 157:237-244.

Decoville M, Giraud-Panis MJ, Mosrin-Huaman C, Leng M, Locker D. 2000. HMG boxes of DSP1 protein interact with the rel homology domain of transcription factors. Nucleic Acids Res 28:454-462.

Déjardin J, Cavalli G. 2004. Chromatin inheritance upon Zeste-mediated Brahma recruitment at a minimal cellular memory module. EMBO J 23:857-868.

Déjardin J, Cavalli G. 2005. Epigenetic inheritance of chromatin states mediated by Polycomb and trithorax group proteins in Drosophila. Prog. Mol. Subcell. Biol 38:31-63.

Déjardin J, Rappailles A, Cuvier O, Grimaud C, Decoville M, Locker D, Cavalli G. 2005. Recruitment of Drosophila Polycomb group proteins to chromatin by DSP1. Nature 434:533-538.

Dellino GI, Schwartz YB, Farkas G, McCabe D, Elgin SCR, Pirrotta V. 2004. Polycomb silencing blocks transcription initiation. Mol. Cell 13:887-893.

Ding Y, Yao C, Lince-Faria M, Rath U, Cai W, Maiato H, Girton J, Johansen KM, Johansen J. 2009. Chromator is required for proper microtubule spindle formation and mitosis in Drosophila. Dev. Biol 334:253-63.

Dingwall AK, Beek SJ, McCallum CM, Tamkun JW, Kalpana GV, Goff SP, Scott MP. 1995. The Drosophila snr1 and brm proteins are related to yeast SWI/SNF proteins and are components of a large protein complex. Mol. Biol. Cell 6:777-791.

Diop SB, Bertaux K, Vasanthi D, Sarkeshik A, Goirand B, Aragnol D, Tolwinski NS, Cole MD, Pradel J, Yates JR, Mishra RK, Graba Y, Saurin AJ. 2008. Reptin and Pontin function antagonistically with PcG and TrxG complexes to mediate Hox gene control. EMBO Rep 9:260-266.

Dorer DR, Christensen AC, Johnson DH. 1990. A novel RNA helicase gene tightly linked to the Triplo-lethal locus of Drosophila. Nucleic Acids Res 18:5489-5494.

Duboule D, Morata G. 1994. Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. Trends Genet 10:358-364.

Duncan IM. 1982. Polycomblike: a gene that appears to be required for the normal expression of the bithorax and antennapedia gene complexes of Drosophila melanogaster. Genetics 102:49-70.

Duncan I, Montgomery G. 2002. E. B. Lewis and the bithorax complex: part II. From cis-trans test to the genetic control of development. Genetics 161:1-10.

Dura JM, Brock HW, Santamaria P. 1985. Polyhomeotic: a gene of Drosophila melanogaster required for correct expression of segmental identity. Mol. Gen. Genet 198:213-220.

Dynlacht BD, Attardi LD, Admon A, Freeman M, Tjian R. 1989. Functional analysis of NTF-1, a developmentally regulated Drosophila transcription factor that binds neuronal cis elements. Genes Dev 3:1677-1688.

E

Eissenberg JC, James TC, Foster-Hartnett DM, Hartnett T, Ngan V, Elgin SC. 1990. Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in Drosophila melanogaster. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 87:9923-9927.

Elgin SC. 1988. The formation and function of DNase I hypersensitive sites in the process of gene activation. J. Biol. Chem 263:19259-19262.

F

Farkas G, Gausz J, Galloni M, Reuter G, Gyurkovics H, Karch F. 1994. The Trithorax-like gene encodes the Drosophila GAGA factor. Nature 371:806-808.

Faucheux M, Roignant J, Netter S, Charollais J, Antoniewski C, Théodore L. 2003. batman Interacts with polycomb and trithorax group genes and encodes a BTB/POZ protein that is included in a complex containing GAGA factor. Mol. Cell. Biol 23:1181-1195.

Fauvarque MO, Dura JM. 1993. polyhomeotic regulatory sequences induce developmental regulator-dependent variegation and targeted P-element insertions in Drosophila. Genes Dev 7:1508-1520.

Fedorova E, Sadoni N, Dahlsveen IK, Koch J, Kremmer E, Eick D, Paro R, Zink D. 2008. The nuclear organization of Polycomb/Trithorax group response elements in larval tissues of Drosophila melanogaster. Chromosome Res 16:649-673.

Ferrandon D, Imler J, Hetru C, Hoffmann JA. 2007. The Drosophila systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. Nat. Rev. Immunol 7:862-874.

Ficz G, Heintzmann R, Arndt-Jovin DJ. 2005. Polycomb group protein complexes exchange rapidly in living Drosophila. Development 132:3963-3976.

Fiedler T, Rehmsmeier M. 2006. jPREdictor: a versatile tool for the prediction of cis-regulatory elements. Nucleic Acids Res 34:W546-550.

Fischle W, Wang Y, Jacobs SA, Kim Y, Allis CD, Khorasanizadeh S. 2003. Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. Genes Dev 17:1870-1881.

Francis NJ, Saurin AJ, Shao Z, Kingston RE. 2001. Reconstitution of a functional core polycomb repressive complex. Mol. Cell 8:545-556.

Francis NJ. 2009. Does maintenance of polycomb group proteins through DNA replication contribute to epigenetic inheritance? Epigenetics 4:370-373.

Francis NJ, Follmer NE, Simon MD, Aghia G, Butler JD. 2009. Polycomb proteins remain bound to chromatin and DNA during DNA replication in vitro. Cell 137:110-122.

Francis NJ, Kingston RE, Woodcock CL. 2004. Chromatin compaction by a polycomb group protein complex. Science 306:1574-1577.

Franke A, DeCamillis M, Zink D, Cheng N, Brock HW, Paro R. 1992. Polycomb and polyhomeotic are constituents of a multimeric protein complex in chromatin of Drosophila melanogaster. EMBO J 11:2941-2950.

Fritsch C, Brown JL, Kassis JA, Müller J. 1999. The DNA-binding polycomb group protein pleiohomeotic mediates silencing of a Drosophila homeotic gene. Development 126:3905-3913.

Frolov MV, Birchler JA. 1998. Mutation in P0, a dual function ribosomal protein/apurinic/apyrimidinic endonuclease, modifies gene expression and position effect variegation in Drosophila. Genetics 150:1487-1495.

Fujioka M, Yusibova GL, Zhou J, Jaynes JB. 2008. The DNA-binding Polycomb-group protein Pleiohomeotic maintains both active and repressed transcriptional states through a single site. Development 135:4131-4139.

Fuller-Pace FV. 2006. DExD/H box RNA helicases: multifunctional proteins with important roles in transcriptional regulation. Nucleic Acids Res 34:4206-4215.

Furuyama T, Banerjee R, Breen TR, Harte PJ. 2004. SIR2 is required for polycomb silencing and is associated with an E(Z) histone methyltransferase complex. Curr. Biol 14:1812-1821.

Fyodorov DV, Blower MD, Karpen GH, Kadonaga JT. 2004. Acf1 confers unique activities to ACF/CHRAC and promotes the formation rather than disruption of chromatin in vivo. Genes Dev 18:170-183.

G

Galloni M, Gyurkovics H, Schedl P, Karch F. 1993. The bluetail transposon: evidence for independent cis-regulatory domains and domain boundaries in the bithorax complex. EMBO J 12:1087-1097.

Gambetta MC, Oktaba K, Müller J. 2009. Essential Role of the Glycosyltransferase Sxc/Ogt in Polycomb Repression. Science 325:93-6.

García E, Marcos-Gutiérrez C, del Mar Lorente M, Moreno JC, Vidal M. 1999. RYBP, a new repressor protein that interacts with components of the mammalian Polycomb complex, and with the transcription factor YY1. EMBO J 18:3404-3418.

Garzino V, Pereira A, Laurenti P, Graba Y, Levis RW, Le Parco Y, Pradel J. 1992. Cell lineage-specific expression of modulo, a dose-dependent modifier of variegation in Drosophila. EMBO J 11:4471-4479.

Gatti M, Pimpinelli S. 1992. Functional elements in Drosophila melanogaster heterochromatin. Annu. Rev. Genet 26:239-275.

Gibson G. 2000. Evolution: hox genes and the cellared wine principle. Curr. Biol 10:R452-455.

Gildea JJ, Lopez R, Shearn A. 2000. A screen for new trithorax group genes identified little imaginal discs, the Drosophila melanogaster homologue of human retinoblastoma binding protein 2. Genetics 156:645-663.

Gindhart JG, Kaufman TC. 1995. Identification of Polycomb and trithorax group responsive elements in the regulatory region of the Drosophila homeotic gene Sex combs reduced. Genetics 139:797-814.

Gindhart JG, King AN, Kaufman TC. 1995. Characterization of the cis-regulatory region of the Drosophila homeotic gene Sex combs reduced. Genetics 139:781-795.

Goldberg ML, Colvin RA, Mellin AF. 1989. The Drosophila zeste locus is nonessential. Genetics 123:145-155.

Grewal SIS, Elgin SCR. 2002. Heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure. Curr. Opin. Genet. Dev 12:178-187.

Grimaud C, Bantignies F, Pal-Bhadra M, Ghana P, Bhadra U, Cavalli G. 2006a. RNAi components are required for nuclear clustering of Polycomb group response elements. Cell 124:957-971.

Grimaud C, Nègre N, Cavalli G. 2006b. From genetics to epigenetics: the tale of Polycomb group and trithorax group genes. Chromosome Res 14:363-375.

Grimm C, de Ayala Alonso AG, Rybin V, Steuerwald U, Ly-Hartig N, Fischle W, Müller J, Müller CW. 2007. Structural and functional analyses of methyl-lysine binding by the malignant brain tumour repeat protein Sex comb on midleg. EMBO Rep 8:1031-1037.

Grimm C, Matos R, Ly-Hartig N, Steuerwald U, Lindner D, Rybin V, Müller J, Müller CW. 2009. Molecular recognition of histone lysine methylation by the Polycomb group repressor dSfmbt. EMBO J 28:1965-1977.

Gutiérrez L, Zurita M, Kennison JA, Vázquez M. 2003. The Drosophila trithorax group gene tonalli (tna) interacts genetically with the Brahma remodeling complex and encodes an SP-RING finger protein. Development 130:343-354.

Gyurkovics H, Gausz J, Kummer J, Karch F. 1990. A new homeotic mutation in the Drosophila bithorax complex removes a boundary separating two domains of regulation. EMBO J 9:2579-2585.

H

Hansen KH, Bracken AP, Pasini D, Dietrich N, Gehani SS, Monrad A, Rappsilber J, Lerdrup M, Helin K. 2008. A model for transmission of the H3K27me3 epigenetic mark. Nat. Cell Biol 10:1291-1300.

Hardman CH, Broadhurst RW, Raine AR, Grasser KD, Thomas JO, Laue ED. 1995. Structure of the A-domain of HMG1 and its interaction with DNA as studied by heteronuclear three- and four-dimensional NMR spectroscopy. Biochemistry 34:16596-16607.

Hauenschild A, Ringrose L, Altmutter C, Paro R, Rehmsmeier M. 2008. Evolutionary plasticity of polycomb/trithorax response elements in Drosophila species. PLoS Biol 6:e261.

Hayashi Y, Yamagishi M, Nishimoto Y, Taguchi O, Matsukage A, Yamaguchi M. 1999. A binding site for the transcription factor Grainyhead/Nuclear transcription factor-1 contributes to regulation of the Drosophila proliferating cell nuclear antigen gene promoter. J. Biol. Chem 274:35080-35088.

Hekimoglu B, Ringrose L. 2009. Non-coding RNAs in polycomb/trithorax regulation. RNA Biol 6:129-137.

Hogga I, Karch F. 2002. Transcription through the iab-7 cis-regulatory domain of the bithorax complex interferes with maintenance of Polycomb-mediated silencing. Development 129:4915-4922.

Holdeman R, Nehrt S, Strome S. 1998. MES-2, a maternal protein essential for viability of the germline in Caenorhabditis elegans, is homologous to a Drosophila Polycomb group protein. Development 125:2457-2467.

Horard B, Tatout C, Poux S, Pirrotta V. 2000. Structure of a polycomb response element and in vitro binding of polycomb group complexes containing GAGA factor. Mol. Cell. Biol 20:3187-3197.

Huang D, Chang Y. 2004. Isolation and characterization of CHRASCH, a polycomb-containing silencing complex. Meth. Enzymol 377:267-282.

Huang D, Chang Y, Yang C, Pan I, King B. 2002. pipsqueak encodes a factor essential for sequence-specific targeting of a polycomb group protein complex. Mol. Cell. Biol 22:6261-6271.

Hughes CL, Kaufman TC. 2002. Hox genes and the evolution of the arthropod body plan. Evol. Dev 4:459-499.

Hur M, Laney JD, Jeon S, Ali J, Biggin MD. 2002. Zeste maintains repression of Ubx transgenes: support for a new model of Polycomb repression. Development 129:1339-1343.

Hurlstone A, Clevers H. 2002. T-cell factors: turn-ons and turn-offs. EMBO J 21:2303-2311.

I

Ingham PW. 1985. A clonal analysis of the requirement for the trithorax gene in the diversification of segments in Drosophila. J Embryol Exp Morphol 89:349-365.

Ingham PW. 1998. trithorax and the regulation of homeotic gene expression in Drosophila: a historical perspective. Int. J. Dev. Biol 42:423-429.

Ishizuka A, Siomi MC, Siomi H. 2002. A Drosophila fragile X protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins. Genes Dev 16:2497-2508.

J

Jaffe AB, Jongens TA. 2001. Structure-specific abnormalities associated with mutations in a DNA replication accessory factor in Drosophila. Dev. Biol 230:161-176.

James TC, Elgin SC. 1986. Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in Drosophila melanogaster and its gene. Mol. Cell. Biol 6:3862-3872.

Janke C, Martin D, Giraud-Panis M, Decoville M, Locker D. 2003. Drosophila DSP1 and rat HMGB1 have equivalent DNA binding properties and share a similar secondary fold. J. Biochem 133:533-539.

Janody F, Lee JD, Jahren N, Hazelett DJ, Benlali A, Miura GI, Draskovic I, Treisman JE. 2004. A mosaic genetic screen reveals distinct roles for trithorax and polycomb group genes in Drosophila eye development. Genetics 166:187-200.

Jantzen HM, Admon A, Bell SP, Tjian R. 1990. Nucleolar transcription factor hUBF contains a DNA-binding motif with homology to HMG proteins. Nature 344:830-836.

Jenuwein T, Allis CD. 2001. Translating the histone code. Science 293:1074-1080.

Jones RS, Gelbart WM. 1990. Genetic analysis of the enhancer of zeste locus and its role in gene regulation in Drosophila melanogaster. Genetics 126:185-199.

Jurgens G. 1985. A group of genes controlling the spatial expression of the bithorax complex in Drosophila. Nature 316:153-155.

K

Kahn TG, Schwartz YB, Dellino GI, Pirrotta V. 2006. Polycomb complexes and the propagation of the methylation mark at the Drosophila ubx gene. J. Biol. Chem 281:29064-29075.

Kal AJ, Mahmoudi T, Zak NB, Verrijzer CP. 2000. The Drosophila brahma complex is an essential coactivator for the trithorax group protein zeste. Genes Dev 14:1058-1071.

Kang D, Kim SH, Hamasaki N. 2007. Mitochondrial transcription factor A (TFAM): roles in maintenance of mtDNA and cellular functions. Mitochondrion 7:39-44.

Karch F, Bender W, Weiffenbach B. 1990. abdA expression in Drosophila embryos. Genes Dev 4:1573-1587.

Karch F, Galloni M, Sipos L, Gausz J, Gyurkovics H, Schedl P. 1994. Mcp and Fab-7: molecular analysis of putative boundaries of cis-regulatory domains in the bithorax complex of Drosophila melanogaster. Nucleic Acids Res 22:3138-3146.

Kassis JA. 1994. Unusual properties of regulatory DNA from the Drosophila engrailed gene: three "pairing-sensitive" sites within a 1.6-kb region. Genetics 136:1025-1038.

Kassis JA, VanSickle EP, Sensabaugh SM. 1991. A fragment of engrailed regulatory DNA can mediate transvection of the white gene in Drosophila. Genetics 128:751-761.

Kaufman TC, Seeger MA, Olsen G. 1990. Molecular and genetic organization of the antennapedia gene complex of Drosophila melanogaster. Adv. Genet 27:309-362.

Kehle J, Beuchle D, Treuheit S, Christen B, Kennison JA, Bienz M, Müller J. 1998. dMi-2, a hunchback-interacting protein that functions in polycomb repression. Science 282:1897-1900.

Kennison JA, Tamkun JW. 1988. Dosage-dependent modifiers of polycomb and antennapedia mutations in Drosophila. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 85:8136-8140.

Kiefer JC. 2007. Back to basics: Sox genes. Dev. Dyn 236:2356-2366.

Kim LK, Choi UY, Cho HS, Lee JS, Lee W, Kim J, Jeong K, Shim J, Kim-Ha J, Kim Y. 2007. Down-regulation of NF-kappaB target genes by the AP-1 and STAT complex during the innate immune response in Drosophila. PLoS Biol 5:e238.

Kim TH, Barrera LO, Zheng M, Qu C, Singer MA, Richmond TA, Wu Y, Green RD, Ren B. 2005. A high-resolution map of active promoters in the human genome. Nature 436:876-880.

Klymenko T, Müller J. 2004. The histone methyltransferases Trithorax and Ash1 prevent transcriptional silencing by Polycomb group proteins. EMBO Rep 5:373-377.

Klymenko T, Papp B, Fischle W, Köcher T, Schelder M, Fritsch C, Wild B, Wilm M, Müller J. 2006. A Polycomb group protein complex with sequence-specific DNA-binding and selective methyl-lysine-binding activities. Genes Dev 20:1110-1122.

Köhler C, Villar CBR. 2008. Programming of gene expression by Polycomb group proteins. Trends Cell Biol 18:236-243.

Korf I, Fan Y, Strome S. 1998. The Polycomb group in Caenorhabditis elegans and maternal control of germline development. Development 125:2469-2478.

Krajewski WA, Nakamura T, Mazo A, Canaani E. 2005. A motif within SET-domain proteins binds single-stranded nucleic acids and transcribed and supercoiled DNAs and can interfere with assembly of nucleosomes. Mol. Cell. Biol 25:1891-1899.

Kuzin B, Tillib S, Sedkov Y, Mizrokhi L, Mazo A. 1994. The Drosophila trithorax gene encodes a chromosomal protein and directly regulates the region-specific homeotic gene fork head. Genes Dev 8:2478-2490.

Kuzmichev A, Jenuwein T, Tempst P, Reinberg D. 2004. Different EZH2-containing complexes target methylation of histone H1 or nucleosomal histone H3. Mol. Cell 14:183-193.

Kuzmichev A, Margueron R, Vaquero A, Preissner TS, Scher M, Kirmizis A, Ouyang X, Brockdorff N, Abate-Shen C, Farnham P, Reinberg D. 2005. Composition and histone substrates of polycomb repressive group complexes change during cellular differentiation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 102:1859-1864.

Kwong C, Adryan B, Bell I, Meadows L, Russell S, Manak JR, White R. 2008. Stability and dynamics of polycomb target sites in Drosophila development. PLoS Genet 4:e1000178.

L

Lagarou A, Mohd-Sarip A, Moshkin YM, Chalkley GE, Bezstarosti K, Demmers JAA, Verrijzer CP. 2008. dKDM2 couples histone H2A ubiquitylation to histone H3 demethylation during Polycomb group silencing. Genes Dev 22:2799-2810.

Lamiable O, Rabhi M, Peronnet F, Locker D, Decoville M. 2010. Rm62, A DEAD-Box RNA helicase, complexes with DSP1 in Drosophila embryos. Genesis 48:244-53

Laney JD, Biggin MD. 1992. zeste, a nonessential gene, potently activates Ultrabithorax transcription in the Drosophila embryo. Genes Dev 6:1531-1541.

Laney JD, Biggin MD. 1996. Redundant control of Ultrabithorax by zeste involves functional levels of zeste protein binding at the Ultrabithorax promoter. Development 122:2303-2311.

Lavigne M, Francis NJ, King IFG, Kingston RE. 2004. Propagation of silencing; recruitment and repression of naive chromatin in trans by polycomb repressed chromatin. Mol. Cell 13:415-425.

Lawrence PA. 1992. The Making of a Fly: The Genetics of Animal Design. WileyBlackwell.

Lee N, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jones RS, Zhang Y. 2009. The H3K4 demethylase lid associates with and inhibits histone deacetylase Rpd3. Mol. Cell. Biol 29:1401-1410.

Lehmann M, Siegmund T, Lintermann KG, Korge G. 1998. The pipsqueak protein of Drosophila melanogaster binds to GAGA sequences through a novel DNA-binding domain. J. Biol. Chem 273:28504-28509.

Lehmann M. 2004. Anything else but GAGA: a nonhistone protein complex reshapes chromatin structure. Trends Genet 20:15-22.

Lehming N, Thanos D, Brickman JM, Ma J, Maniatis T, Ptashne M. 1994. An HMG-like protein that can switch a transcriptional activator to a repressor. Nature 371:175-179.

Lei EP, Corces VG. 2006. RNA interference machinery influences the nuclear organization of a chromatin insulator. Nat. Genet 38:936-941.

Leibovitch BA, Lu Q, Benjamin LR, Liu Y, Gilmour DS, Elgin SCR. 2002. GAGA factor and the TFIID complex collaborate in generating an open chromatin structure at the Drosophila melanogaster hsp26 promoter. Mol. Cell. Biol 22:6148-6157.

Levine SS, Weiss A, Erdjument-Bromage H, Shao Z, Tempst P, Kingston RE. 2002. The core of the polycomb repressive complex is compositionally and functionally conserved in flies and humans. Mol. Cell. Biol 22:6070-6078.

Lewis EB. 1978. A gene complex controlling segmentation in Drosophila. Nature 276:565-570.

Lewis EB. 1998. The bithorax complex: the first fifty years. Int. J. Dev. Biol 42:403-415.

Lewis P. 1947. New mutants report. Drosophila Information Service 21:69.

Li H, Ilin S, Wang W, Duncan EM, Wysocka J, Allis CD, Patel DJ. 2006. Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF. Nature 442:91-95.

Little JW, Byrd CA, Brower DL. 1990. Effect of abx, bx and pbx mutations on expression of homeotic genes in Drosophila larvae. Genetics 124:899-908.

Lopez A, Higuet D, Rosset R, Deutsch J, Peronnet F. 2001. corto genetically interacts with Pc-G and trx-G genes and maintains the anterior boundary of Ultrabithorax expression in Drosophila larvae. Mol. Genet. Genomics 266:572-583.

Love JJ, Li X, Case DA, Giese K, Grosschedl R, Wright PE. 1995. Structural basis for DNA bending by the architectural transcription factor LEF-1. Nature 376:791-795.

Lu Q, Wallrath LL, Granok H, Elgin SC. 1993. (CT)n (GA)n repeats and heat shock elements have distinct roles in chromatin structure and transcriptional activation of the Drosophila hsp26 gene. Mol. Cell. Biol 13:2802-2814.

Ludlam WH, Taylor MH, Tanner KG, Denu JM, Goodman RH, Smolik SM. 2002. The acetyltransferase activity of CBP is required for wingless activation and H4 acetylation in Drosophila melanogaster. Mol. Cell. Biol 22:3832-3841.

M

Macias A, Casanova J, Morata G. 1990. Expression and regulation of the abd-A gene of Drosophila. Development 110:1197-1207.

Maeda RK, Karch F. 2006. The ABC of the BX-C: the bithorax complex explained. Development 133:1413-1422.

Mahmoudi T, Zuijderduijn LMP, Mohd-Sarip A, Verrijzer CP. 2003. GAGA facilitates binding of Pleiohomeotic to a chromatinized Polycomb response element. Nucleic Acids Res 31:4147-4156.

Maixner A, Hecker TP, Phan QN, Wassarman DA. 1998. A screen for mutations that prevent lethality caused by expression of activated sevenless and Ras1 in the Drosophila embryo. Dev. Genet 23:347-361.

Manak JR, Dike S, Sementchenko V, Kapranov P, Biemar F, Long J, Cheng J, Bell I, Ghosh S, Piccolboni A, Gingeras TR. 2006. Biological function of unannotated transcription during the early development of Drosophila melanogaster. Nat. Genet 38:1151-1158.

Marenda DR, Zraly CB, Feng Y, Egan S, Dingwall AK. 2003. The Drosophila SNR1 (SNF5/INI1) subunit directs essential developmental functions of the Brahma chromatin remodeling complex. Mol. Cell. Biol 23:289-305.

Martinez A, Colomb S, Déjardin J, Bantignies F, Cavalli G. 2006. Polycomb group-dependent Cyclin A repression in Drosophila. Genes Dev 20:501-513.

Martinez A, Schuettengruber B, Sakr S, Janic A, Gonzalez C, Cavalli G. 2009. Polyhomeotic has a tumor suppressor activity mediated by repression of Notch signaling. Nat. Genet 41:1076-1082.

Masse JE, Wong B, Yen Y, Allain FHT, Johnson RC, Feigon J. 2002. The S. cerevisiae architectural HMGB protein NHP6A complexed with DNA: DNA and protein conformational changes upon binding. J. Mol. Biol 323:263-284.

Mateos-Langerak J, Cavalli G. 2008. Polycomb group proteins and long-range gene regulation. Adv. Genet 61:45-66.

Maurange C, Paro R. 2002. A cellular memory module conveys epigenetic inheritance of hedgehog expression during Drosophila wing imaginal disc development. Genes Dev 16:2672-2683.

Mazo AM, Huang DH, Mozer BA, Dawid IB. 1990. The trithorax gene, a trans-acting regulator of the bithorax complex in Drosophila, encodes a protein with zinc-binding domains. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 87:2112-2116.

Mazo A, Hodgson JW, Petruk S, Sedkov Y, Brock HW. 2007. Transcriptional interference: an unexpected layer of complexity in gene regulation. J. Cell. Sci 120:2755-2761.

McGinnis W, Krumlauf R. 1992. Homeobox genes and axial patterning. Cell 68:283-302.

McKeon J, Brock H. 1991. Interactions of the Polycomb group of genes with homeotic loci of Drosophila. 199:387-396.

McKittrick E, Gafken PR, Ahmad K, Henikoff S. 2004. Histone H3.3 is enriched in covalent modifications associated with active chromatin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 101:1525-1530.

Messmer S, Franke A, Paro R. 1992. Analysis of the functional role of the Polycomb chromo domain in Drosophila melanogaster. Genes Dev 6:1241-1254.

Mishra K, Chopra VS, Srinivasan A, Mishra RK. 2003. Trl-GAGA directly interacts with lola like and both are part of the repressive complex of Polycomb group of genes. Mech. Dev 120:681-689.

Mishra RK, Mihaly J, Barges S, Spierer A, Karch F, Hagstrom K, Schweinsberg SE, Schedl P. 2001. The iab-7 polycomb response element maps to a nucleosome-free region of chromatin and requires both GAGA and pleiohomeotic for silencing activity. Mol. Cell. Biol 21:1311-1318.

Mito Y, Henikoff JG, Henikoff S. 2007. Histone replacement marks the boundaries of cis-regulatory domains. Science 315:1408-1411.

Miyagishima H, Isono K, Fujimura Y, Iyo M, Takihara Y, Masumoto H, Vidal M, Koseki H. 2003. Dissociation of mammalian Polycomb-group proteins, Ring1B and Rae28/Ph1, from the chromatin correlates with configuration changes of the chromatin in mitotic and meiotic prophase. Histochem. Cell Biol 120:111-119.

Mohd-Sarip A, Venturini F, Chalkley GE, Verrijzer CP. 2002. Pleiohomeotic can link polycomb to DNA and mediate transcriptional repression. Mol. Cell. Biol 22:7473-7483.

Mohrmann L, Langenberg K, Krijgsveld J, Kal AJ, Heck AJR, Verrijzer CP. 2004. Differential targeting of two distinct SWI/SNF-related Drosophila chromatin-remodeling complexes. Mol. Cell. Biol 24:3077-3088.

Mohrmann L, Verrijzer CP. 2005. Composition and functional specificity of SWI2/SNF2 class chromatin remodeling complexes. Biochim. Biophys. Acta 1681:59-73.

Mollaaghababa R, Sipos L, Tiong SY, Papoulas O, Armstrong JA, Tamkun JW, Bender W. 2001. Mutations in Drosophila heat shock cognate 4 are enhancers of Polycomb. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 98:3958-3963.

Morrison AJ, Shen X. 2009. Chromatin remodelling beyond transcription: the INO80 and SWR1 complexes. Nat. Rev. Mol. Cell Biol 10:373-384.

Mosrin-Huaman C, Canaple L, Locker D, Decoville M. 1998. DSP1 gene of Drosophila melanogaster encodes an HMG-domain protein that plays multiple roles in development. Dev. Genet 23:324-334.

Müller J, Gaunt S, Lawrence PA. 1995. Function of the Polycomb protein is conserved in mice and flies. Development 121:2847-2852.

Müller J, Hart CM, Francis NJ, Vargas ML, Sengupta A, Wild B, Miller EL, O'Connor MB, Kingston RE, Simon JA. 2002. Histone methyltransferase activity of a Drosophila Polycomb group repressor complex. Cell 111:197-208.

Müller J, Kassis JA. 2006. Polycomb response elements and targeting of Polycomb group proteins in Drosophila. Curr. Opin. Genet. Dev 16:476-484.

Mujtaba S, Zeng L, Zhou M. 2007. Structure and acetyl-lysine recognition of the bromodomain. Oncogene 26:5521-5527.

Mulholland NM, King IFG, Kingston RE. 2003. Regulation of Polycomb group complexes by the sequence-specific DNA binding proteins Zeste and GAGA. Genes Dev 17:2741-2746.

Murphy EC, Zhurkin VB, Louis JM, Cornilescu G, Clore GM. 2001. Structural basis for SRY-dependent 46-X,Y sex reversal: modulation of DNA bending by a naturally occurring point mutation. J. Mol. Biol 312:481-499.

Murphy FV, Sweet RM, Churchill ME. 1999. The structure of a chromosomal high mobility group protein-DNA complex reveals sequence-neutral mechanisms important for non-sequence-specific DNA recognition. EMBO J 18:6610-6618.

N

Nagy PL, Griesenbeck J, Kornberg RD, Cleary ML. 2002. A trithorax-group complex purified from Saccharomyces cerevisiae is required for methylation of histone H3. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 99:90-94.

de Napoles M, Mermoud JE, Wakao R, Tang YA, Endoh M, Appanah R, Nesterova TB, Silva J, Otte AP, Vidal M, Koseki H, Brockdorff N. 2004. Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. Dev. Cell 7:663-676.

Narbonne K, Besse F, Brissard-Zahraoui J, Pret A, Busson D. 2004. polyhomeotic is required for somatic cell proliferation and differentiation during ovarian follicle formation in Drosophila. Development 131:1389-1400.

Nègre N, Hennetin J, Sun LV, Lavrov S, Bellis M, White KP, Cavalli G. 2006. Chromosomal distribution of PcG proteins during Drosophila development. PLoS Biol 4:e170.

Nekrasov M, Klymenko T, Fraterman S, Papp B, Oktaba K, Köcher T, Cohen A, Stunnenberg HG, Wilm M, Müller J. 2007. Pcl-PRC2 is needed to generate high levels of H3-K27 trimethylation at Polycomb target genes. EMBO J 26:4078-4088.

Netter S, Faucheux M, Théodore L. 2001. Developmental dynamics of a polyhomeotic-EGFP fusion in vivo. DNA Cell Biol 20:483-492.

Ng J, Hart CM, Morgan K, Simon JA. 2000. A Drosophila ESC-E(Z) protein complex is distinct from other polycomb group complexes and contains covalently modified ESC. Mol. Cell. Biol 20:3069-3078.

Ng RK, Gurdon JB. 2008. Epigenetic inheritance of cell differentiation status. Cell Cycle 7:1173-1177.

Nightingale KP, Wellinger RE, Sogo JM, Becker PB. 1998. Histone acetylation facilitates RNA polymerase II transcription of the Drosophila hsp26 gene in chromatin. EMBO J 17:2865-2876.

O

Oktaba K, Gutiérrez L, Gagneur J, Girardot C, Sengupta AK, Furlong EEM, Müller J. 2008. Dynamic regulation by polycomb group protein complexes controls pattern formation and the cell cycle in Drosophila. Dev. Cell 15:877-889.

Orlando V, Jane EP, Chinwalla V, Harte PJ, Paro R. 1998. Binding of trithorax and Polycomb proteins to the bithorax complex: dynamic changes during early Drosophila embryogenesis. EMBO J 17:5141-5150.

Orlando V, Strutt H, Paro R. 1997. Analysis of chromatin structure by in vivo formaldehyde cross-linking. Methods 11:205-214.

Orphanides G, LeRoy G, Chang CH, Luse DS, Reinberg D. 1998. FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes. Cell 92:105-116.

P

Papoulas O, Beek SJ, Moseley SL, McCallum CM, Sarte M, Shearn A, Tamkun JW. 1998. The Drosophila trithorax group proteins BRM, ASH1 and ASH2 are subunits of distinct protein complexes. Development 125:3955-3966.

Papoulas O, Daubresse G, Armstrong JA, Jin J, Scott MP, Tamkun JW. 2001. The HMG-domain protein BAP111 is important for the function of the BRM chromatin-remodeling complex in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 98:5728-5733.

Papp B, Müller J. 2006. Histone trimethylation and the maintenance of transcriptional ON and OFF states by trxG and PcG proteins. Genes Dev 20:2041-2054.

Paro R. 1990. Imprinting a determined state into the chromatin of Drosophila. Trends Genet 6:416-421.

Paro R, Hogness DS. 1991. The Polycomb protein shares a homologous domain with a heterochromatin-associated protein of Drosophila. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 88:263-267.

Passarge E. 1979. Emil Heitz and the concept of heterochromatin: longitudinal chromosome differentiation was recognized fifty years ago. Am. J. Hum. Genet 31:106-115.

Pattatucci AM, Otteson DC, Kaufman TC. 1991. A functional and structural analysis of the Sex combs reduced locus of Drosophila melanogaster. Genetics 129:423-441.

Pelegri F, Lehmann R. 1994. A role of polycomb group genes in the regulation of gap gene expression in Drosophila. Genetics 136:1341-1353.

Petruk S, Sedkov Y, Smith S, Tillib S, Kraevski V, Nakamura T, Canaani E, Croce CM, Mazo A. 2001. Trithorax and dCBP acting in a complex to maintain expression of a homeotic gene. Science 294:1331-1334.

Petruk S, Sedkov Y, Brock HW, Mazo A. 2007. A model for initiation of mosaic HOX gene expression patterns by non-coding RNAs in early embryos. RNA Biol 4:1-6.

Petruk S, Sedkov Y, Riley KM, Hodgson J, Schweisguth F, Hirose S, Jaynes JB, Brock HW, Mazo A. 2006. Transcription of bxd noncoding RNAs promoted by trithorax represses Ubx in cis by transcriptional interference. Cell 127:1209-1221.

Petruk S, Smith ST, Sedkov Y, Mazo A. 2008. Association of trxG and PcG proteins with the bxd maintenance element depends on transcriptional activity. Development 135:2383-2390.

Phillips MD, Shearn A. 1990. Mutations in polycombeotic, a Drosophila polycomb-group gene, cause a wide range of maternal and zygotic phenotypes. Genetics 125:91-101.

Pien S, Grossniklaus U. 2007. Polycomb group and trithorax group proteins in Arabidopsis. Biochim. Biophys. Acta 1769:375-382.

Platero JS, Hartnett T, Eissenberg JC. 1995. Functional analysis of the chromo domain of HP1. EMBO J 14:3977-3986.

Poux S, McCabe D, Pirrotta V. 2001a. Recruitment of components of Polycomb Group chromatin complexes in Drosophila. Development 128:75-85.

Poux S, Melfi R, Pirrotta V. 2001b. Establishment of Polycomb silencing requires a transient interaction between PC and ESC. Genes Dev 15:2509-2514.

Poux S, Horard B, Sigrist CJA, Pirrotta V. 2002. The Drosophila trithorax protein is a coactivator required to prevent re-establishment of polycomb silencing. Development 129:2483-2493.

Q

Qi D, Jin H, Lilja T, Mannervik M. 2006. Drosophila Reptin and other TIP60 complex components promote generation of silent chromatin. Genetics 174:241-251.

R

Ragab A, Thompson EC, Travers AA. 2006. High mobility group proteins HMGD and HMGZ interact genetically with the Brahma chromatin remodeling complex in Drosophila. Genetics 172:1069-1078.

Randsholt NB, Maschat F, Santamaria P. 2000. polyhomeotic controls engrailed expression and the hedgehog signaling pathway in imaginal discs. Mech. Dev 95:89-99.

Rank G, Prestel M, Paro R. 2002. Transcription through intergenic chromosomal memory elements of the Drosophila bithorax complex correlates with an epigenetic switch. Mol. Cell. Biol 22:8026-8034.

Rappailles, A, L. Landemarre, D. Locker, M. Decoville. 2002. DSP1 is part of a new large multiprotein complex. Dros. Inf. Serv. 85:7-8.

Rappailles A. 2005. IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION DES CIBLES DE DSP1 CHEZ DROSOPHILA MELANOGASTER.

Rappailles A, Decoville M, Locker D. 2005. DSP1, a Drosophila HMG protein, is involved in spatiotemporal expression of the homoeotic gene Sex combs reduced. Biol. Cell 97:779-785.

Rastelli L, Chan CS, Pirrotta V. 1993. Related chromosome binding sites for zeste, suppressors of zeste and Polycomb group proteins in Drosophila and their dependence on Enhancer of zeste function. EMBO J 12:1513-1522.

Rath U, Wang D, Ding Y, Xu Y, Qi H, Blacketer MJ, Girton J, Johansen J, Johansen KM. 2004. Chromator, a novel and essential chromodomain protein interacts directly with the putative spindle matrix protein skeletor. J. Cell. Biochem 93:1033-1047.

Read CM, Cary PD, Crane-Robinson C, Driscoll PC, Norman DG. 1993. Solution structure of a DNA-binding domain from HMG1. Nucleic Acids Res 21:3427-3436.

van Rij RP, Berezikov E. 2009. Small RNAs and the control of transposons and viruses in Drosophila. Trends Microbiol 17:163-171.

Ringrose L, Ehret H, Paro R. 2004. Distinct contributions of histone H3 lysine 9 and 27 methylation to locus-specific stability of polycomb complexes. Mol. Cell 16:641-653.

Ringrose L, Paro R. 2007. Polycomb/Trithorax response elements and epigenetic memory of cell identity. Development 134:223-232.

Ringrose L, Rehmsmeier M, Dura J, Paro R. 2003. Genome-wide prediction of Polycomb/Trithorax response elements in Drosophila melanogaster. Dev. Cell 5:759-771.

Roguev A, Schaft D, Shevchenko A, Pijnappel WW, Wilm M, Aasland R, Stewart AF. 2001. The Saccharomyces cerevisiae Set1 complex includes an Ash2 homologue and methylates histone 3 lysine 4. EMBO J 20:7137-7148.

Rossow KL, Janknecht R. 2003. Synergism between p68 RNA helicase and the transcriptional coactivators CBP and p300. Oncogene 22:151-156.

Roth SY, Denu JM, Allis CD. 2001. Histone acetyltransferases. Annu. Rev. Biochem 70:81-120.

Ruhf ML, Braun A, Papoulas O, Tamkun JW, Randsholt N, Meister M. 2001. The domino gene of Drosophila encodes novel members of the SWI2/SNF2 family of DNA-dependent ATPases, which contribute to the silencing of homeotic genes. Development 128:1429-1441.

S

Sahu D, Debnath P, Takayama Y, Iwahara J. 2008. Redox properties of the A-domain of the HMGB1 protein. FEBS Lett 582:3973-3978.

Salvaing J, Decoville M, Mouchel-Vielh E, Bussière M, Daulny A, Boldyreva L, Zhimulev I, Locker D, Peronnet F. 2006. Corto and DSP1 interact and bind to a maintenance element of the Scr Hox gene: understanding the role of Enhancers of trithorax and Polycomb. BMC Biol 4:9.

Salvaing J, Lopez A, Boivin A, Deutsch JS, Peronnet F. 2003. The Drosophila Corto protein interacts with Polycomb-group proteins and the GAGA factor. Nucleic Acids Res 31:2873-2882.

Sanchez-Elsner T, Gou D, Kremmer E, Sauer F. 2006. Noncoding RNAs of trithorax response elements recruit Drosophila Ash1 to Ultrabithorax. Science 311:1118-1123.

Sánchez-Herrero E. 1991. Control of the expression of the bithorax complex genes abdominal-A and abdominal-B by cis-regulatory regions in Drosophila embryos. Development 111:437-449.

Sánchez-Herrero E, Akam M. 1989. Spatially ordered transcription of regulatory DNA in the bithorax complex of Drosophila. Development 107:321-329.

Santamaría P, Randsholt NB. 1995. Characterization of a region of the X chromosome of Drosophila including multi sex combs (mxc), a Polycomb group gene which also functions as a tumour suppressor. Mol. Gen. Genet 246:282-290.

Satijn DP, Hamer KM, den Blaauwen J, Otte AP. 2001. The polycomb group protein EED interacts with YY1, and both proteins induce neural tissue in Xenopus embryos. Mol. Cell. Biol 21:1360-1369.

Sato T, Russell MA, Denell RE. 1983. Homoeosis in Drosophila: A New Enhancer of Polycomb and Related Homoeotic Mutations. Genetics 105:357-370.

Saurin AJ, Shao Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Kingston RE. 2001. A Drosophila Polycomb group complex includes Zeste and dTAFII proteins. Nature 412:655-660.

Savla U, Benes J, Zhang J, Jones RS. 2008. Recruitment of Drosophila Polycomb-group proteins by Polycomblike, a component of a novel protein complex in larvae. Development 135:813-817.

Schmitt S, Prestel M, Paro R. 2005. Intergenic transcription through a polycomb group response element counteracts silencing. Genes Dev 19:697-708.

Schmucker D, Jäckle H, Gaul U. 1997. Genetic analysis of the larval optic nerve projection in Drosophila. Development 124:937-948.

Schneider R, Bannister AJ, Myers FA, Thorne AW, Crane-Robinson C, Kouzarides T. 2004. Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. Nat. Cell Biol 6:73-77.

Schuettengruber B, Chourrout D, Vervoort M, Leblanc B, Cavalli G. 2007. Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. Cell 128:735-745.

Schuettengruber B, Ganapathi M, Leblanc B, Portoso M, Jaschek R, Tolhuis B, van Lohuizen M, Tanay A, Cavalli G. 2009. Functional anatomy of polycomb and trithorax chromatin landscapes in Drosophila embryos. PLoS Biol 7:e13.

Schwartz YB, Kahn TG, Nix DA, Li X, Bourgon R, Biggin M, Pirrotta V. 2006. Genome-wide analysis of Polycomb targets in Drosophila melanogaster. Nat. Genet 38:700-705.

Schwartz YB, Pirrotta V. 2007. Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes. Nat. Rev. Genet 8:9-22.

Schwendemann A, Lehmann M. 2002. Pipsqueak and GAGA factor act in concert as partners at homeotic and many other loci. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 99:12883-12888.

Secombe J, Li L, Carlos L, Eisenman RN. 2007. The Trithorax group protein Lid is a trimethyl histone H3K4 demethylase required for dMyc-induced cell growth. Genes Dev 21:537-551.

Sedkov Y, Tillib S, Mizrokhi L, Mazo A. 1994. The bithorax complex is regulated by trithorax earlier during Drosophila embryogenesis than is the Antennapedia complex, correlating with a bithorax-like expression pattern of distinct early trithorax transcripts. Development 120:1907-1917.

Sengupta AK, Kuhrs A, Müller J. 2004. General transcriptional silencing by a Polycomb response element in Drosophila. Development 131:1959-1965.

Sessa L, Bianchi ME. 2007. The evolution of High Mobility Group Box (HMGB) chromatin proteins in multicellular animals. Gene 387:133-140.

Shannon MP, Kaufman TC, Shen MW, Judd BH. 1972. Lethality patterns and morphology of selected lethal and semi-lethal mutations in the zeste-white region of Drosophila melanogaster. Genetics 72:615-638.

Shanower GA, Muller M, Blanton JL, Honti V, Gyurkovics H, Schedl P. 2005. Characterization of the grappa gene, the Drosophila histone H3 lysine 79 methyltransferase. Genetics 169:173-184.

Shao Z, Raible F, Mollaaghababa R, Guyon JR, Wu CT, Bender W, Kingston RE. 1999. Stabilization of chromatin structure by PRC1, a Polycomb complex. Cell 98:37-46.

Shearn A. 1989. The ash-1, ash-2 and trithorax genes of Drosophila melanogaster are functionally related. Genetics 121:517-525.

Shimojima T, Okada M, Nakayama T, Ueda H, Okawa K, Iwamatsu A, Handa H, Hirose S. 2003. Drosophila FACT contributes to Hox gene expression through physical and functional interactions with GAGA factor. Genes Dev 17:1605-1616.

Simon J, Chiang A, Bender W. 1992. Ten different Polycomb group genes are required for spatial control of the abdA and AbdB homeotic products. Development 114:493-505.

Simon J, Chiang A, Bender W, Shimell MJ, O'Connor M. 1993. Elements of the Drosophila bithorax complex that mediate repression by Polycomb group products. Dev. Biol 158:131-144.

Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. Nature 346:240-244.

Sinclair DA, Milne TA, Hodgson JW, Shellard J, Salinas CA, Kyba M, Randazzo F, Brock HW. 1998. The Additional sex combs gene of Drosophila encodes a chromatin protein that binds to shared and unique Polycomb group sites on polytene chromosomes. Development 125:1207-1216.

Sinclair DAR, Syrzycka M, Macauley MS, Rastgardani T, Komljenovic I, Vocadlo DJ, Brock HW, Honda BM. 2009. Drosophila O-GlcNAc transferase (OGT) is encoded by the Polycomb group (PcG) gene, super sex combs (sxc). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 106:13427-13432.

Sing A, Pannell D, Karaiskakis A, Sturgeon K, Djabali M, Ellis J, Lipshitz HD, Cordes SP. 2009. A vertebrate Polycomb response element governs segmentation of the posterior hindbrain. Cell 138:885-897.

Slifer E. 1942. A mutant stock of Drosophila with extra sex-combs. 90:31-40.

Smith ER, Lee MG, Winter B, Droz NM, Eissenberg JC, Shiekhattar R, Shilatifard A. 2008. Drosophila UTX is a histone H3 Lys27 demethylase that colocalizes with the elongating form of RNA polymerase II. Mol. Cell. Biol 28:1041-1046.

Smith ST, Petruk S, Sedkov Y, Cho E, Tillib S, Canaani E, Mazo A. 2004. Modulation of heat shock gene expression by the TAC1 chromatin-modifying complex. Nat. Cell Biol 6:162-167.

Soullier S, Jay P, Poulat F, Vanacker JM, Berta P, Laudet V. 1999. Diversification pattern of the HMG and SOX family members during evolution. J. Mol. Evol 48:517-527.

Spradling AC, Stern D, Beaton A, Rhem EJ, Laverty T, Mozden N, Misra S, Rubin GM. 1999. The Berkeley Drosophila Genome Project gene disruption project: Single P-element insertions mutating 25% of vital Drosophila genes. Genetics 153:135-177.

Sreerama N, Woody RW. 2000. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. Anal. Biochem 287:252-260.

Srinivasan S, Dorighi KM, Tamkun JW. 2008. Drosophila Kismet regulates histone H3 lysine 27 methylation and early elongation by RNA polymerase II. PLoS Genet 4:e1000217.

Stott K, Tang GSF, Lee K, Thomas JO. 2006. Structure of a complex of tandem HMG boxes and DNA. J. Mol. Biol 360:90-104.

Stros M, Launholt D, Grasser KD. 2007. The HMG-box: a versatile protein domain occurring in a wide variety of DNA-binding proteins. Cell. Mol. Life Sci 64:2590-2606.

Struffi P, Arnosti DN. 2005. Functional interaction between the Drosophila knirps short range transcriptional repressor and RPD3 histone deacetylase. J. Biol. Chem 280:40757-40765.

Struhl G. 1981. A gene product required for correct initiation of segmental determination in Drosophila. Nature 293:36-41.

Struhl G, Akam M. 1985. Altered distributions of Ultrabithorax transcripts in extra sex combs mutant embryos of Drosophila. EMBO J 4:3259-3264.

Sun FL, Cuaycong MH, Elgin SC. 2001. Long-range nucleosome ordering is associated with gene silencing in Drosophila melanogaster pericentric heterochromatin. Mol. Cell. Biol 21:2867-2879.

Szakmary A, Huang SM, Chang DT, Beachy PA, Sander M. 1996. Overexpression of a Rrp1 transgene reduces the somatic mutation and recombination frequency induced by oxidative DNA damage in Drosophila melanogaster. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 93:1607-1612.

T

Tamkun JW, Deuring R, Scott MP, Kissinger M, Pattatucci AM, Kaufman TC, Kennison JA. 1992. brahma: a regulator of Drosophila homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. Cell 68:561-572.

Thomas JO, Travers AA. 2001. HMG1 and 2, and related 'architectural' DNA-binding proteins. Trends Biochem. Sci 26:167-174.

Tie F, Furuyama T, Prasad-Sinha J, Jane E, Harte PJ. 2001. The Drosophila Polycomb Group proteins ESC and E(Z) are present in a complex containing the histone-binding protein p55 and the histone deacetylase RPD3. Development 128:275-286.

Tie F, Banerjee R, Stratton CA, Prasad-Sinha J, Stepanik V, Zlobin A, Diaz MO, Scacheri PC, Harte PJ. 2009. CBP-mediated acetylation of histone H3 lysine 27 antagonizes Drosophila Polycomb silencing. Development 136:3131-3141.

Tie F, Prasad-Sinha J, Birve A, Rasmuson-Lestander A, Harte PJ. 2003. A 1-megadalton ESC/E(Z) complex from Drosophila that contains polycomblike and RPD3. Mol. Cell. Biol 23:3352-3362.

Tie F, Stratton CA, Kurzhals RL, Harte PJ. 2007. The N terminus of Drosophila ESC binds directly to histone H3 and is required for E(Z)-dependent trimethylation of H3 lysine 27. Mol. Cell. Biol 27:2014-2026.

Tillib S, Petruk S, Sedkov Y, Kuzin A, Fujioka M, Goto T, Mazo A. 1999. Trithorax- and Polycomb-group response elements within an Ultrabithorax transcription maintenance unit consist of closely situated but separable sequences. Mol. Cell. Biol 19:5189-5202.

Tolhuis B, de Wit E, Muijrers I, Teunissen H, Talhout W, van Steensel B, van Lohuizen M. 2006. Genome-wide profiling of PRC1 and PRC2 Polycomb chromatin binding in Drosophila melanogaster. Nat. Genet 38:694-699.

Tracey WD, Ning X, Klingler M, Kramer SG, Gergen JP. 2000. Quantitative analysis of gene function in the Drosophila embryo. Genetics 154:273-284.

Travers AA. 2003. Priming the nucleosome: a role for HMGB proteins? EMBO Rep 4:131-136.

Tripoulas N, LaJeunesse D, Gildea J, Shearn A. 1996. The Drosophila ash1 gene product, which is localized at specific sites on polytene chromosomes, contains a SET domain and a PHD finger. Genetics 143:913-928.

Tsukiyama T, Daniel C, Tamkun J, Wu C. 1995. ISWI, a member of the SWI2/SNF2 ATPase family, encodes the 140 kDa subunit of the nucleosome remodeling factor. Cell 83:1021-1026.

Tsukiyama T, Wu C. 1995. Purification and properties of an ATP-dependent nucleosome remodeling factor. Cell 83:1011-1020.

Tyler DM, Okamura K, Chung W, Hagen JW, Berezikov E, Hannon GJ, Lai EC. 2008. Functionally distinct regulatory RNAs generated by bidirectional transcription and processing of microRNA loci. Genes Dev 22:26-36.

V

Vazquez J, Müller M, Pirrotta V, Sedat JW. 2006. The Mcp element mediates stable long-range chromosome-chromosome interactions in Drosophila. Mol. Biol. Cell 17:2158-2165.

Vázquez M, Moore L, Kennison JA. 1999. The trithorax group gene osa encodes an ARID-domain protein that genetically interacts with the brahma chromatin-remodeling factor to regulate transcription. Development 126:733-742.

Verdel A, Vavasseur A, Le Gorrec M, Touat-Todeschini L. 2009. Common themes in siRNA-mediated epigenetic silencing pathways. Int. J. Dev. Biol 53:245-257.

W

Waltzer L, Bienz M. 1999. The control of beta-catenin and TCF during embryonic development and cancer. Cancer Metastasis Rev 18:231-246.

Wang H, Wang L, Erdjument-Bromage H, Vidal M, Tempst P, Jones RS, Zhang Y. 2004a. Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. Nature 431:873-878.

Wang L, Brown JL, Cao R, Zhang Y, Kassis JA, Jones RS. 2004b. Hierarchical recruitment of polycomb group silencing complexes. Mol. Cell 14:637-646.

Wang L, Jahren N, Vargas ML, Andersen EF, Benes J, Zhang J, Miller EL, Jones RS, Simon JA. 2006. Alternative ESC and ESC-like subunits of a polycomb group histone methyltransferase complex are differentially deployed during Drosophila development. Mol. Cell. Biol 26:2637-2647.

Wang Y, Brock HW. 2003. Polyhomeotic stably associates with molecular chaperones Hsc4 and Droj2 in Drosophila Kc1 cells. Dev. Biol 262:350-360.

Weir HM, Kraulis PJ, Hill CS, Raine AR, Laue ED, Thomas JO. 1993. Structure of the HMG box motif in the B-domain of HMG1. EMBO J 12:1311-1319.

Whitcomb SJ, Basu A, Allis CD, Bernstein E. 2007. Polycomb Group proteins: an evolutionary perspective. Trends Genet 23:494-502.

White RAH, Wilcox M. 1985a. Distribution of Ultrabithorax proteins in Drosophila. EMBO J 4:2035-2043.

White RAH, Wilcox M. 1985b. Regulation of the distribution of Ultrabithorax proteins in Drosophila. Nature 318:563-567.

Wilkinson FH, Park K, Atchison ML. 2006. Polycomb recruitment to DNA in vivo by the YY1 REPO domain. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 103:19296-19301.

Wilson BJ, Bates GJ, Nicol SM, Gregory DJ, Perkins ND, Fuller-Pace FV. 2004. The p68 and p72 DEAD box RNA helicases interact with HDAC1 and repress transcription in a promoter-specific manner. BMC Mol. Biol 5:11.

Wolpert L. 1999. Biologie du développement : Les Grands Principes. Dunod.

Wu S, Trievel RC, Rice JC. 2007. Human SFMBT is a transcriptional repressor protein that selectively binds the N-terminal tail of histone H3. FEBS Lett 581:3289-3296.

Wysocka J, Swigut T, Xiao H, Milne TA, Kwon SY, Landry J, Kauer M, Tackett AJ, Chait BT, Badenhorst P, Wu C, Allis CD. 2006. A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. Nature 442:86-90.

X

Xiao H, Sandaltzopoulos R, Wang HM, Hamiche A, Ranallo R, Lee KM, Fu D, Wu C. 2001. Dual functions of largest NURF subunit NURF301 in nucleosome sliding and transcription factor interactions. Mol. Cell 8:531-543.

Y

Yamamoto Y, Girard F, Bello B, Affolter M, Gehring WJ. 1997. The cramped gene of Drosophila is a member of the Polycomb-group, and interacts with mus209, the gene encoding Proliferating Cell Nuclear Antigen. Development 124:3385-3394.

Z

Zaffran S, Chartier A, Gallant P, Astier M, Arquier N, Doherty D, Gratecos D, Sémériva M. 1998. A Drosophila RNA helicase gene, pitchoune, is required for cell growth and proliferation and is a potential target of d-Myc. Development 125:3571-3584.

Zamudio NM, Chong S, O'Bryan MK. 2008. Epigenetic regulation in male germ cells. Reproduction 136:131-146.

Zhao J, Sun BK, Erwin JA, Song J, Lee JT. 2008. Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome. Science 322:750-756.

Zink B, Engström Y, Gehring WJ, Paro R. 1991. Direct interaction of the Polycomb protein with Antennapedia regulatory sequences in polytene chromosomes of Drosophila melanogaster. EMBO J 10:153-162.

Zink B, Paro R. 1989. In vivo binding pattern of a trans-regulator of homoeotic genes in Drosophila melanogaster. Nature 337:468-471.

Zink D, Paro R. 1995. Drosophila Polycomb-group regulated chromatin inhibits the accessibility of a trans-activator to its target DNA. EMBO J 14:5660-5671.

Zraly CB, Marenda DR, Nanchal R, Cavalli G, Muchardt C, Dingwall AK. 2003. SNR1 is an essential subunit in a subset of Drosophila brm complexes, targeting specific functions during development. Dev. Biol 253:291-308.

Olivier LAMIABLE

Identification et caractérisation des partenaires protéiques de DSP1 chez *Drosophila melanogaster*

Chez les eucaryotes pluricellulaires, la différenciation des cellules repose en partie sur l'activation ou la répression des gènes. Les profils d'expression génique mis en place vont perdurer d'une génération cellulaire à l'autre. Ce phénomène met en jeu des mécanismes épigénétiques qui remodèlent localement la structure de la chromatine. Chez *Drosophila melanogaster*, les protéines des groupes Polycomb (PcG) et Trithorax (TrxG) participent au maintien du profil d'expression des gènes au cours du développement. Les protéines PcG maintiennent les gènes réprimés tandis que les protéines TrxG maintiennent les gènes activés. Une troisième classe de protéines nommée Enhancers of Trithorax and Polycomb (ETP) module l'activité des PcG et TrxG. Dorsal Switch Protein 1 (DSP1) est une protéine HMGB (High Mobility Group B) classée comme une ETP. Par tamisage moléculaire, nous avions montré que la protéine DSP1 était présente au sein de complexes de poids moléculaire de 100 kDa à 1 MDa. Le travail de thèse présenté ici a pour but d'identifier les partenaires de la protéine DSP1 dans l'embryon et de mieux connaître les propriétés biochimiques de DSP1. Premièrement, j'ai mis en place puis effectué l'immunopurification des complexes contenant DSP1 dans des extraits protéiques embryonnaires. Cette approche nous a permis d'identifier 23 partenaires putatifs de la protéine DSP1. Parmi ces protéines, nous avons identifié la protéine Rm62 qui est une ARN hélicase à boîte DEAD. Les relations biologiques entre DSP1 et Rm62 ont été précisées. Deuxièmement, j'ai déterminé, par une approche biochimique, de nouvelles caractéristiques physico-chimiques de la protéine DSP1.

Mots clés : Drosophile, High Mobility Group, DSP1, complexe multiprotéique, Enhancers of Trithorax and Polycomb.

Identification and characterization of DSP1 protein partners in drosophila embryo.

In multicellular organism, the identity of cell is determined by several factors playing on genes expression. Once established, the gene expression pattern is transmitted to daughter cells through a process involving epigenetic mechanisms that locally reshape the structure of chromatin. In *Drosophila melanogaster*, the *Polycomb* (*PcG*) and *trithorax* (*trxG*) group genes are involved in the maintenance of gene expression profile during development. Inside multimeric complexes, PcG proteins maintain genes in repressed state whereas TrxG maintain genes active. A third class of proteins, called Enhancers of Trithorax and Polycomb, regulate PcG and TrxG activities. Dorsal Switch Protein 1 (DSP1) is a High Mobility Group B protein acting as an ETP. But DSP1 has not yet been identified in PcG or TrxG complexes. On the basis of gel filtration analysis of protein complexes in embryo nuclear extracts, it appears that the majority of DSP1 is present in complex(es) from 100 kDa to 1MDa. Aims of present work are the identification of DSP1 protein partners in drosophila embryo and the characterization of biochemical properties of DSP1. Firstly, I used immunopurification from drosophila embryonic nuclear extracts. The proteins purified with DSP1 were characterized through sequencing of peptides from individual protein bands by mass spectrometry. Among identified proteins, we focused on the DEAD Box RNA helicase, Rm62. The role of interaction between DSP1 and Rm62 has been characterized. Secondly, I have identified a new physicochemical aspect of DSP1 protein.

Keywords : Drosophila, High mobility Group, DSP1, protein complex, Enhancers of polycomb and trithorax.

CENTRE DE BIOPHYSIQUE MOLECULAIRE
CNRS
Rue Charles Sadron 45071 Cedex 2 Orléans