HAL open science

Cycline G, contrôle de la transcription et stabilité du développement

Delphine Dardalhon-Cuménal

To cite this version:

Delphine Dardalhon-Cuménal. Cycline G, contrôle de la transcription et stabilité du développement. Sciences du Vivant [q-bio]. UPMC Université pierre et Marie Curie Paris VI, 2015. Français. NNT : . tel-01537465

HAL Id: tel-01537465

https://hal.science/tel-01537465v1

Submitted on 12 Jun 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Pierre et Marie Curie

École doctorale : Complexité du vivant

IBPS - UMR7622 Laboratoire de Biologie du Développement UPMC CNRS

Contrôle Epigénétique de l'Homéostasie et de la Plasticité du Développement

Cycline G, contrôle de la transcription et stabilité du développement

Par Delphine DARDALHON-CUMÉNAL

Thèse de doctorat de Biologie Moléculaire et Cellulaire

Dirigée par Frédérique PERONNET

Présentée et soutenue publiquement le 30 septembre 2015

Devant un jury composé de :

Dr Martine DECOVILLE	Maître de Conférences	Rapporteur
Pr Alain ZIDER	Professeur	Rapporteur
Pr Joëlle SOBCZAK-THEPOT	Professeur	Examinateur
Dr Jean-Philippe PARVY	Maître de Conférences	Examinateur
Dr Frédérique PERONNET	Directrice de Recherche	Directrice de thèse

Except where otherwise noted, this work is licensed under
http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/

Au cours du développement, les cellules acquièrent progressivement leur identité en établissant des profils transcriptionnels spécifiques qui seront maintenus à travers les divisions cellulaires successives par des mécanismes dits épigénétiques. En dépit de nombreuses sources de variations de l'environnement, génétiques ou aléatoires, les organismes vivants présentent des phénotypes très stéréotypés. Cela suggère l'existence de processus de régulation assurant l'homéostasie du développement. Chez la drosophile, la protéine Cycline G jouerait un rôle dans la stabilité du développement, processus qui tamponne les variations aléatoires du développement. De plus, cette cycline est un régulateur trancriptionnel et interagit avec deux *Enhancers de Trithorax et Polycomb* (ETP) : ASX et Corto, impliqués dans l'activation et la répression de nombreux gènes. L'analyse du transcriptome des disques imaginaux d'ailes de larves de drosophile qui surpexpriment *CycG* nous a permis d'identifier ses cibles transcriptionnelles. Nous avons montré que le domaine d'interaction avec les ETP (ASX et Corto) de Cycline G pourrait être impliqué dans la stabilité du développement. Nos résultats suggèrent qu'une interaction fonctionnelle entre Cycline G et deux complexes Polycomb répresseurs (PR-DUB et PRC1), contrôlerait l'expression de gènes importants pour la stabilité du développement. Par ailleurs, l'interaction fonctionnelle entre des facteurs d'épissage et Cycline G serait également impliquée dans la stabilité du développement. Nos résultats suggèrent que la dérégulation de *CycG* induirait une augmentation du bruit transcriptionnel, ayant des répercussions sur la stabilité du développement.

Mots clés : Epigénétique, Stabilité du Développement, Cycline G, Transcription, Epissage, Polycomb.

Cyclin G, Transcriptional Control and Developmental Stability

During development, cells progressively acquire their identity by establishing specific transcriptional profiles that will be maintained throughout successive cell divisions by epigenetic mechanisms. Despite numerous sources of developmental variability - whether environmental, genetic or stochastic, living organisms exhibit uncannily stereotyped phenotypes, suggesting the existence of regulation processes tending to developmental homeostasis. In *Drosophila*, Cyclin G could participate in developmental stability, which buffers stochastic developmental variation. Moreover, this cyclin is a transcriptional regulator and interacts with two *Enhancers of Trithorax and Polycomb* (ETP): ASX and Corto, both involved in transcriptional gene silencing and activation. By studying the transcriptome of *Drosophila* imaginal wing discs overexpressing *Cyclin G*, we have identified its transcriptional targets. We determined that the ETP-interacting domain of Cyclin G (which binds ASX and Corto) may be involved in developmental stability. Our results show that a functional interaction between Cyclin G and two Polycomb group complexes involved in transcriptional gene silencing (PR-DUB and PRC1), may control the expression of genes required for developmental stability. Additionally, Cycling G might participate in developmental stability through functional interactions with splicing factors. Altogether, our results suggest that Cyclin G deregulation may induce an increase in transcriptional noise, resulting in heightened developmental variation.

Key words: epigenetic, Developmental Stability, Cyclin G, Transcription, Splicing, Polycomb.

UMR 7622-CNRS-UPMC-IBPS, Laboratoire de Biologie du Développement, Equipe Contrôle Epigénétique de l'Homéostasie et de la plasticité du Développement. 9 quai Saint Bernard 75005 Paris France

Mots-clés

Épigénétique, Stabilité du développement, Cycline G, Transcription, Épissage, Polycomb

Keywords

Epigenetic, Developmental Stability, Cyclin G, Transcription, Splicing, Polycomb

Nom et adresse du laboratoire

UMR 7622-CNRS-UPMC-IBPS
Laboratoire de Biologie du développement

Équipe Contrôle Épigénétique de l'Homéostasie et de la Plasticité du Développement

9, Quai St Bernard
Bâtiment C, Boîte Courrier 24
75252 Paris cedex 05
France

TABLES DES MATIÈRES

Mots-clés **3**
Keywords **3**
Nom et adresse du laboratoire **3**
TABLES DES MATIÈRES **5**
INTRODUCTION **13**
Chapitre I – L'homéostasie du développement **15**
1. La canalisation 15
2. La stabilité du développement 15
3. L'asymétrie en biologie 16
3.1. L'asymétrie directionnelle 16
3.2. L'antisymétrie 16
3.3. L'AF 16
3.4. Bases génétiques de la stabilité du développement 18
Chapitre II - La chromatine et les mécanismes épigénétiques **27**
1. Epigénétique 27
1.1 Définition 27
1.2 Mémoire épigénétique 29
2. La chromatine 31
2.1 L'euchromatine et l'hétérochromatine 32
2.2 Structure de la chromatine et régulation de l'expression des gènes 32
2.2.1 Modifications post-traductionnelles des histones 32
2.2.2 Le code des histones 41
2.2.3 Les complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendants 41
2.2.4 Les variants d'histones 46
3. Les complexes Polycomb (Polycomb-group ou PcG) et Trithorax (Trithorax-group ou TrxG) 49
3.1 Les complexes Polycomb (PcG) 51
3.1.1 PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2) 51
3.1.2 PRC1 (Polycomb Repressive Complex 1) 51
3.1.3 PR-DUB (Polycomb Repressive Deubiquitinase) 53
3.1.4 PhoRC (Pho Repressive Complex) 53
3.2 Les complexes Trithorax (TrxG) 55
3.2.1 Le complexe Brahma (BRM) 55
3.2.2 Le complexe TAC1 (Trithorax Activating Complex 1) 55

3.2.3 Les complexes ASH1 et ASH2 55
3.2.4 Le complexe NURF (Nucleosome Remodeling Factor) 56
3.3 Les "Enhancers" de Trithorax et Polycomb (ETP) 56
3.4 Complexes PcG et TrxG et mémoire épigénétique 58
3.4.1 La mémoire épigénétique est médiée par des régions cis-régulatrices 58
3.4.2 Répression par les complexes PcG 58
3.4.3 Activation par les complexes TrxG 59
Chapitre III - La transcription et l'épissage des ARNm 61
1. La transcription : 61
1.1 L'ARN polymérase II 61
1.2 Le cycle de transcription 63
1.2.1 L'initiation 63
1.2.2 L'élongation 65
1.2.3 La terminaison 67
2. L'épissage 69
2.1 Mécanisme moléculaire de l'épissage 71
2.1.1 La réaction d'épissage 71
2.1.2 Le spliceosome 73
2.2 Régulation de l'épissage 75
2.2.1 Influence de la transcription sur l'épissage 77
2.2.2 Influence de la structure de la chromatine 78
2.2.3 Influence des modifications épigénétiques des histones 79
2.2.4 Influence d'ARN non codants 85
2.2.5 Influence d'autres protéines sur l'épissage 85
Chapitre IV – Cycline G 87
1. Les Cyclines G 87
1.1 Chez les vertébrés 87
1.1.1 Cycline G1 (CCNG1) 87
1.1.2 Cycline G2 (CCNG2) 88
1.2 Chez *Drosophila melanogaster* 89
1.2.1 Cycline G et le cycle cellulaire 89
1.2.2 Cycline G et la transcription 91
1.2.3 Cycline G et l'homéostasie de développement 92
1.3 Le contrôle de la transcription par les Cyclines 95
1.3.1 Cycline H/CDK7 95
1.3.2 Cycline T/CDK9 97
1.3.3 Cycline C /CDK8 97
1.3.4 La Cycline L 98
Chapitre V – Présentation du projet de thèse 99
RESULTATS 101

ARTICLE I **103**

Cycline G et l'entretien épigénétique de l'expression des gènes au cours du développement, chez la drosophile 105

ARTICLE II **107**

Cycline G et les complexes répresseurs Polycomb, PRC1 et PR-DUB, participent ensemble à la stabilité du développement 109

PARTIE III-Données complémentaires **151**

1. Le consortium DPIM 155

2. Méthodologie 157

2.1 Lignées et croisements 157

2.2 Morphométrie 157

3. Résultats 159

3.1 Effet de mutations perte de fonction pour des facteurs d'épissage sur l'AF de taille des ailes induite par *CycG*. 159

3.2 Effet de la surexpression de gènes d'épissage sur l'AF de taille des ailes. 161

3.3 Influence de mutants des sous-unités du complexe SWI/SNF sur l'AF induite par *CycG*. 163

..... 166

4. Discussion et perspectives 167

DISCUSSION **171**

1. Cycline G et le maintien de la mémoire épigénétique 173

2. Cycline G modulateur de l'activité des ETP et des facteurs d'épissage ? 175

3. Cycline G et la stabilité du développement 176

BIBLIOGRAPHIE **179**

Liste des abréviations

AF	Asymétrie Fluctuante
ANT-C	Antennapedia Complex
ARN Pol	ARN polymérase
Ash1	absent, small, or homeotic-1
bp	base pair
BRM	Brahma
BX-C	Bithorax complex
CB	Corps de Cajal
CBP/p300	CREB-binding protein
CDK	Cyclin-Dépendante Kinase
CENP-A	Centromeric Protein - A
CHD	Chromodomaine, Hélicase et DNA binding
ChIP	Chromatin Immuno Precipitation
COMPASS	Complex Proteins Associated with Set1
CPSF	Cleavage/Polyadenylation Specificity Factor
CTDC	Domaine C-terminal de la sous-unité RBP1 de l'ARN Pol II
CycG	Gène codant Cycline G
dRAF	Complexe Related dRing-Associated factors
DSIF	DRB (5,6-Dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole) Sensitivity Inducing Factor
DSP1	Dorsal Switch Protein 1
EJC	Exon Junction Complex
ESC	Extra Sex Combs
ESCL	Extra Sex Combs-Like
ETP	Enhancer de Trithorax et Polycomb
GAF	GAGA Associated Factor, aussi appelé GAGA
GOF	Gain of fonction
GST	Glutathione S-Transférase
GTF	General Transcription Factor
H2A.Bbd	H2A.Bar Body deleted
HAT	Histones Acétyl-Transférases
HDAC	Histones Dé-ACétylases
HDM	Histone Dé-Méthylases
HMT	Histones Méthyl-Transférases
HP1	Heterochromatin Protein 1
INO80	INOsitol requiring 80
ISWI	Imitation of SWItch
KAT	Lysines Acétyl-Transférases
KMT	Lysine Méthyl-Transférases
LOF	Lost of function
lncARN	Long ARN non codants
miARN	microARN
MPT	Modification Post-Traductionnelle
ncARN	ARN non codants
NELF	Negative ELongation Factor
NMD	Non-sense Mediated Decay
PC	Polycomb
PcG	Polycomb-group
PH	Polyhomeotic
PHO	Pleiohomeotic
PhoRC	Pleiohomeotic Repressive Complex

piARN	piwi associated RNA
PIC	Pre-Initiation Complex
PRC1	Polycomb Repressive Complex 1
PRC2	Polycomb Repressive Complex 2
PR-DUB	Polycomb Repressive DeUbiquitination
PRE	Polycomb Response Element
PRMT	Protéine Arginine Méthyl Transférases
PSC	Posterior Sex Combs
P-TEFb	Positive Transcription Elongation Factor b
SCM	Sex Comb on Middleg
siARN	small interfering RNA
snARN	small nucleolar RNA
snRNP	small nucleolar RiboNucleoProtein
SWI/SNF	mating type SWItch et Sucrose Non-Fermenting
TAF	TBP Associated Factors
TBP	TATA box Binding Protein
TFII	Facteurs de Transcription associés à l'ARN Polymérase II
TGS	Transcriptional Gene Silencing
TRX	Trithorax
TSS	Transcriptional Start Site
UAS	Upon Activating Sequence
UTR	UnTranslated Region

Avant-propos

Le développement des métazoaires est un processus complexe au cours duquel un ensemble d'étapes finement régulées s'enchaîne. Au cours du développement, les cellules se divisent et se différencient progressivement de manière coordonnée. Elles acquièrent leur identité en établissant des profils transcriptionnels spécifiques, ce qui aboutit à la mise en place des différents tissus et organes qui formeront l'organisme adulte. Les profils d'expression des gènes, une fois établis, sont maintenus grâce à des mécanismes qui reproduisent la conformation locale de la chromatine par des mécanismes dits épigénétiques. Ces mécanismes font intervenir des protéines comme les complexes chromatiniens répresseurs de la famille des Polycomb (PcG), activateurs de la famille des Trithorax (TrxG) et leurs co-facteurs, les Enhancers de Trithorax et Polycomb (ETP).

En dépit des nombreuses sources de variations environnementales, génétiques ou intrinsèques aux processus biologiques, les organismes présentent des phénotypes très stéréotypés, ce qui suggère l'existence de processus de régulation assurant l'homéostasie du développement. L'une des composantes de l'homéostasie du développement est la stabilité du développement qui tamponne les variations stochastiques (le bruit du développement). Chez les bilatériens, la stabilité du développement peut être mesurée en analysant la différence entre les côtés droit et gauche de chaque individu. Dans une population isogénique élevée dans un environnement standardisé, la variance de cette différence, encore appelée Asymétrie Fluctuante (AF), est une estimation du bruit du développement.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à une Cycline atypique, Cycline G de *Drosophila melanogaster*, qui est un régulateur transcriptionnel. La dérégulation et notamment la surexpression du gène codant Cycline G (*CycG*) induit une AF très élevée. Nous avons cherché d'une part, à identifier les cibles transcriptionnelles de Cycline G et d'autre part à étudier si l'AF élevée induite par Cycline G pouvait être liée à une dérégulation de ses cibles transcriptionnelles ou à une dérégulation de l'épissage.

INTRODUCTION

Waddington a proposé de diviser ces processus de régulation en deux sous-ensembles : la canalisation, qui tamponne les variations de l'environnement et les variations génétiques, et la stabilité de développement, qui tamponne le bruit de développement (Waddington, 1957).

1. La canalisation

Waddington a défini la canalisation comme l'ensemble des processus qui assurent la constance du phénotype en s'opposant aux variations génétiques et environnementales. Dans une population, la façon la plus simple d'évaluer la canalisation d'un caractère est de mesurer sa variation d'un individu à l'autre. Plus le caractère phénotypique étudié est canalisé, moins il varie entre individus (Waddington, 1942 ; revue : Debat *et al.,* 2000).

2. La stabilité du développement

La stabilité du développement est définie comme l'ensemble des processus qui permettent de produire un phénotype constant en dépit des variations aléatoires du développement (*i.e.* le bruit du développement) pour des conditions génétiques et d'environnement définies (Palmer et Strobeck, 1986). La stabilité du développement est plus difficile à estimer que la canalisation. Chez les organismes bilatériens, la variation, au sein d'une population, de la différence d'un trait bilatéral entre les deux côtés de chaque individu est un indicateur de l'instabilité de développement.

3. L'asymétrie en biologie

L'asymétrie liée à une perturbation de la stabilité du développement, qu'on appellera AF, ne doit pas être confondue avec d'autres types d'asymétrie, en particulier, l'asymétrie directionnelle et l'antisymétrie (figure 1).

3.1.L'asymétrie directionnelle

Chez un organisme à symétrie bilatérale, l'asymétrie directionnelle correspond au développement plus important d'un trait bilatéral d'un côté que de l'autre de l'organisme. Tous les individus d'une population ou d'une espèce ont le même type d'asymétrie. C'est par exemple le cas de l'enroulement de la coquille des gastéropodes, qui est le plus souvent dextre, mais est uniforme dans une espèce donnée. Statistiquement, l'asymétrie directionnelle se traduit par une distribution normale de la différence de taille d'un trait entre les deux côtés avec une moyenne différente de zéro (figure 1A).

3.2.L'antisymétrie

L'antisymétrie est propre aux traits bilatéraux plus développés d'un côté de l'organisme que de l'autre mais qui, dans une population, ont la même fréquence de développement à droite et à gauche. L'exemple le plus courant est celui des crabes violonistes mâles qui ont une pince beaucoup plus développée que l'autre. A l'échelle de la population, la distribution des différences entre la droite et la gauche est bimodale et centrée sur zéro (figure 1B).

3.3.L'AF

Le terme AF a été proposé par le biologiste allemand Wilhelm Ludwig en 1932. L'AF correspond aux variations aléatoires subtiles des caractères bilatéraux. Cette variation par rapport à la symétrie bilatérale exacte reflète les imperfections du développement de l'organisme. Chez les bilatériens, un caractère donné, mesurable (métrique) ou dénombrable (méristique), a rarement exactement les mêmes

caractéristiques des deux côtés d'un individu. Par exemple, la longueur des ailes gauche et droite chez *Drosophila melanogaster* n'est pas exactement la même. Statistiquement, dans une population, la différence de taille d'un trait bilatéral entre les côtés droit et gauche suit une distribution normale centrée sur zéro (figure 1C). La variance de cette distribution représente l'AF (figure 1C).

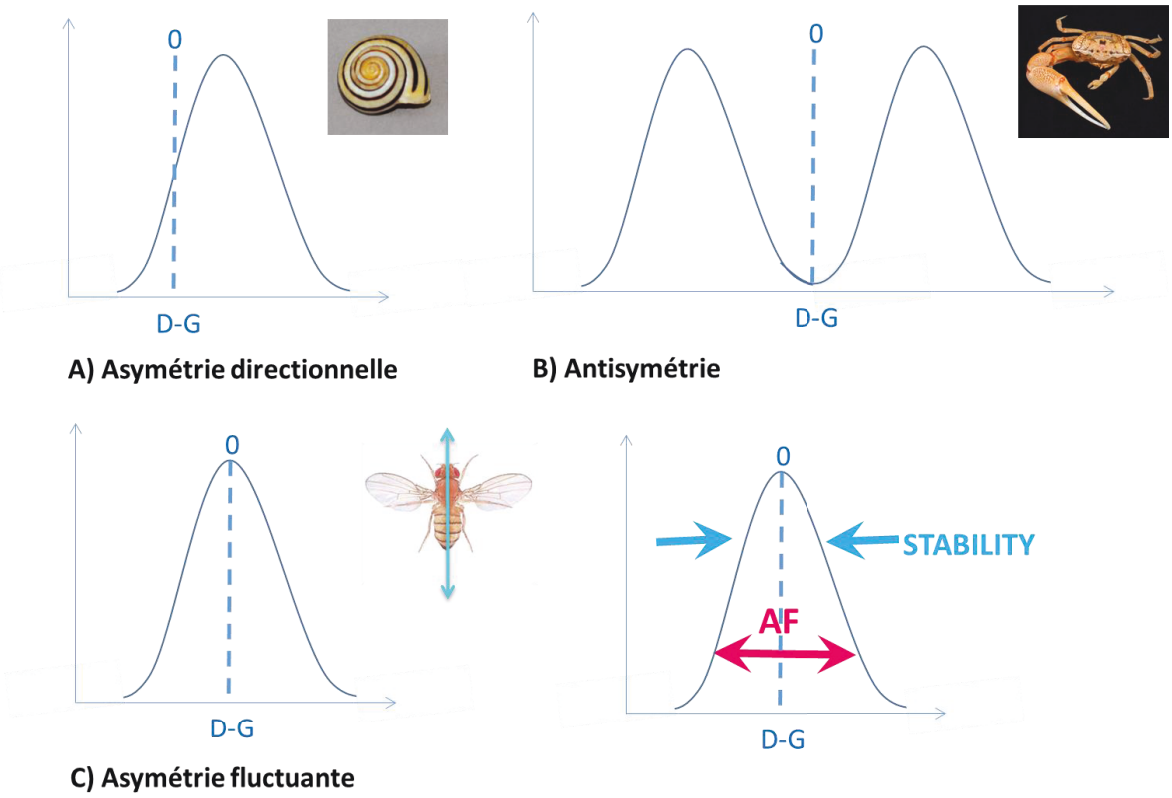

Figure 1 : L'asymétrie en biologie A) L'asymétrie directionnelle se traduit par une distribution normale de la différence de taille d'un trait entre les deux côtés avec une moyenne différente de zéro**. B) L'antisymétrie** se traduit par une distribution des différences entre la droite et la gauche est bimodale et centrée sur zéro. (C) **L'AF** se traduit par une distribution normale de la différence de taille d'un trait entre les deux côtés avec une moyenne centrée sur zéro. La variance de cette distribution représente l'AF.

3.4.Bases génétiques de la stabilité du développement

Les bases génétiques de la stabilité du développement sont mal connues. Des recherches de « Quantitative Trait Loci » chez la souris (analyse des dents, de la mandibule et du crâne) mettent en évidence une base génétique épistatique de l'AF (Leamy *et al.,* 2002 ; Leamy *et al.,* 2005 ; Burgio *et al.,* 2009). Deux études récentes ont identifié des régions génomiques impliquées dans la stabilité du développement chez la Drosophile (Breuker *et al.,* 2006 ; Takahashi *et al.,* 2011). Breuker et al. ont étudié 115 lignées isogéniques de drosophiles porteuses de délétions (issues de la collection Exelixis) (Breuker *et al.,* 2006). En appliquant la méthode de morphométrie géométrique à l'aile, ils ont montré que l'AF varie entre les génotypes, démontrant que la variabilité de taille et de forme de l'aile a une base génétique. Cependant, l'étude n'a pas été poussée jusqu'à identifier les gènes présents dans les déficiences qui modifient (augmentent ou suppriment) l'AF. Takahashi et al. ont également étudié des lignées isogéniques porteuses de délétions (issues de la collection DrosDel) (Ryder *et al.,* 2004). Ils ont analysé 435 souches recouvrant environ 65% du génome et ont ainsi identifié 89 déficiences qui affectent l'AF de forme de l'aile et 5 déficiences qui affectent l'AF des soies, alors qu'aucune déficience n'affecte l'AF de taille des ailes. De façon intéressante, certaines régions génomiques identifiées par Takahashi et ses collaborateurs contiennent un ou plusieurs gènes qui sembleraient être impliqués dans la morphogenèse de l'aile (tableau 1). En effet, ces régions comprennent 17 gènes spécifiquement exprimés dans le disque d'aile (tableau1) (Butler *et al.,* 2003) et 221 gènes dont l'expression varie au cours de la morphogenèse de l'aile (Ren *et al.,* 2005). Ces études ont permis d'identifier plusieurs régions génomiques ayant un effet sur l'AF de taille et de forme de l'aile soulignant la complexité du déterminisme génétique de la stabilité du développement.

Tableau 1 : Liste des lignées portant une déficience qui affecte l'Asymétrie fluctuante des ailes. (Takahashi *et al.*, 2011)

Chromosome	Deficient	No. of genes deleted	Butler et al. 2003	Ren et al. 2005	The Interactive Fly
2L	*Df(2L)ED3*	81		*Su(H), ZnT35C, CG42313*	*Cul-3*
	Df(2L)ED778	41		*Vha68-2*	*bun, kekl, nub, spict*
	Df(2L)ED780S	49		*Vhan68-2*	*bun, kekl, nub, spict*
	Df(2L)ED1196	65	*kon*	*ncm*, CG5783, CG10211, CG10283,CG10348, CG10383	
	Df(2L)ED1317	50	CG9338	*Fs(2)Ket*, CG9323, CG9336, CG3168	*ik2, vari*
	Df(2L)ED1454	2			
	Df(2L)ED2809	2		*galectin*	
	Df(2L)ED4651	84		*E23, NTPase, Mad, okr, pgant2*, CG3523, CG9663, CG17224, CG17261, CG17264	*Mad*
2R	*Df(2R)ED1735*	101	*Lcpl*, CG30359	*Cyp4el, Kermit, Obp44a, Pbp49*, CG2121, CG8693, CG8701, CG11198, CG17977,CG30372	*Opitx*
	Df(2R)ED2436	74		Flo, Gpo-1, Zasp52, CG8192, CG8249, CG12964, CG30080, CG34365	*Poxn*
	Df(2R)ED3610	89		elk, GstE5, GstE6, GstE9, IM2, Mapmoduln, Muc55B, CG14492, CG14500, CG18536	*fs, sbb*
	Df(2R)ED3683	126		*abba, edl,GstE5, GstE6, GstE9, IM2, slim, SP2637*, CG5224, CG5493, CG15080, CG15093, CG18536, CG18609	*sbb*
	Df(2R)ED3952	55	CG3624	wrapper, CG4610, CG6758, CG11275	Rtfl
	Df(2R)ED9045	57		*Cpr49Ah*	
3L	*Df(3L)ED207*	120	CG9192	*Cctl, LysX, LysS, mwh, nerfin-1, Klp61F, l(3)02640, Psa, Ptp61F, trio*, CG2469, CG9129, CG9134, CG9149, CG9184, CG12003, CG13907	emc, Racl, rho
	Df(3L)ED228	85	CG17549	CdGAPr, fon, lectin-37Da, msbll, Pax, CG10026, CG10237, CG10268, CG13081, CG13082, CG17349, CG17549, CG17567	brat
	Df(3L)ED230	51	CG11370	*Ddxl, laza*, CG11438, CG11370, CG11367, CG14448	
	Df(3L)ED4177	81		*nerfin-1, Reg-2, trio*, CG13894, CG13907	ban, emc, hipk
	Df(3L)ED4341	119	*ImpL2*	*Akh, dyl, Eip63F-1, Faa, ida, nab, NT1, Syx17, Tie, VhaM9.7-1*, CG1309, CG1311, CG1319, CG1136, CG7447, CG11353, CG14995, CG15005	nab, scrt, wit
	Df(3L)ED4421	82		*bol, Fhos, Hsp22, Hsp26, Hsp27, Hsp67Bc, PGRP-LA, PGRP-LC, UGP*, CG5026, CG5280	dally, Doc1
	Df(3L)ED4606	144	CG13044, CG13053	*Cpr72Ea, Dab, Lasp, nxf2*, CG4925, CG4998, CG9705, CG12272, CG13025, CG13031, CG13042, CG13050, CG13053, CG13056, CG13064, CG13065, CG13067, CG13071	Abl, argos
	Df(3L)ED4685	73	CG13023	Cpr73D, Fit2. TpnC73F, CG7724, CG11905, CG13027	tap
	Df(3L)ED4858	86		*in, Ir76b, NPFR76F, RhoBTB, polo*, CG7365	gig, Su(z)12
3R	*Df(3R)ED5100*	96		*Nep2, opa, rpk, Syt14*, CG1124, cg2016, CG12001, CG14636, CG14654, CG34357	
	Df(3R)ED5511	45		*Ugt86Da, CG17726, CG17721, CG31388*	Tctp
	Df(3R)ED5660	33		*Neu3, Rrp6, VhaPPA1-1, CG7530, CG14860*	
	Df(3R)ED5662	35		*Neu3, Rrp6, VhaPPA1-1, CG7530, CG14860*	
	Df(3R)ED5688	6		*Tm2, CG14866*	
	Df(3R)ED5807	85	*htl, sir,*	*PP2A-B', Vha 100-2*, CG7126, CG7988	*repo,14-3-2epsilon*
	Df(3R)ED5911	45		*Cyp12a4, dnk, endoA, gukh, gwl*, CG6026, CG14299	
	Df(3R)ED6058	24	*C15*	*CG15497, CG31176*	*E2f, InR*
	Df(3R)ED6103	45		*Rassf*, CG1387, CG17119, CG17121	*hh*
	Df(3R)ED10556	8		*VhaPPA1-1*	
	Df(3R)ED10556	25		*Rpb7, CG12241*	
	Df(3R)ED13102	44	*Obp99a*	*Bub3, Obp99a, Obp99c*, CG1969, CG7582, CG7593, CG7598, CG15506	*Dr*
X	*Df(1)ED6829*	60	*Grip*	*Spx, Tsp5D*, CG3726, CG3842, CG4666, CG5921, CG5928, CG15896	*sqh*

D'autres travaux suggèrent un rôle individuel de certains gènes sur l'AF, comme le gène *rbcl*, homologue de *Notch*, chez *Lucilia cuprina*. L'action de *Rbcl* sur l'AF a été mise en évidence dans le cadre d'une étude sur la résistance de la mouche *Lucilia cuprina* à l'insecticide Diazinon très utilisé entre 1958 et 1980. En 1980, plus de 90% des mouches présentaient le gène de résistance *Rop-1* au Diazinon. Les mouches résistantes à cet insecticide présentaient également une augmentation de l'asymétrie du nombre de soies sur la tête. Une étude visant à étudier le phénotype d'asymétrie lié à la présence du gène de résistance Rop-1 montre que le gène *rbcl* aurait été sélectionné spécifiquement à la même période. *Rbcl* modifierait l'AF en interagissant avec le gène *Rop1*. (Batterham *et al.,* 1996).

Des études réalisées chez *Drosophila melanogaster* et chez *Arabidopsis thaliana* suggèrent que des protéines chaperonnes, comme HSP90, tamponneraient les variations morphologiques (Rutherford et Lindquist, 1998 ; Queitch *et al.,* 2002). Le gène codant la protéine de choc thermique HSP90, *Hsp83*, a été testé pour ses effets sur l'AF des ailes chez *Drosophila melanogaster* (Debat *et al.,* 2006). L'analyse a été réalisée dans trois contextes expérimentaux différents :

1) en inhibant spécifiquement HSP90 avec la Geldanamycin (ajoutée au milieu),

2) en contexte mutant pour *Hsp83* (deux chromosome III porteurs de différents allèles mutants différents de *Hsp83* ont été introduits dans 9 fonds génétiques différents),

3) en introgressant une de ces mutations d'*Hsp83* dans ces mêmes 9 fonds génétiques (le reste du chromosome III est alors celui de chaque fond génétique).

Seule la 3ème expérience montre une augmentation significative de l'AF en contexte mutant pour *Hsp83*, et ceci, dans les 9 contextes génétiques testés, les auteurs concluent à une contribution de *Hsp83* à la stabilité du développement.

Chez la drosophile, trois gènes importants pour le contrôle de la croissance semblent également impliqués dans la stabilité du développement :

- Le gène pro-apoptotique *hid* est un acteur indispensable de la compétition cellulaire, un processus qui contribue à la croissance et à l'homéostasie des tissus (De la Cova *et al.,* 2004). La compétition cellulaire est activée lorsque deux cellules voisines ont des « fitness » différents. La cellule la plus « forte » ou cellule gagnante

enverrait un signal qui causerait la mort de sa voisine plus « faible » ou cellule perdante. Ce mécanisme fait intervenir différentes voies de signalisation comme les voies BMP (Bone Morphogenetic Protein), JNK (Jun kinase) et Hippo, ainsi que plusieurs facteurs comme le proto-oncogène Myc. Le gène *hid* est l'effecteur de la mort des cellules perdantes (De la Cova *et al.,* 2004). Les mutants *hid* (combinaison d'un allèle hypomorphe de *hid* et d'une petite déficience contenant les gènes pro-apoptotiques *hid*, *reaper* et *grim*) présentent une AF des ailes beaucoup plus élevée que les mouches sauvages. Ceci suggère qu'*hid* est impliqué dans la stabilité du développement (figure 2) (Neto *et al.,* 2009).

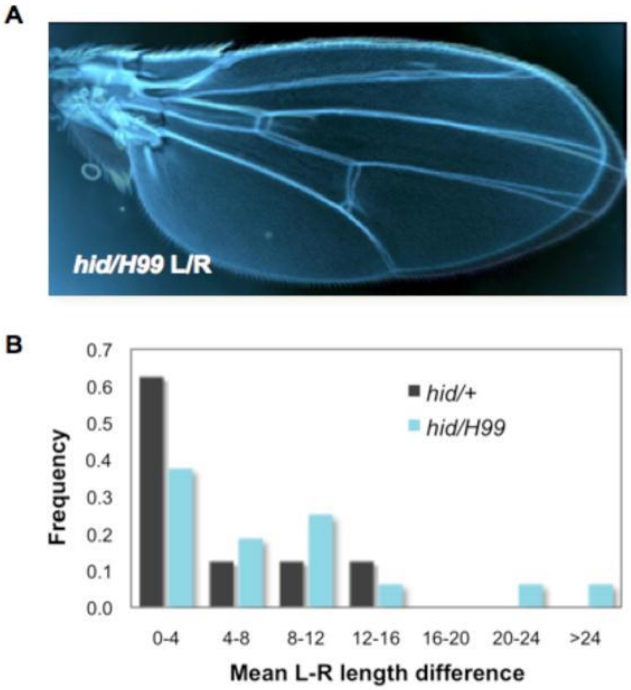

Figure 2 : *Hid* est nécessaire à la symétrie des ailes. A) comparaison des ailes gauche et droite de mutants combinant un allèle hypomorphe de *hid* et une petite déficience contenant les gènes pro-apoptotiques *hid*, *reaper* et *grim.* B) La fréquence de l'asymétrie des ailes augmente de manière significative chez les mutants *hid*. Le graphique représente la moyenne de la différence de taille entre les ailes gauche (L) et droite (R) des individus (adapté de Neto-silva *et al.,* 2009).

•Le gène *Dilp8* (*Drosophila Insulin-Like Peptide 8*) coordonne la croissance des tissus pendant le développement (figure 3A). Le gène *Dilp8* est exprimé dans les disques imaginaux d'ailes qui ont été blessés. Le peptide DILP8 est alors secrété dans l'hémolymphe (Garelli *et al.,* 2012 ; Colombani *et al.,* 2012). Ceci a pour effet de bloquer la synthèse d'ecdysone par la glande en anneau, et d'induire un retard de l'entrée en métamorphose. Ainsi, la croissance du disque blessé pourrait avoir lieu avant le début de la métamorphose. Des mutants *dilp8*^{MI00727} présentent une augmentation importante de l'AF suggérant que *Dilp8* joue un rôle important dans la stabilité du développement en coordonnant la croissance des organes (figure 3B) (Garelli *et al.,* 2012).

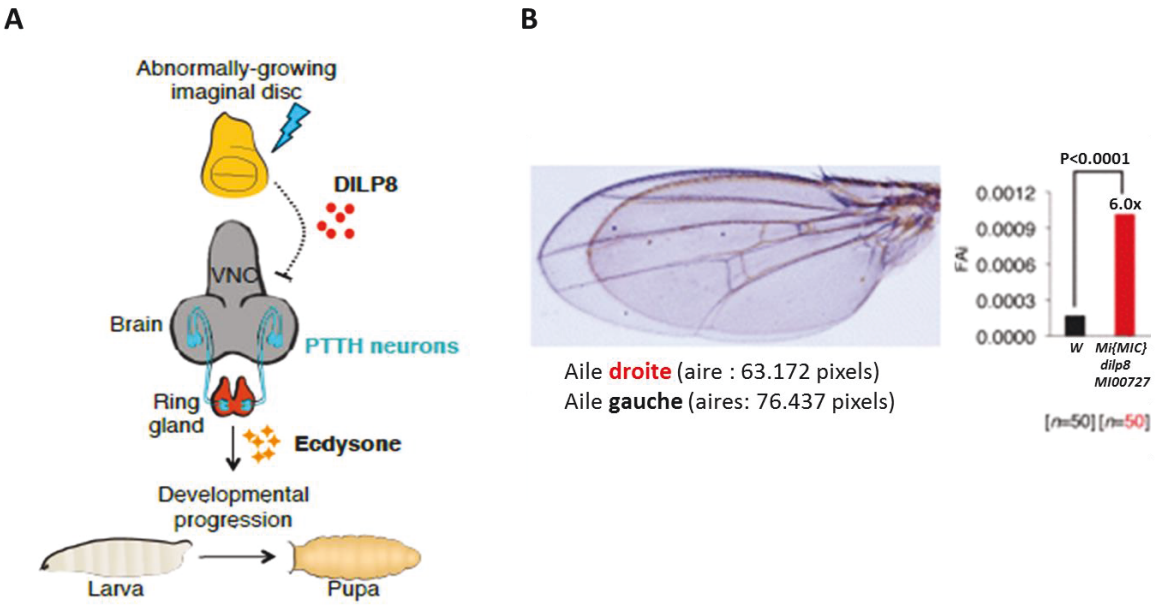

Figure 3 : DILP8 réduit les variations phénotypiques intra-individu. A) DILP8 coordonne la croissance des tissus pendant le développement. **B)** Comparaison des ailes droites et gauches de femelles mutant homozygote *dilp8*^{M100727}, Ce contexte génétique augmente fortement l'AF d'aire des ailes par rapport au témoin *w*. (adapté de Garelli *et al.,* 2012)

- Enfin, des travaux récents de notre laboratoire montrent que le gène *CycG* (codant la Cycline G) est également impliqué dans la stabilité du développement chez la drosophile (Debat *et al.,* 2011 ; Debat et Peronnet, 2013). En effet, la surexpression ubiquitaire de *CycG* dans une population de mouches isogéniques élevées dans un environnement standardisé induit une augmentation très forte de l'AF de taille et de forme des ailes (pouvant aller jusqu'à 40 fois). Une telle AF est sans précédent dans la littérature (figure 4) (Debat *et al.,* 2011 ; Debat et Peronnet, 2013).

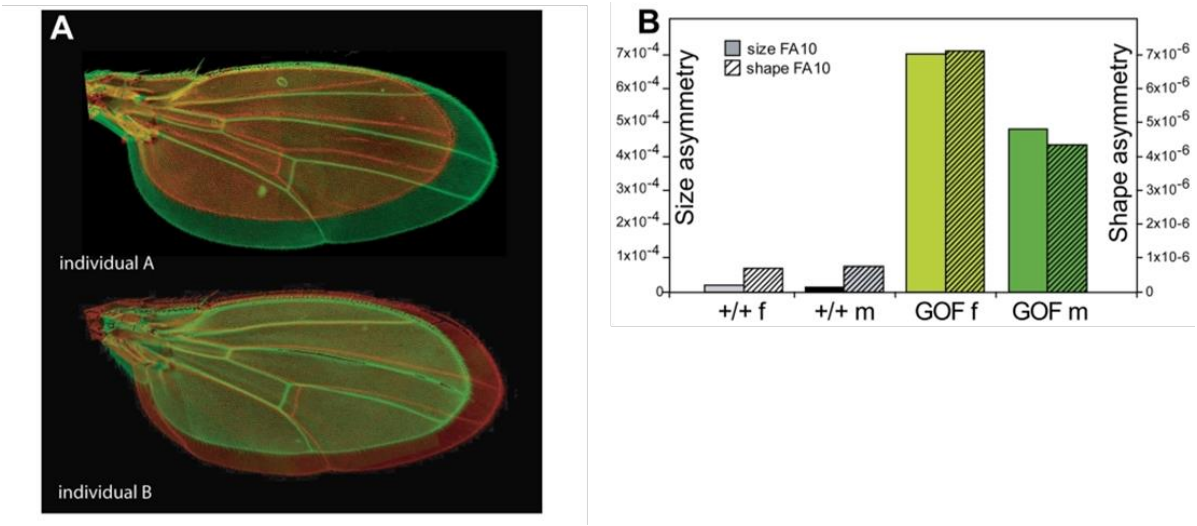

Figure 4 : Asymétrie Fluctuante élevée des ailes chez des drosophiles surexprimant *CycG*. A) superposition des ailes gauches (rouge) et droites (vert) de deux individus surexprimant *CycG* en fond génétique w^{118} sous le contrôle du driver *daughterless (da*). B) Effet de la surexpression de *CycG* sur l'asymétrie de taille de l'aile (barre vide) et sur l'asymétrie de forme des ailes (barre rayée).En gris sont représentés les femelles et les mâles +/+ ; en vert les femelles et les mâles surexprimant *CycG*. (adapté de Debat *et al.,* 2011)

Ce phénotype d'AF très élevée est associé à une perte de la compensation entre croissance et prolifération cellulaires (figure 5). Cependant, la taille des cellules semble être le paramètre qui varie le plus (figure 5). Par ailleurs, la surexpression de *CycG* induit une augmentation de l'asymétrie d'autres organes comme les fémurs ou les yeux. Néanmoins, il n'y a pas de corrélation entre l'asymétrie des ailes et celle des autres organes (par exemple, une mouche présentant une asymétrie des ailes n'aura pas forcément une asymétrie des fémurs), ce qui suggère que la dérégulation observée est stochastique. D'autre part, comme je le décrirai, *CycG* code un régulateur transcriptionnel, ce qui suggère qu'il contrôlerait l'expression d'un ensemble de gènes importants pour la stabilité du développement.

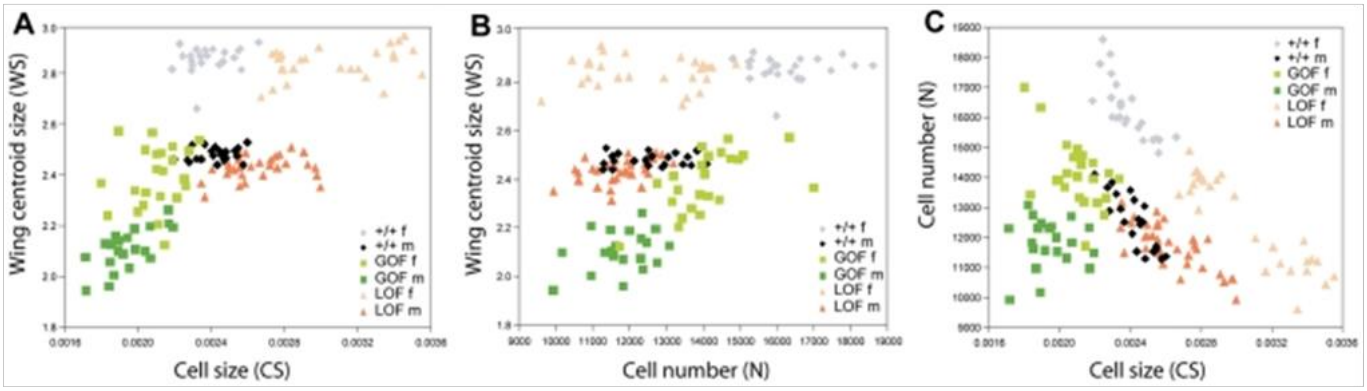

Figure 5 : Lien entre la taille des ailes, la taille des cellules et leur nombre. Les descendants des croisements entre des femelles *da::Gal4/+* et des mâles *UAS::CycG$^{\Delta PEST}$/+* (GOF *CycG*); des femelles *da::Gal4/+* et des mâles *UAS ::dsCycG2/+* (LOF *CycG*) dans le même fond génétique ont été analysés. Chaque point représente une aile. Taille des cellules (CS) vs. Taille des ailes (WS). B) Nombre de cellules (N) vs. Taille des ailes(WS). C) Taille des cellules (CS) vs. Nombre de cellules (N). En gris : les femelles +/+ ; en noir les mâles +/+ ; en vert clair les femelles surexprimant *CycG* ; en vert foncé les mâles surexprimant *CycG* ; en orange clair les femelles LOF *CycG* ; en orange foncé les mâles LOF *CycG* (Debat *et al.,* 2011).

Certains auteurs remettent en question l'existence même d'une base génétique pour la stabilité du développement. En effet, il a été démontré que les réseaux complexes sont intrinsèquement robustes aux perturbations (Houchmandzadeh *et al.,* 2002 ; Bergman et Siegal, 2003). S'appuyant sur ces travaux, il est proposé que l'architecture des réseaux génétiques sous-tendrait la stabilité du développement (Siegal et Bergman, 2002 ; Kerszberg, 2004). Néanmoins, cette hypothèse n'est pas incompatible avec le fait que certains gènes, comme *hid*, *dilp8*, ou *CycG* joueraient un rôle prédominant dans la stabilité du développement. En effet, ces gènes pourraient correspondre à des « hubs » dans les réseaux génétiques qui contrôlent le bruit du développement (Rutherford *et al.,* 2007 ; Jeong *et al.,* 2001 ; Levy et Siegal, 2008).

Chapitre II - La chromatine et les mécanismes épigénétiques

1. Epigénétique

1.1 Définition

C'est en 1942 que l'embryologiste et généticien Conrad H. Waddington propose le terme « épigénétique » en associant les mots « épigénèse » et « génétique ». Il s'inspire de la théorie selon laquelle un embryon se développe par différenciation progressive des organes. Souhaitant lier la génétique et l'embryologie, Waddington décrit l'épigénétique comme l'ensemble des mécanismes permettant à partir d'un génotype d'engendrer un phénotype. De nos jours, la définition la plus couramment admise est « l'étude des changements de l'expression des gènes, transmissibles pendant la mitose et/ou la méiose, n'impliquant aucune modification de la séquence nucléotidique de l'ADN » (Riggs *et al.,* 1996). L'hérédité est donc centrale. Comme le montre la figure 6, le paysage épigénétique de Waddington dépeint le contrôle épigénétique du développement (Waddington, 1957).

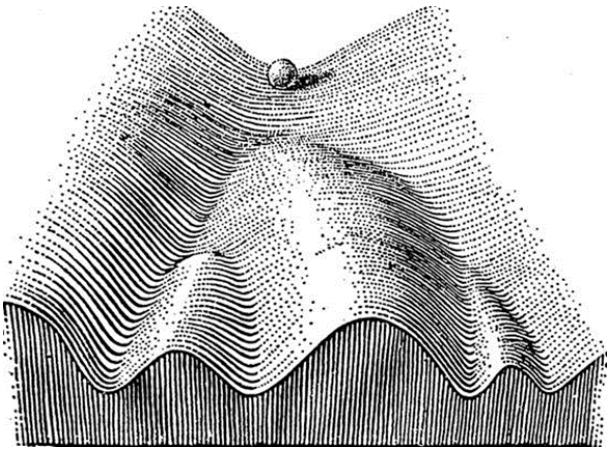

Figure 6 : Le paysage épigénétique – Le chemin suivi par une cellule pluripotente, représentée par une bille dans ce schéma, correspond à l'histoire de son développement. Le paysage épigénétique est constitué de creux et de bosses, sous-tendu par des gènes. Au cours de son parcours, la bille a le choix entre différentes voies, correspondant à l'engagement dans des processus de différenciation différents. Aucun retour en arrière n'est possible. A la fin de son parcours, la bille tombe dans un puits, correspondant au type cellulaire. Ainsi le paysage épigénétique canalise le développement. Adapté de C.H Waddington (1942).

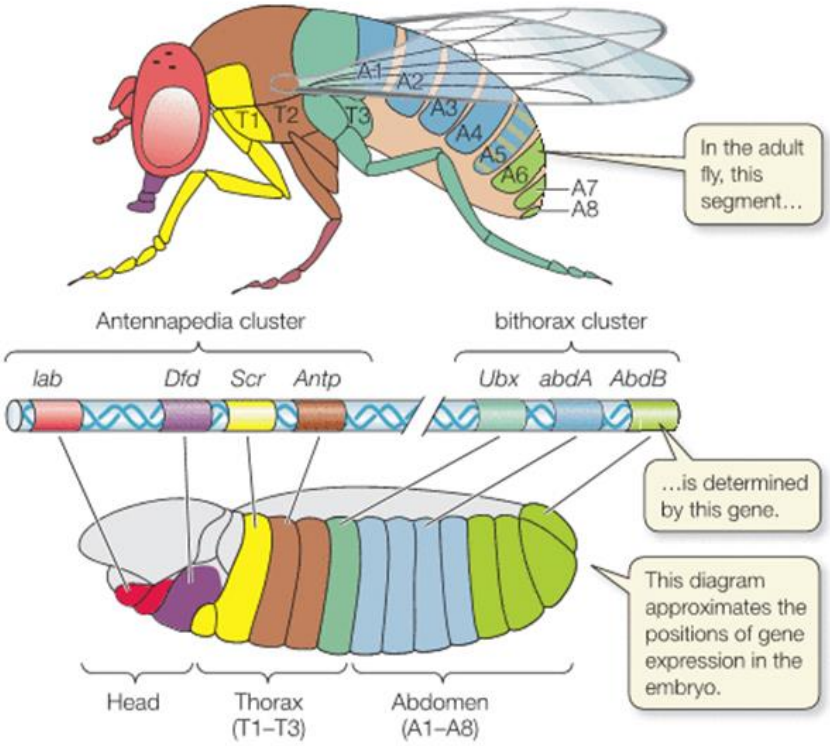

Figure 7 : Organisation des gènes homéotiques de *Drosophila melanogaster* en deux complexes et représentation schématique de leurs domaines d'expression le long de l'axe antéro-postérieur chez l'adulte et l'embryon. (adapté de Sadava *et al*., 2008).

1.2 Mémoire épigénétique

On appelle mémoire épigénétique, le maintien de l'état transcriptionnel des gènes au cours des mitoses et/ou des méioses en l'absence des facteurs inducteurs. La mémoire épigénétique a été mise en évidence chez *Drosophila melanogaster* lors de l'étude de la régulation de l'expression des gènes homéotiques. Les gènes homéotiques déterminent le plan d'organisation du corps selon l'axe antéro-postérieur. Chez la drosophile, les gènes homéotiques (gènes Hox) s'organisent en deux complexes Antennapedia (ANT-C) et Bithorax (BX-C) (McGinnis et Krumlauf, 1992). Comme le montre la figure 7 le complexe ANT-C contient cinq gènes (*lab, pb, Dfd, Scr* et *Antp*) responsables de l'identité de la tête et des deux premiers segments thoraciques. Le complexe BX-C est formé de trois gènes (*Ubx, Abd-A* et *Abd-B*) responsables de l'identité du 3ème segment thoracique et des segments abdominaux. L'expression des gènes le long de l'axe antéro-postérieur suit leur position le long du chromosome (règle de colinéarité). En général, une perte de fonction d'un de ces gènes entraîne la transformation d'un segment vers un segment plus antérieur. Inversement, un gain de fonction entraîne la transformation d'un segment vers un segment plus postérieur. Ces transformations sont dites homéotiques. Le profil d'expression des gènes Hox est initié par des facteurs de transcription précoces codés par les gènes de segmentation. L'expression de ces facteurs est transitoire et s'arrête après la gastrulation. Le profil d'expression (activé ou réprimé) des gènes homéotiques est maintenu au cours du développement, un mécanisme appelé mémoire épigénétique. Il fait intervenir les protéines Polycomb (PcG) et Trithorax (TrxG). Ces proteines PcG et TrxG forment des complexes qui se lient à la chromatine et maintiennent respectivement l'état réprimé ou activé des gènes.

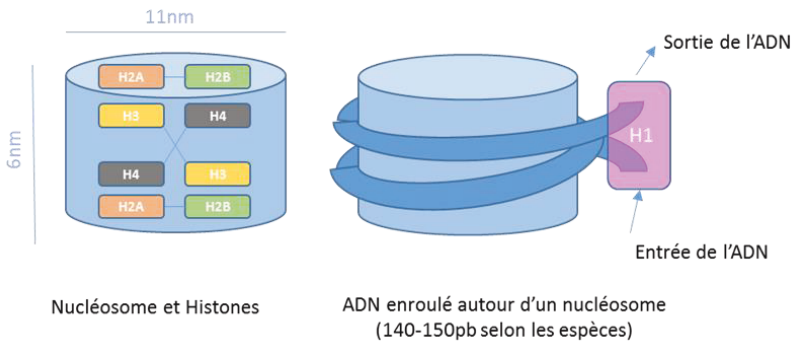

Figure 8 : Le nucléosome, unité de base de la chromatine. A gauche, le nucléosome est formé de deux copies de chacune des 4 histones (H2A, H2B, H3 et H4). A droite, l'ADN est enroulé autour de l'octamère d'histones, l'histone H1 se fixe à l'ADN entre deux nucléosomes. (Adapté de Passarge, 2008).

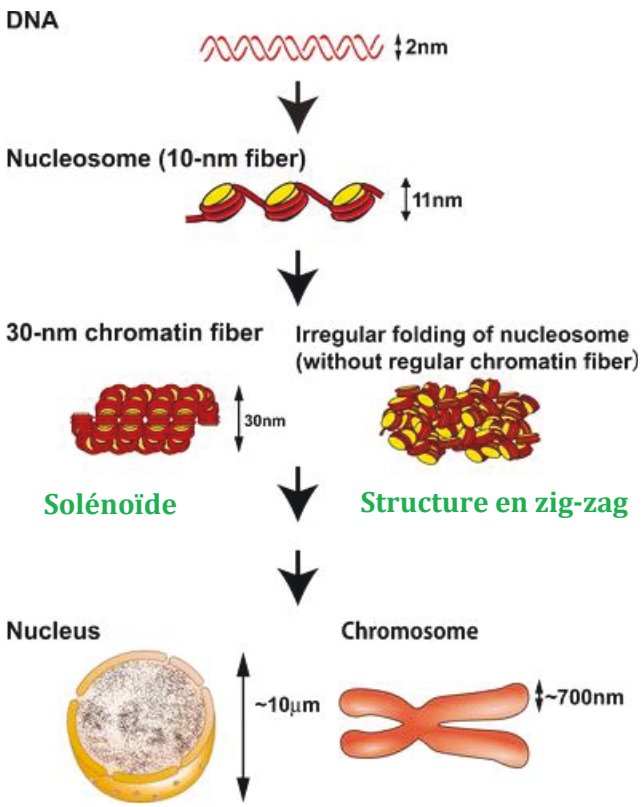

Figure 9 : Les différents niveaux de compaction de la chromatine. La double hélice d'ADN, d'un diamètre de ~2 nm, est enroulé autour d'un nucléosome formant une fibre d'un diamètre de 11 nm. L'histone H1 maintient l'ensemble. Le niveau de compaction supplémentaire forme la fibre de 30 nm (le solénoïde et la structure en zig-zag). La fibre de 30nm s'enroule sur elle-même jusqu'à la compaction maximale : le chromosome mitotique (Adapté de Maeshima *et al.,* 2014).

2. La chromatine

Chez les Eucaryotes, l'ADN est associé aux histones et l'ensemble forme la chromatine. La chromatine permet de compacter l'ADN dans les noyaux des cellules. Sa structure très dynamique est importante pour contrôler l'expression des gènes.

L'unité de base de la chromatine est le nucléosome, décrit pour la première fois par R.D. Kornberg en 1974 (Luger *et al.,* 1997). Un nucléosome est formé de deux hétérodimères d'histones H2A et H2B et deux hétérodimères d'histones H3 et H4, autour desquels l'ADN s'enroule 1,66 fois, soit environ 147 paires de bases (figure 8). L'ensemble est maintenu par l'histone de liaison H1. Cette structure, qui forme la fibre de 10 nm de diamètre, est souvent nommée collier de perles. Elle n'existe pas en tant que telle dans le noyau mais est repliée sur elle-même et forme la fibre de 30 nm de diamètre, le solénoïde, comme le montre la figure 9. Dans cette structure, les nucléosomes voisins sont repliés en une hélice dextre (Finch et Klug, 1976 ; Maeshima *et al.*, 2014). Plus tard, sur la base d'observations microscopiques, le laboratoire de Woodcock proposa un autre modèle en double hélice (figure 9). Dans ce modèle, les nucléosomes adjacents adoptent une structure en zig-zag (Woodcock *et al.,* 1984, Maeshima *et al.,* 2014). Chez l'homme, cette structure en zig-zag serait souvent trouvée à proximité des régions promotrices (Champ *et al.,* 2004 ; Ha *et al.,* 2005). L'espacement des nucléosomes est variable et ainsi la chromatine est plus ou moins compactée. L'étape ultime de compaction de la chromatine est le chromosome mitotique (figure 9) (Annuziato, 2008 ; Maeshima *et al.,* 2014). La dynamique de compaction de la chromatine est largement due à d'autres protéines non-histones qui se lient à celle-ci et forment des complexes appelés complexes de remodelage de la chromatine. On distingue, l'euchromatine plus ou moins compacte selon les régions, et l'hétérochromatine, très compacte (Bierne *et al.,* 2012).

2.1 L'euchromatine et l'hétérochromatine

C'est en 1928 que Emil Heitz observe pour la première fois que certaines parties des chromosomes restent épaissies et très colorées pendant l'interphase, alors que les chromosomes ne le sont normalement que pendant la mitose. Il nommera ces structures denses hétérochromatine. Par opposition, il appellera les zones moins fortement colorées euchromatine. Des études ont montré que ces deux types de chromatine possèdent des structures différentes.

L'euchromatine, moins dense, contient la plupart des gènes. Elle se trouve habituellement au centre du noyau. L'euchromatine condensée est parfois appelée hétérochromatine facultative (Gaspar-Maia *et al.,* 2011). Par contre, l'hétérochromatine, très compacte, est composée essentiellement de séquences répétées non codantes, de transposons, et ne contient que de rares gènes. Elle est généralement localisée à la périphérie des noyaux. L'hétérochromatine se trouve au niveau des centromères et des télomères et joue ainsi un rôle important dans le maintien de la structure du génome. L'hétérochromatine est également caractérisée par la présence de la protéine HP1 (James et Elgin, 1986).

2.2 Structure de la chromatine et régulation de l'expression des gènes

La compaction de la chromatine a un impact important sur l'ensemble des processus qui touchent l'ADN, tels que la transcription, la réplication ou la réparation. En particulier, cette structure très dynamique joue un rôle dans la régulation de l'expression des gènes. Les modifications post-traductionnelles des histones, les complexes de remodelage de la chromatine, les variants d'histones et les ARNs non codants participent à la modulation de l'état de la chromatine.

2.2.1 Modifications post-traductionnelles des histones

Les histones sont de petites molécules basiques très conservées formées d'un cœur globulaire hydrophobe et d'une extrémité amino-terminale comportant une

séquence peptidique hydrophile (queue des histones) (Graff et Mansury, 2008 ; Luger *et al.,* 1997). La queue des histones est le siège de nombreuses modifications post-traductionnelles (PTMs), elles-mêmes impliquées dans des interactions avec d'autres protéines et avec les nucléosomes voisins (Graff et Mansury, 2008) (figure 10). Le tableau 2 présente les différentes PTMs connues, les principales étant l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation et l'ubiquitination (figure 10) (Kouzarides, 2007 ; Suganuma et Workman, 2011, Graff et Mansury, 2008). Des travaux récents montrent que le cœur des histones peut également présenter des modifications (Tropberger et Schneider 2010).

Ces modifications covalentes de la chromatine ou marques épigénétiques sont réalisées par des enzymes souvent appelées « writers» comme les acétyl-transférases (HATs), les méthyl-transférases (HMTs), les kinases et les ubiquitine-ligases ou enlevées par des enzymes souvent nommées « erasers » comme les histones désacétylases (HDACs), les déméthylases (HDMs), les phosphatases ou les histones déubiquitinases (Zhou *et al.,* 2011).

Ces modifications affectent l'expression des gènes de deux façons :

D'une part, les acétylations et les phosphorylations altèrent directement la structure du nucléosome. Ces deux marques atténuent les interactions électrostatiques entre les histones basiques et l'ADN chargé négativement, pouvant ainsi induire la mobilité du nucléosome et faciliter l'accès de facteurs de transcription à l'ADN (Fenley *et al.,* 2010).

D'autre part, elles sont reconnues par des complexes de remodelage de la chromatine, des facteurs de transcription ou d'autres protéines régulatrices. Ces protéines sont souvent nommées des « readers» car elles reconnaissent des marques spécifiques et s'y fixent *via* des domaines particuliers. Par exemple, les bromodomaines reconnaissent les histones acétylées, et les chromodomaines reconnaissent les histones méthylées. Le chromodomaine de la proteine HP1, le constituant majeur de l'hétérochromatine, se fixe sur la lysine 9 de l'histone H3 di- ou tri-méthylée (H3K9me2/3) (Bannister *et al.,* 2001).

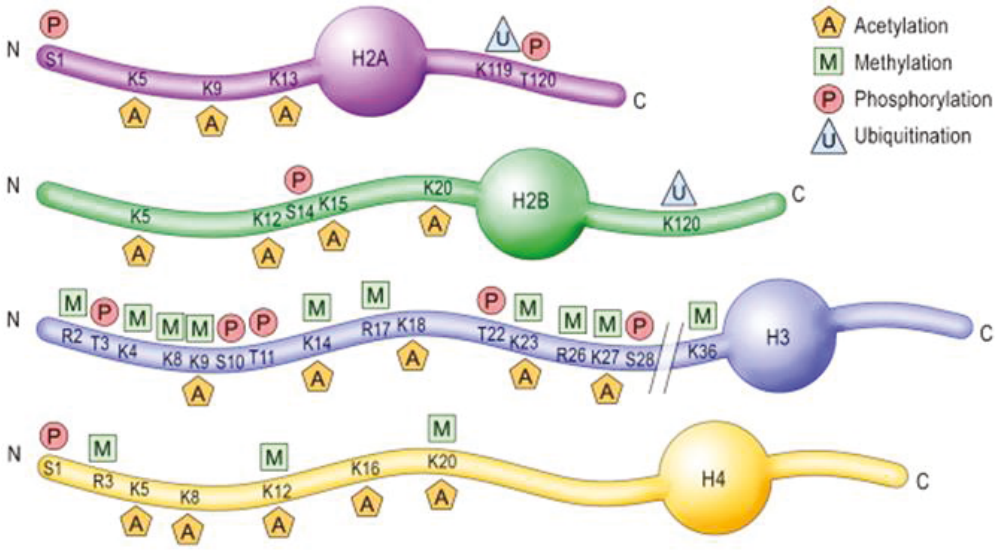

Figure 10 : Modifications post-traductionnelles des Histones.
Représentation schématique des parties N- et C-terminales des histones et des résidus spécifiques qui peuvent être modifiés (Adapé de Graff et Mansury, 2008).

Modifications de Chromatine	Résidus modifiés	Fonctions régulées
Acétylation	**K**-ac	Transcription, réparation, réplication, conder
Méthylation (lysines)	**K**-me1 **K**-me2 **K**-me3	Transcription, réparation
Méthylation (Arginines)	**R**-me1 **R**-me2a **R**-me2s	Transcription
Phosphorylation	**S**-ph **T**-ph	Transcription, réparation, condensation
Ubiquitylation	**K**-ub	Transcription, réparation
Sumoylation	**K**-su	Transcription
ADP ribosylation	**E**-ar	Transcription
Deimination	**R> Cit**	Transcription
Proleine Isomerization	**P-cis > P-trans**	Transcription

Tableau 2 : Différentes classes de modifications identifiées sur les histones

Les acétylations sont réalisées par des Histone Acétyl-Transférases (HAT). On les trouve sur les histones H2A, H3 et H4 (tableau 3) (Li *et al.,* 2007). Il existe trois grandes familles d'acétyl-transférases : GNAT, MYST et CBP/p300 (Sterne et Berger, 2000). Le premier membre de la famille de GNAT qui a été identifié est Gcn5, les protéines composant cette famille présentent des homologies de séquence, en particulier un domaine HAT et un bromodomaine (figure 12). Les protéines formant la famille MYST ont également des similarités de séquence. Elles possèdent un site de fixation de l'acétyl-CoA et un motif en doigts de zinc (C2HC) (figure12). Enfin, CBP et p300 sont souvent considérées comme une seule entité car elles sont structurellement et fonctionnellement similaires. P300/CBP ont quatre domaines d'interaction : un bromodomaine, un domaine HAT et deux domaines putatifs à doigt de zinc, ZZ et TAZ (figure 12). L'acétylation des histones permettrait de relâcher la chromatine en réduisant l'affinité entre les histones et l'ADN (Zhang et Pradhan, 2014). Ainsi, elle est associée à l'activation de la transcription (Marmorstein et Zhou, 2014). Les lysines acétylées sont reconnues par des protéines à bromodomaine. Elles joueraient un rôle dans l'initiation et l'élongation de la transcription. L'ajout d'un groupement acétyl sur les nucléosomes proches des sites d'initiation de la transcription permet la fixation d'autres facteurs sur les promoteurs (Hassan *et al.,* 2001).

L'acétylation est réversible, grâce à l'action d'histones désacétylases (HDAC). Les HDAC sont associées à des complexes réprimant la transcription (Sankar *et al.,* 2008, Wang *et al.,* 2009). Malgré une corrélation entre activation de la transcription et présence d'histones acétylés, ce n'est pas le niveau d'acétylation qui influencerait directement le taux de transcription mais plutôt l'équilibre entre acétylation et désacétylation des histones. En effet, il a été montré que l'HDAC RPD3 co-localise avec de nombreuses HAT sur les promoteurs de gènes activement transcrits (Wang *et al.,* 2009). On pourrait expliquer cela par la nécessité d'acétyler les histones au début de la transcription pour permettre le recrutement de l'ARN Polymérase II et l'importance de la désacétylation des histones avant le début d'un nouveau cycle de transcription (Zhang et Pradhan, 2014).

Modifications	Position		Enzymes				Recognition Module(s)*	Functions in Transcription
			S. cerevisiae	*S. pombe*	*Drosophila*	Mammals		
Methylation	H3	K4	Set1	Set1	Trx, Ash1	MLL, ALL-1, Set9/7, ALR-1/2, ALR, Set1	PHD, Chromo, WD-40	Activation
		K9	n/a	Clr4	Su(var)3-9, Ash1	Suv39h, G9a, Eu-HMTase I, ESET, SETBD1	Chromo (HP1)	Repression, activation
		K27				E(Z)	Ezh2, G9a	Repression
		K36	Set2			HYPB, Smyd2, NSD1	Chromo(Eaf3), JMJD	Recruiting the Rpd3S to repress internal initiation
		K79	Dot1			Dot1L	Tudor	Activation
	H4	K20		Set9	PR-Set7, Ash1	PR-Set7, SET8	Tudor	Silencing
Arg Methylation	H3	R2				CARM1		Activation
		R17				CARM1		Activation
		R26				CARM1		Activation
	H4	R3				PRMT1	(p300)	Activation
Phosphorylation	H3	S10	Snf1				(Gcn5)	Activation
Ubiquitination	H2B	K120/123	Rad6, Bre1	Rad6		UbcH6, RNF20/40	(COMPASS)	Activation
	H2A	K119				hPRC1L		Repression
Acetylation	H3	K56					(Swi/Snf)	Activation
	H4	K16	Sas2, NuA4		dMOF	hMOF	Bromodomain	Activation
	Htz1	K14	NuA4, SAGA					Activation

*The proteins that are indicated within the parentheses are shown to recognize the corresponding modifications but specific domains have yet to be determined.

Tableau 3 : Modifications des histones associées à la transcription

(Adapté de Li *et al.* 2007)

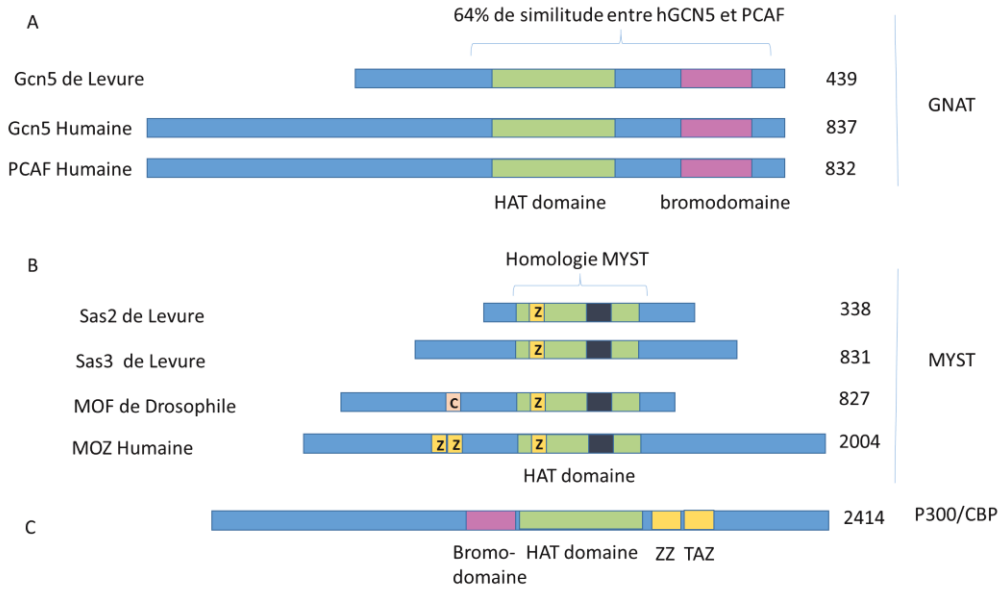

Figure 12 : Les Acétyltransférases GNAT, MYST et P300/CBP. A) alignement des protéines du sous-groupe Gcn5 de la famille des GNAT. En vert est représenté le domaine HAT, en rose le bromodomaine. B) Alignement de protéines appartenant à la famille MYST. Ce schéma représente l'homologie de la région MYST, avec le site de fixation de l'acetyl-CoA (correspondant au domaine présent chez GNAT). En noir est représenté un motif à doigts de zinc, les boîtes jaunes marquées d'un Z indiquent un motif C2HC typique et les boîtes jaunes marquées d'un C, un domaine chromo-like. C) Domaines et régions d'interactions de P300/CBP. En rose un bromodomaine, en vert un domaine acétyltransférase, en jaune motifs putatifs à doigts de zinc. (Sterne et Berger 2000).

La méthylation correspond à l'ajout d'un ou plusieurs groupements méthyl sur des résidus arginine ou lysine par des enzymes appelées Histone Méthyl Transférases (HMT). On trouve des mono-, di- ou tri- méthylations sur les histones H1, H2A, H3 et H4 (tableau 3) (Kuzmichev *et al.,* 2004 ; Li *et al.,* 2007). De nombreuses HMT ont été mises en évidence chez différentes espèces, elles sont très conservées (tableau 3) (Li *et al.,* 2007). La méthylation des arginines est réalisée par les HMT de la famille des « Protein Arginine MethylTransferases» ou PRMTs, et de la famille des « Cofactor Associated Arginine Methyltransferase» ou CoAMT. La méthylation des arginines est impliquée à la fois dans l'activation et dans la répression de la transcription. Les lysines méthyl-transférases sont très nombreuses et très spécifiques, modifiant généralement une lysine unique sur une histone donnée. Comme indiqué dans le tableau 3, 7 lysines méthylables sont présentes sur l'histone H3 (K4, K9, K27, K36, K56, K79) et la lysine K20 de l'histone H4 (Li *et al.,* 2007 ; Jack *et al.,* 2013). Les méthylations H3K4, H3K36 et H3K79 sont liées à l'activation de la transcription des gènes. A l'inverse, les méthylations H3K9, H3K27, H3K56 et H4K20 sont associées à la répression de la transcription. Sur les gènes réprimés, H3K9me et H3K20me ont une distribution relativement homogène, H3K27me3 est légèrement enrichie sur le promoteur et est présente également sur le corps des gènes (Kooistra et Helin, 2012). Sur les gènes activement transcrits, H3K4me3 est principalement présente au niveau du promoteur, H3K36me3 et H3K79me sont présentes dans le corps des gènes (figure 13) (Kooistra et Helin, 2012). Les deux modifications, H3K4me3 et H3K27me3, sont le plus souvent mutuellement exclusives. Mais, il a été mis en évidence, dans les cellules ES, des domaines dits bivalents, ces régions chromatiniennes présentent à la fois les marques H3K27me3 et H3K4me3 et seraient caractéristiques des cellules souches (Bernstein *et al.,* 2006 ; Vastenhouw et Schier 2012).

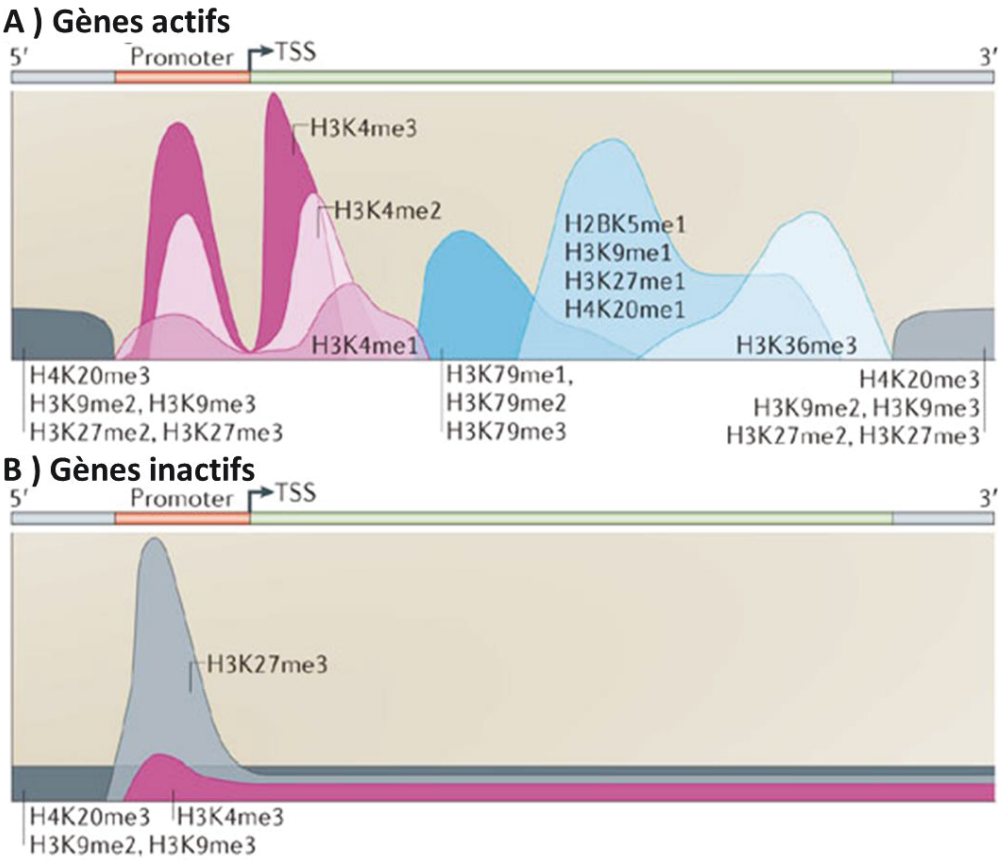

Figure 13 : Représentation schématique des profils moyens de méthylation des histones. A) sur les gènes transcrits**. B)** sur des gènes inactifs. (Adapté de Kooistra et Helin, 2012)

La méthylation des histones est également réversible. On connaît deux familles d'histones déméthylases, la famille LSD qui sont des amines oxydases et dont le représentant principal est LSD1, et la famille Jumonji-Domain-Containing (JMJC) (tableau 4) (Kooistra et Helin, 2012).

Les kinases phosphorylent les sérines, les thréonines et les tyrosines de toutes les histones. Ces phosphorylations participent à différents processus biologiques comme la réparation des lésions de l'ADN et l'activation de la transcription (Ito, 2007). De plus, H3S10ph est associée à la compaction de la chromatine pendant la mitose et la méiose (Hayashi-Takanaka *et al.,* 2009).

L'ubiquitination est l'ajout d'une ubiquitine sur un résidu lysine. On la trouve sur les queues des histones H2A et H2B. L'ajout d'ubiquitine fait intervenir trois grandes classes d'enzymes E1, E2 et E3 ligases. L'ubiquitine est dans un premier temps activée par l'enzyme activatrice E1, puis l'enzyme E2 la fixe et enfin l'enzyme E3 catalyse le transfert de l'ubiquitine d'E2 vers un résidu lysine. De façon intéressante, chez les vertébrés, on dénombre environ 40 E2-ligases et plus de 600 E3-ligases pour deux enzymes E1 (Clague *et al.,* 2015). La spécificité de l'ubiquitination est donc très majoritairement due à l'E3 ligase. L'ubiquitination des histones est également liée à la régulation de la transcription. Par exemple, la mono-ubiquitination de H2AK119 chez les mammifères (H2AK118 chez la drosophile) par Ring1A est associée à la répression de la transcription (Wang *et al.,* 2004). Par contre, chez l'homme, la mono-ubiquitination de H2BK120 par les protéines RNF20/RNF40 et UbcH6 est associée à l'activation de la transcription (Zhu *et al.,* 2005).

D'autres modifications touchent les histones : la poly (ADP-ribosyl)ation, la biotinylation, la glycosylation, la propionylation et la sumoylation (tableau 2). Ces modifications contribuent aussi à la régulation épigénétique de l'expression des gènes.

Name	Synonyms	Protein structure*	Histone substrates‡	Non-histone substrates‡
Déméthylases LSD				
LSD1	AOF2, BHC110, KDM1A	SWIRM, Amine oxidase, Spacer region	H3K4me1, H3K4me2, H3K9me1, H3K9me2	p53, E2F1, DNMT1
LSD2	AOF1, KDM1B	CW	H3K4me1, H3K4me2	
Déméthylases JMJC				
JMJD7		JMJC		
HIF1AN				
HSPBAP1				
JMJD5	KDM8		H3K36me2	
JMJD4				
JMJD6	PSR, PTDSR		H3R2, H4R3	
JMJD8				
FBXL10	JHDM1B, KDM2B	CXXC, PHD, FBOX, LRR	H3K36me1, H3K36me2, H3K4me3	
FBXL11	JHDM1A, KDM2A		H3K36me1, H3K36me2	p65, NF-κB
KIAA1718	JHDM1D		H3K9me1, H3K9me2, H3K27me1, H3K27me2	
PHF8	JHDM1F		H3K9me1, H3K9me2, H4K20me1	
PHF2	JHDM1E		H3K9me2	ARID5B
HR				
KDM3B				
JMJD1A	JHDM2A, TSGA, KDM3A		H3K9me1, H3K9me2	
JMJD1C				
JMJD3	KDM6B		H3K27me2, H3K27me3	
UTX	KDM6A	TPR	H3K27me2, H3k27me3	
UTY				
JMJD2A	JHDM3A, KDM4A	JMJN, TUDOR	H3K9me2, H3K9me3, H3K36me2, H3K36me3, H1.4K26me2, H1.4K26me3	
JMJD2C	JHDM3C, GASC1, KDM4C		H3K9me2, H3K9me3, H3K36me2, H3K36me3, H1.4K26me2, H1.4K26me3	
JMJD2B	JHDM3B, KDM4B		H3K9me2, H3K9me3, H3K36me2, H3K36me3, H1.4K26me2, H1.4K26me3	
JMJD2D	JHDM3D, KDM4D		H3K9me2, H3K9me3, H3K36me2, H3K36me3, H1.4K26me2, H1.4K26me3	
JARID1B	PLU1, KDM5B	ARID, C5HC2	H3K4me2, H3K4me3	
JARID1C	SMCX, KDM5C		H3K4me2, H3K4me3	
JARID1D	SMCY, KDM5D		H3K4me2, H3K4me3	
JARID1A	RBP2, KDM5A		H3K4me2, H3K4me3	
JARID2				
MINA				
NO66			H3K4me2, H3K4me3, H3K36me2, H3K36me3	

Tableau 4 : Deux familles d'histones déméthylases : La famille des amines oxydases (LSD) et la famille Jumonji-Domain-containing (JMJC) (Kooistra et Hevin, 2012)

2.2.2 Le code des histones

La réversibilité des modifications post-traductionnelles des histones est cohérente avec celle de l'information épigénétique. Il a été proposé par le laboratoire de David Allis que l'ensemble de ces modifications constituerait un code appelé « code des histones» (Strahl *et* Allis, 2000). Selon cette hypothèse, la combinaison des différentes modifications des histones constituerait une information qui, une fois décryptée, permettrait d'induire l'activation ou la répression des gènes (Jenuwein *et* Allis, 2001). La mise en place de ce code est coordonnée grâce à un langage croisé entre les différentes marques, par exemple, la présence de l'une d'entre elles influence le dépôt ou l'éviction d'une autre. Ce langage croisé entre modifications d'histones intervient quand les modifications sont sur le même résidu, quand les modifications sont sur la même histone, et quand les modifications sont sur différentes histones (Latham et Dent, 2007). Par exemple, H3K9 ne peut pas en même temps porter un groupement méthyl et un groupement acétyl, ces deux modifications sont mutuellement exclusives et ont un impact opposé sur l'expression des gènes. La méthylation de H3K9, empêche l'acétylation de H3K14, de H3K18 et de H3K23. Elle inhibe également la méthylation de H3K4 conduisant à la répression de la transcription. A l'inverse, la méthylation de H3K4 empêche la méthylation de H3K9 (Lachner et Junuwein, 2002 ; Nishioka *et al.,* 2002).

2.2.3 Les complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendants

La dynamique de la chromatine fait intervenir des complexes qui consomment de l'énergie sous forme d'ATP. Ils agissent de différentes façons : en déplaçant les nucléosomes le long de l'ADN, en permettant un relâchement des interactions histones-ADN ou encore en remplaçant les histones par des variants (figure 14) (Clapier et Cairns, 2009).

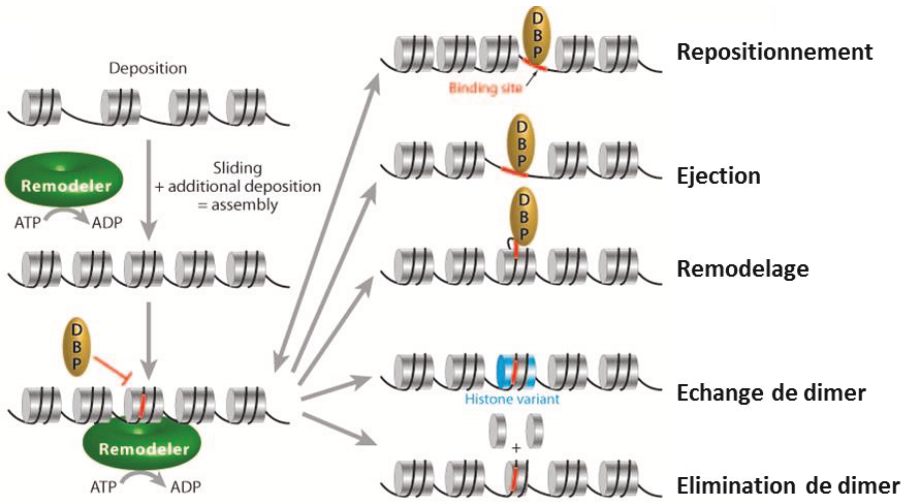

Figure 14 : Différents types de remodelage de la chromatine ATP-dépendant. Après hydrolyse de l'ATP par des remodeleurs (en vert) des complexes peuvent se lier à l'ADN (DBP, en jaune). Les nucléosomes peuvent être déplacés, éjectés, remodelés, modifiés ou remplacés. (Clapier *et al.* 2009).

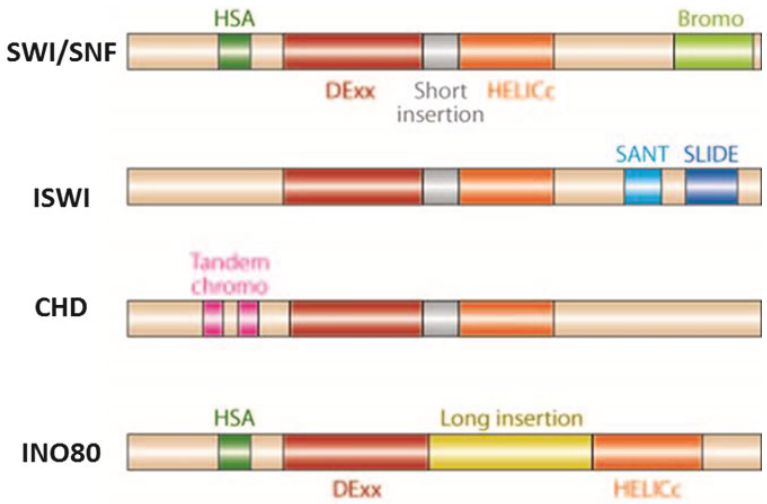

Figure 15 : Différents types d'ATPases. Le domaine ATPase est divisé en deux parties: DExx (rouge) et HELICc (orange). Chaque famille d'ATPase possède des domaines spécifiques. Les ATPases SWI/SNF, ISWI, et CHD ont chacune une courte insertion (gris) dans le domaine ATPase, tandis que l'ATPase INO80 contient une longue insertion (jaune). Chaque famille est définie par des combinaisons de domaines : SWI/SNF contient un Bromodomaine (vert clair), un domaine HSA (hélicase-SANT) (vert foncé) ; ISWI contient le module SANT-SLIDE (bleu) ; CHD contient un tandem de chromodomaines (rose) ; INO80 contient un domaine HSA (vert foncé) (Clapier et Cairns, 2009).

Ces complexes multiprotéiques sont divisés en quatre grandes familles selon l'ATPase qu'ils contiennent. Chez la drosophile, Les complexes SWI/SNF (Switch/Sucrose Non Fermenting) contiennent l'ATPase Brahma (BRM), les complexes ISWI (Imitation of SWitch 1) l'ATPase ISWI, les complexes INO80 (Inositol 80) les ATPases dIno80 et Domino, et les complexes CHD (Chromodomain, Helicase DNA binding), les ATPases dCHD1 et dMi-2. Le domaine ATPase est caractérisé par deux motifs : DExx et HELICc. Par ailleurs, ces ATPases possèdent également des domaines qui leur sont propres. Par exemple, les complexes SWI/SNF contiennent des bromodomaines et des domaines HSA (figure 15) (Clapier et Cairns, 2009). Ces différentes familles de complexes de remodelage de la chromatine sont très conservées (tableau 5) (Clapier et Cairns, 2009).

Les complexes SWI/SNF purifiés initialement chez *Saccharomyces cerevisae* comprennent de 8 à 14 sous-unités. Il en existe deux types : SWI/SNF et RSC chez la levure, BAP et PBAP chez la drosophile, et BAF et PBAF chez l'homme. Ils ont d'abord été caractérisés comme co-activateurs transcriptionnels, leur activité de remodelage de la chromatine permettant le recrutement de la machinerie transcriptionnelle sur le site d'initiation de la transcription (Mohrmann et Verrijzer, 2005). Ils induiraient un relâchement de l'interaction entre les histones et l'ADN, rendant ainsi les régions promotrices disponibles pour les facteurs de transcription. Par ailleurs, le bromodomaine de SWI2/SNF2 permet le recrutement des complexes SWI/SNF sur les promoteurs *via* la reconnaissance de lysines acétylées des histones. Ces complexes sont requis pour l'initiation de la transcription de la plupart des gènes (Armstrong *et al.,* 2002). D'autres études suggèrent que les complexes SWI/SNF seraient également impliqués dans la répression transcriptionnelle (Nielsen *et al.,* 2002 ; Marenda *et al.,* 2004 ; Curtis *et al.,* 2010). Il a été montré que HP1α formerait un complexe avec le facteur de remodelage de la chromatine BRG1 (homologue de SWI/SNF) dans les cellules HeLa (Nielsen *et al.,* 2002). D'autre part, dans les cellules humaines, BRG1 et Rb formeraient un complexe répresseur inhibant la transcription des gènes codant pour les Cyclines E et A (Zhang *et al*., 2000 ; Varga-Weisz, 2001). Chez la drosophile, le complexe BRM participerait à l'activation et à la répression de certains gènes clefs impliqués dans des voies de signalisation (Notch, EGFR et DPP) essentiels à la formation de l'aile (Curtis *et al.,* 2010).

Family and composition		Organisms								
		Yeast			Fly			Human		
SWI/SNF	Complex	SWI/SNF	RSC		BAP	PBAP		BAF	PBAF	
	ATPase	Swi2/Snf2	Sth1		BRM/Brahma			hBRM or BRG1	BRG1	
	Noncatalytic homologous subunits	Swi1/Adr6			OSA/eyelid			BAF250/hOSA1		
						Polybromo BAP170			BAF180 BAF200	
		Swi3	Rsc8/Swh3		MOR/BAP155			BAF155, BAF170		
		Swp73	Rsc6		BAP60			BAF60a or b or c		
		Snf5	Sfh1		SNR1/BAP45			hSNF5/BAF47/INI1		
					BAP111/dalao			BAF57		
		Arp7, Arp9			BAP55 or BAP47			BAF53a or b		
					Actin			β-actin		
	Unique	[a]	[b]							
ISWI	Complex	ISW1a	ISW1b	ISW2	NURF	CHRAC	ACF	NURF	CHRAC	ACF
	ATPase	Isw1		Isw2	ISWI			SNF2L	SNF2H[c]	
	Noncatalytic homologous subunits			Itc1	NURF301	ACF1		BPTF	hACF1/WCRF180	
						CHRAC14			hCHRAC17	
						CHRAC16			hCHRAC15	
					NURF55/p55			RbAp46 or 48		
	Unique	Ioc3	Ioc2, Ioc4		NURF38					
CHD	Complex	CHD1			CHD1	Mi-2/NuRD		CHD1	NuRD	
	ATPase	Chd1			dCHD1	dMi-2		CHD1	Mi-2α/CHD3, Mi-2β/CHD4	
	Noncatalytic homologous subunits					dMBD2/3			MBD3	
						dMTA			MTA1,2,3	
						dRPD3			HDAC1,2	
						p55			RbAp46 or 48	
						p66/68			p66α,β	
	Unique								DOC-1?	
INO80	Complex	INO80		SWR1	Pho-dINO80	Tip60		INO80	SRCAP	TRRAP/Tip60
	ATPase	Ino80		Swr1	dIno80	Domino		hIno80	SRCAP	p400
	Noncatalytic homologous subunits	Rvb1,2			Reptin, Pontin			RUVBL1,2/Tip49a,b		
		Arp5,8		Arp6	dArp5,8	BAP55		BAF53a		
		Arp4, Actin1			dActin1	Actin87E		Arp5,8	Arp6	Actin
		Taf14		Yaf9		dGAS41			GAS41	
		Ies2,6						hIes2,6		
				Swc4/Eaf2		dDMAP1			DMAP1	
				Swc2/Vps72		dYL-1			YL-1	
				Bdf1		dBrd8				Brd8/TRC/p120
				H2AZ,H2B		H2Av,H2B			H2AZ,H2B	
				Swc6/Vps71					ZnF-HIT1	
						dTra1				TRRAP
						dTip60				Tip60
						dMRG15				MRG15 MRGX
						dEaf6				FLJ11730
						dMRGBP				MRGBP
						E(Pc)				EPC1, EPC-like
						dING3				ING3
	Unique	Ies1,Ies3-5,Nhp10		Swc3,5,7	Pho			[d]		

[a]Swp82, Taf14, Snf6, Snf11.
[b]Rsc1 or Rsc2, Rsc3-5, 7, 9, 10, 30, Htl1, Ldb7, Rtt102.
[c]In addition, SNF2H associates respectively with Tip5, RSF1, and WSTF to form **NoRC**, **RSF,** and **WICH** remodelers.
[d]Amida, NFRKB, MCRS1, UCH37, FLJ90652, FLJ20309.

Tableau 5 : Composition des familles de remodeleurs de la chromatine de la levure à l'homme (Clapier et Cairns, 2009).

Initialement purifiés chez *Drosophila melanogaster,* les complexes de la famille ISWI sont formés de 2 à 4 sous-unités (Corona et Tankum, 2003). Ils possèdent les domaines de type SANT (présent chez ySWI3, yADA2, hNCoR, hTFIIIB) permettant la liaison à l'ADN et un domaine SLIDE impliqué dans la reconnaissance des nucléosomes (figure 15) (Clapier et Cairns, 2009). Il existe plusieurs complexes ISWI avec des sous-unités spécifiques (tableau 5). Ces complexes sont souvent impliqués dans la répression transcriptionnelle, les complexes ACF et CHRAC de la famille ISWI modifient l'espacement des nucléosomes rendant la chromatine plus compacte. En revanche, le complexe NURF stimulerait l'ARN Polymérase II (Fyodorov *et al.,* 2004 ; Clapier et Cairns, 2009).

Les complexes de la famille INO80, purifiés pour la première fois chez *Saccharomyces cerevisae*, possèdent plus de 10 sous-unités. Les sous-unités catalytiques contiennent un domaine ATPase scindé en deux par des domaines de liaison aux protéines ARP et RVB1/2 (ATPases) et un domaine HSA (Figure 15). Chez la levure et la drosophile, il existe deux complexes différents (pho-dINO80 et Tip60) alors que trois complexes différents sont présents chez l'homme (INO80, SRCAP, TRRAP/Tip60). Ces complexes de la famille INO80, en plus de leur activité ATPase, ont d'autres activités enzymatiques. Par exemple, le complexe SWR et ses orthologues peuvent remplacer le dimère H2A-H2B par un dimère H2AZ-H2B dans les nucléosomes (Mizuguchi *et al.,* 2004 ; Hargreaves et Crabtree, 2011). Les complexes de la famille INO80/SWR1 jouent un rôle à la fois dans l'activation et dans la répression transcriptionnelle des gènes, dans la réplication, et dans la réparation des lésions de l'ADN (Clapier et Cairns, 2009).

Les complexes de la famille CHD (Chromodomain Helicase DNA-binding protein) contiennent de 1 à 10 sous-unités. Les sous-unités catalytiques présentent, en plus de leur domaine ATPase, deux chromodomaines en N-terminal (Figure 15). Chez la levure, un seul membre (appelé CHD1) est présent. Chez l'homme et la drosophile, les sous-unités catalytiques sont nombreuses. Elles ont été classées en trois familles selon leur similarité de structure : CHD1/2, CHD3/4 et CHD 5 à 9. Ces complexes contiennent aussi des histones désacétylases : HDAC1/2-dRPD3 (tableau 5) (Hargreaves et Crabtree, 2011). Certains complexes CHD favorisent la transcription comme CHD1 (Simic *et al.,* 2003 ; Murawska et Brehm, 2011). D'autres

ont un rôle répresseur, comme le complexe NURD qui contient une histone désacétylases (Denslow et Wade, 2007).

2.2.4 Les variants d'histones

Les histones H2A, H2B, H3 et H4 sont les composantes habituellement rencontrées dans les nucléosomes. Ces histones sont synthétisées en phase S et incorporées dans la chromatine essentiellement pendant la réplication. Chez la plupart des eucaryotes, les histones H2A, H2B et H3 présentent de nombreux variants. Ces variants se distinguent des histones classiques par le fait qu'ils sont exprimés en dehors de la phase S et sont incorporés indépendamment de la réplication. Par exemple, H3.3 est présente sur les gènes activement transcrits, elle est incorporée lors de la transcription. L'incorporation de ces variants à la chromatine nécessite l'action de complexes de remodelage et/ou l'intervention de protéines chaperonnes. La séquence des variants des histones diffère de celle des histones canoniques au niveau de la queue N-terminale, du domaine globulaire ou seulement de quelques acides aminés comme le montre la figure 16 (Sarma et Reinberg 2005 ; Campos et Reinberg, 2009). Chez l'homme, à l'exception de l'histone H4, toutes les protéines histones possèdent des variants (Banaszynski, 2010). L'histone H2A humain par exemple possède plusieurs variants (H2AZ, H2AX, macroH2A et H2A.Bbd), H2B (TSH2B) et H3 (H3.3 et CENPA). Chez *Saccharomyces cerevisae*, il existe un seul variant de H2A (Htz1, homologue de H2AZ) et de H3 (CSE4, homologue de CENPA). Enfin, chez *Drosophila melanogaster*, il existe un seul variant d'H2A (H2AZ), et deux variants d'H3 (H3.3 et CID, homologue de CENPA).

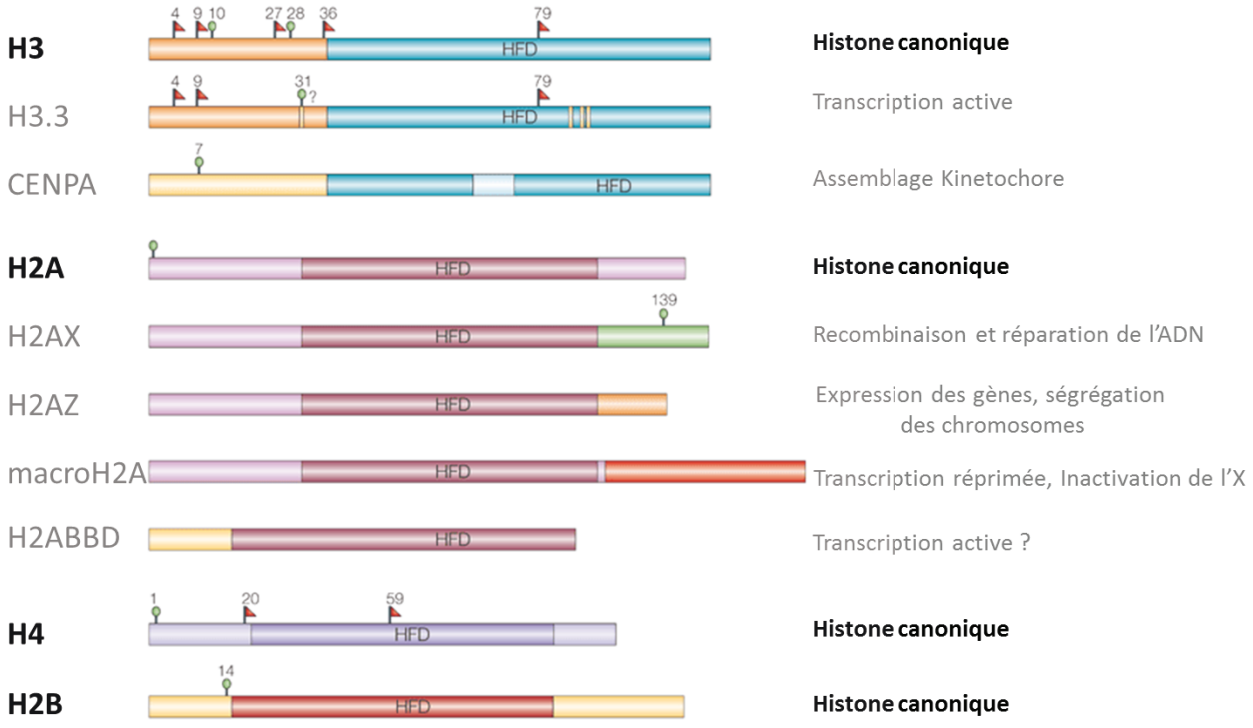

Figure 16 : Les variants des histones H3 et H2A. Les histones contiennent un domaine histone très conservé (HFD). Ils contiennent en N- et C-terminal des sites qui portent diverses modifications post-traductionnelles. Le variant H3.3 possède 4 résidus diffèrents de H3 (barres jaunes). CENPA présente en N-terminal une région unique nécessaire au ciblage du variant vers les centromères (bleu clair). Le variant H2AX présente la sérine 139 (domaine C-ter) qui est phosphorylée après dommage à l'ADN. H2AZ a une région C-terminale courte contrairement à MacroH2A qui possède une queue C-ter plus longue. H2ABBD est le variant le plus court avec un C-ter tronqué et une partie N-ter très courte (Adapté de Sarma et Reinberg, 2005).

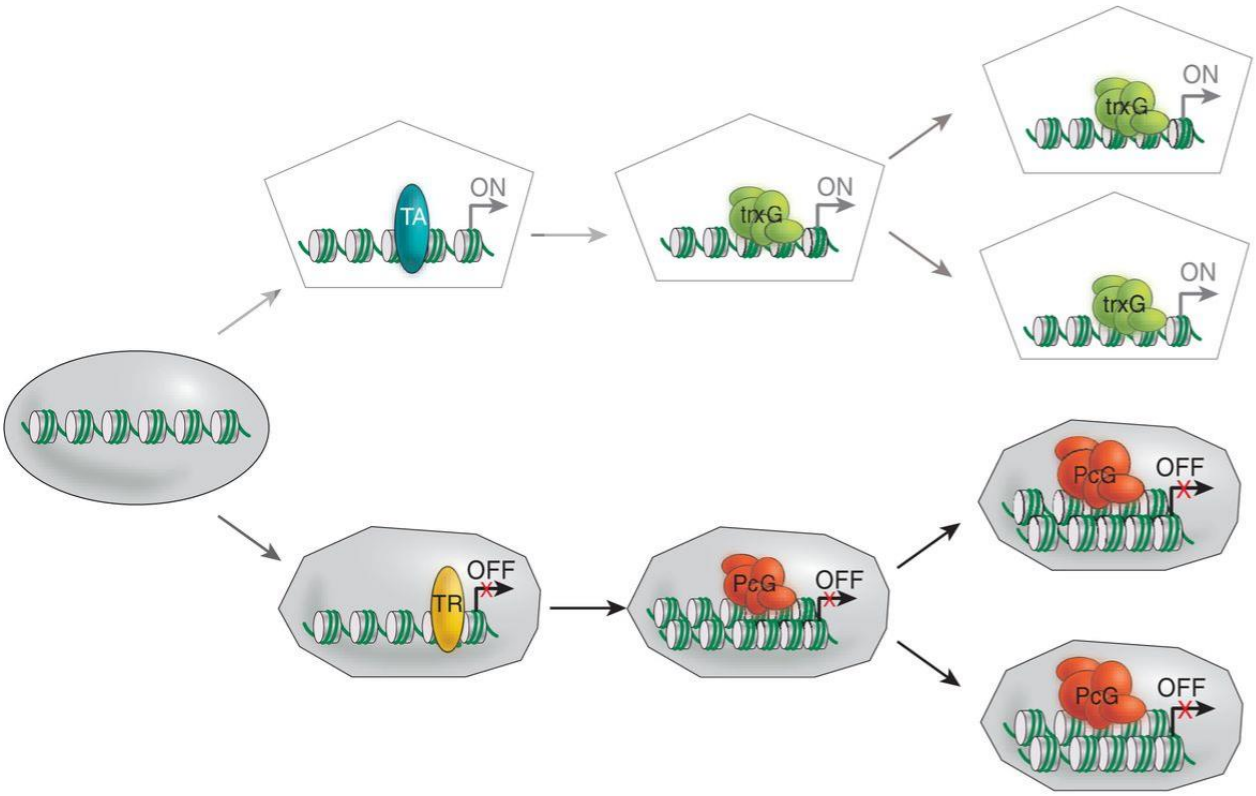

Figure 17 : Concept de la mémoire cellulaire. Ce Schéma représente le rôle des complexes Polycomb (en rouge) dans le maintien de l'état réprimé des gènes (bulles grises) et le rôle des complexes Trithorax (en vert) dans le maintien de l'état activé des gènes (bulles blanches). Le maintien du profil transcriptionnel lors des divisions cellulaires permet la « mémoire » de l'indentité des cellules. TA : Activateur Transcriptionnel ; TR : Répresseur Transcriptionnel. (Grossniklaus et Paro, 2014).

3. Les complexes Polycomb (Polycomb-group ou PcG) et Trithorax (Trithorax-group ou TrxG)

Les protéines Polycomb et Trithorax forment des complexes qui se lient à la chromatine et modulent sa structure. Ces complexes ont un rôle essentiel dans la mémoire épigénétique comme le montre la figure 17 (Grossniklaus et Paro, 2014).

Les gènes des groupes *Polycomb* et *trithorax* ont été découverts chez *Drosophila melanogaster* dans le contexte de l'étude de la régulation de l'expression des gènes homéotiques (*Hox*) (Akam, 1987, Beck *et al.,* 2010). Ils codent des protéines qui participent aux modifications de la chromatine et assurent le maintien du profil d'expression génique au cours du développement. Ces deux classes de protéines ont des fonctions antagonistes : les protéines du groupe Polycomb répriment la transcription alors que les protéines du groupe Trithorax l'activent. Les complexes PcG et TrxG contrôlent l'expression de nombreux gènes et sont impliqués dans de nombreux mécanismes cellulaires et développementaux. Ces complexes sont très conservés, ils sont présents chez les mammifères, les insectes, les plantes et les levures.

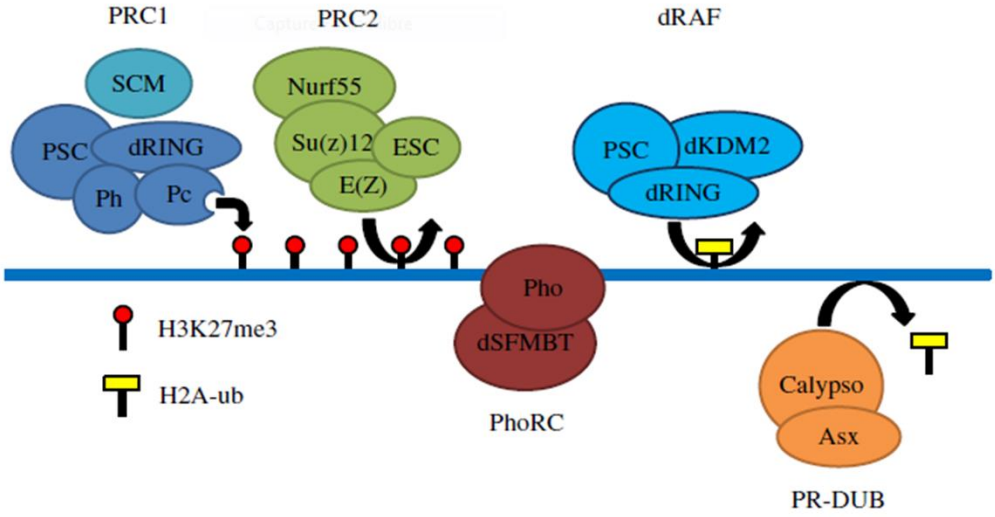

Figure 18 : Les différents complexes du groupe polycomb. Plusieurs complexes du groupe Polycomb ont été caractérisés. « Polycomb Repressive Complex » 1 et 2 (PRC1, PRC2), « Pho-Repressive Complex » (PhoRC), « dRing-Associated Factors » (dRAF) et « Polycomb Repressive DeUBiquitinase » (PR-DUB). E(z) catalyse la triméthylation de la lysine 27 de l'histone 3 (H3K27me3). Le chromodomaine de PC reconnaît la marque H3K27me3 ; Pho et (Phol) se lient à l'ADN. dRing (SCE) catalyse l'ubiquitination de H2A. Le complexe PR-DUB dé-ubiquitine H2A. (Schwartz et Pirrotta, 2008 ; McElroy *et al.,* 2014).

3.1 Les complexes Polycomb (PcG)

Quatre types de complexes Polycomb ont été décrits comme l'indique la figure 18 (McElroy *et al.,* 2014 ; Grossniklaus et Paro., 2014).

3.1.1 PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2)

Plusieurs variants de PRC2 ont été identifiés chez la drosophile, tous contiennent quatre portéines conservées : la méthyltransférase 'Enhancer of Zeste' [E(z)], et les protéines 'Extra sex combs' (ESC), 'Suppressor of zeste 12' (Su(z)12) et p55/Nurf-55. La méthyltransferase E(Z) appose la marque épigénétique H3K27me3, méthylation catalysée par le domaine SET. Cette protéine contient également un domaine SANT impliqué dans la liaison aux histones ainsi qu'un domaine C5 requis pour l'interaction physique avec Su(Z)12. ESC possède un domaine WD40, sa structure lui confère un rôle central dans le complexe PRC2 permettant l'interaction physique entre les deux protéines E(Z) et p55. Su(Z)12 est caractérisée par un domaine à doigts de zinc de type C2H2 et un domaine C-terminal VEFS très conservé. Plusieurs mutants de ce domaine VEFS montrent qu'il est indispensable pour l'interaction avec le domaine C5 de E(Z) (Yamamoto *et al., 2004*). La protéine p55 interagit physiquement avec ESC *via* son domaine WD40 (Tie *et al.,* 2001). Le complexe PRC2 est parfois associé à d'autres protéines, comme l'histone désacétylase RPD3 ou la protéine 'Polycomb-like' (PCL) (Nekrasov *et al.,* 2007).

3.1.2 PRC1 (Polycomb Repressive Complex 1)

Ce complexe contient quatre composants principaux Polycomb (PC), Polyhomeotic (PH), Posterior Sex Combs (PSC) et Sex Combs Extra (SCE) (Shao *et al.,* 1999). PC se fixe spécifiquement à la marque H3K27me3 par l'intermédiaire de son chromodomaine. Les deux sous-unités PSC et Su(Z)2 sont importantes pour l'accessibilité à la chromatine (Lo *et al.,,* 2009). Par ailleurs, PRC1 mono-ubiquitine H2A : H2A-K119 chez les mammifères et H2A-K118 chez la drosophile, une activité due à l'ubiquitine ligase E3 SCE/dRing *(*Wang *et al., 2004,* Gutiérrez *et al.,* 2012). Chez la drosophile, la marque H2AK118ub est déposée par les complexes PRC1 ou le

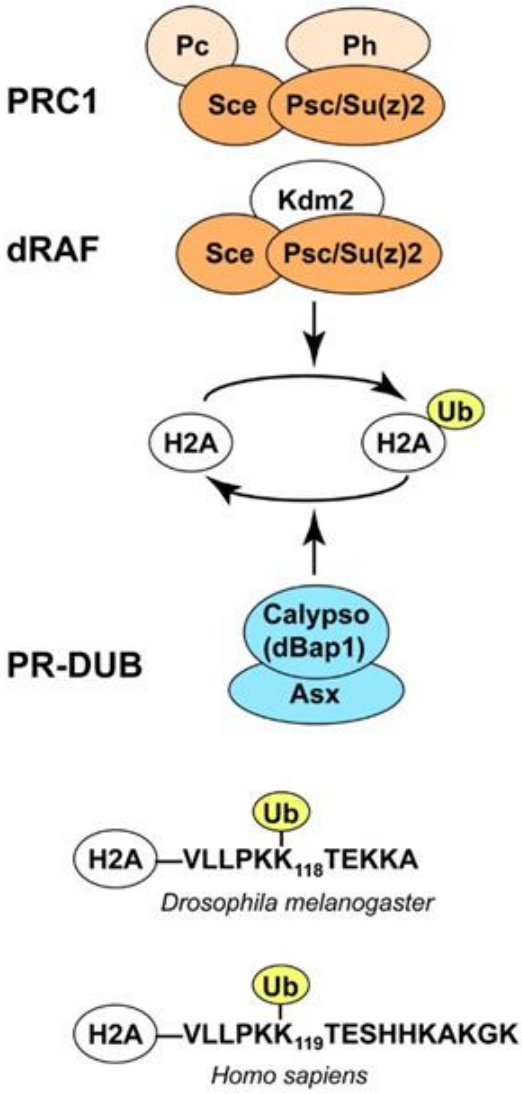

Figure 19 : Complexes Polycomb impliqués dans l'ubiquitination et la déubiquitination de l'histone H2A chez *Drosophila melanogaster*. Le sous-complexe SCE-PSC (en orange) est commun aux deux complexes polycomb PRC1 et dRAF, l'ubiquitine ligase E3 SCE mono-ubiquitine spécifiquement H2A. Le complexe PR-DUB (en bleu) possède une sous unité Calypso/dBap1 impliquée dans la déubiquitination spécifique de l'histone H2A chez la drosophile. (Scheuermann *et al.* 2012).

complexe dRAF, complexe Polycomb composé des protéines SCE/dRing, PSC et dKDM2 (Lagarou *et al.,* 2008 ; Scheuermann *et al.,* 2010). L'ubiquitination de H2A sur la lysine 118 inhibe le complexe de remodelage de la chromatine FACT (Zhou *et al.,* 2008). De plus, la sous unité dKDM2 du complexe dRAF déméthyle H3K36, une marque associée à l'élongation de la transcription. Il existe donc un lien direct entre l'inhibition de l'élongation de la transcription et la répression liée à H2AK118ub. Il a été également montré que l'ubiquitination de H2A par PRC1 serait indispensable pour cibler et compacter la chromatine des gènes *Hox*.

3.1.3 PR-DUB (Polycomb Repressive Deubiquitinase)

Le complexe PR-DUB est composé d'ASX (Additional Sex Combs) et de l'ubiquitine carboxy-terminal hydrolase Calypso, également appelée dBap1. Calypso est une déubiquitinase qui enlève spécifiquement l'ubiquitine de la marque H2AK118 (Scheuermann *et al.,* 2010 ; Scheuermann *et al.,* 2012). Le complexe PR-DUB est nécessaire pour la répression des gènes cibles des PcG (Scheuermann *et al.,* 2010). De façon surprenante, des études menées chez la drosophile, montrent que la répression des gènes cibles des PcG nécessite non seulement l'activité H2A ubiquitination de PRC1 et dRAF mais aussi l'activité H2A ubiquitinase de PR-DUB (figure 19) (Scheuermann *et al.,* 2010). De plus, chez l'embryon de drosophile, des doubles mutants pour *Sce* et *Asx* montrent une dérépression des gènes *Hox* avec des transformations homéotiques plus sévères que dans des simples mutants *Sce* ou *Asx*. La répression des gènes cibles des PcG pourrait être liée à un équilibre dynamique entre l'ubiquitination par PRC1 et dRAF et la déubiquitination de H2A par PR-DUB (Scheuermann *et al.,* 2010).

3.1.4 PhoRC (Pho Repressive Complex)

Ce complexe est un hétérodimère comprenant la protéine de liaison à l'ADN Pho (Pleiohomeotic) et la protéine dSfmbt qui se lie à la marque H3K9me1/2 et H4K20me1/2 (Klymenko *et al.,* 2006). Pho peut interagir avec PRC1 *via* PC et PH, mais également avec le complexe PRC2 par des interactions avec E(Z) (Wang *et al.,* 2004).

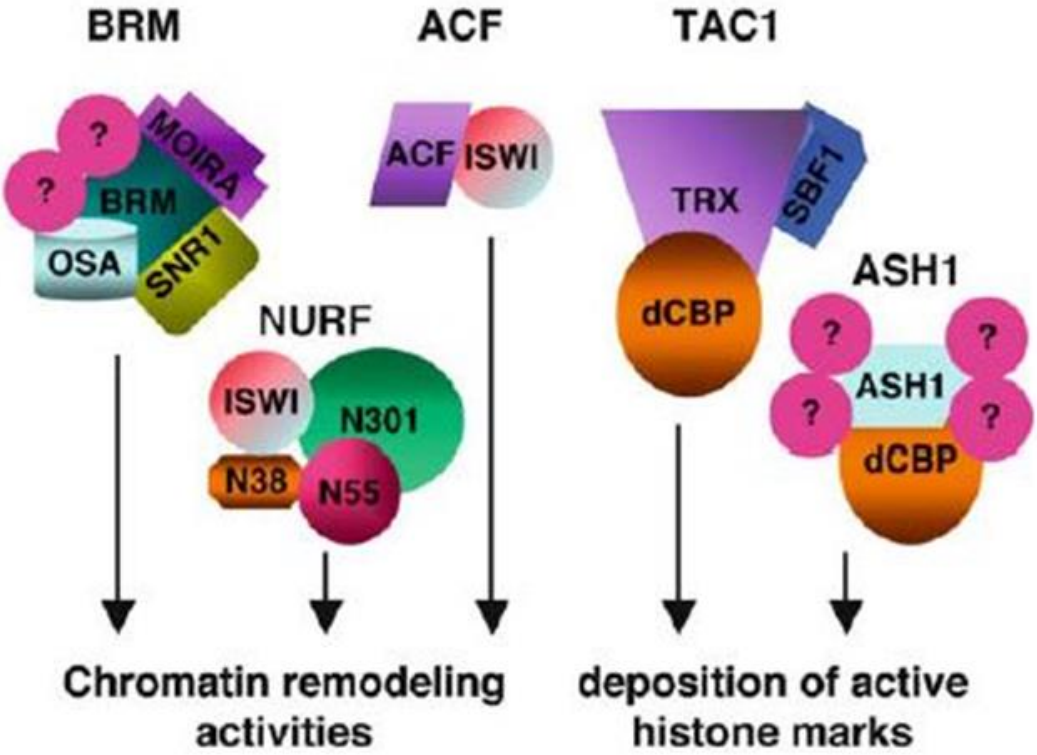

Figure 20 : Schéma illustrant les différents complexes Trithorax et leur fonction sur la chromatine. Les points d'interrogation indiquent les sous-unités non identifiées des complexes (Grimaud *et al.* 2006).

3.2 Les complexes Trithorax (TrxG)

Les protéines Trithorax forment des complexes multimériques. Il en existe deux catégories : les complexes impliqués dans le remodelage de la chromatine et les complexes qui interagissent avec la machinerie de la transcription (figure 20) (Grimaud *et al.,* 2006 ; Kingston et Tamkun, 2014).

3.2.1 Le complexe Brahma (BRM)

Ce complexe est principalement formé des protéines Brahma (BRM), OSA, Moira (MOR), SNR1 et Kismet (KIS), il est l'homologue du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF de la levure (Collins *et al.,* 1999). Chez la drosophile le complexe BRM existe sous deux formes distinctes, le complexe BAP qui contient la protéine OSA et le complexe PBAP contenant les protéines Polybromo et BAP170 (Mohrmann et Verrijzer, 2005). Il existe d'autres facteurs pouvant s'associer au complexe BRM, comme BAP111 et BAP60 (Mohrmann et Verrijzer, 2005).

3.2.2 Le complexe TAC1 (Trithorax Activating Complex 1)

Ce complexe se compose de la méthyl-transférase Trithorax (TRX), de l'histone acétyl-transférase CBP (CREB Binding Protein), et de l'anti-phosphatase SBF1 (Set Binding Factor 1) (figure 20) (Grimaud *et al.,* 2006 ; Petruk *et al.,* 2001). TRX méthyle H3K4 et CBP acétyle H3K18 et H3K27.

Le Complexe TAC1 semble lié à l'activation de la transcription (Petruk *et al.,* 2006). Les marques H3K4me1 et H3K27ac sont nécessaires à l'inhibition de la répression par les complexes Polycomb. (Tie *et al.,* 2009; Kingston et Tamkun, 2014).

3.2.3 Les complexes ASH1 et ASH2

Le complexe ASH1 est formé des protéines ASH1, qui triméthyle H3K4 et H3K36, et de la protéine CBP (figure 20) (Grimaud *et al.,* 2006). Le complexe ASH2 est formé des protéines Ash2 et Set1, ce complexe est impliqué dans la di- et la tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3. Ces deux complexes empêchent l'action des complexes

PcG en maintenant la chromatine dans une conformation ouverte (Papoulas *et al.,* 1998).

3.2.4 Le complexe NURF (Nucleosome Remodeling Factor)

Le complexe NURF est formé de quatre sous-unités, l'ATPase ISWI, la protéine NURF55 qui présente un domaine WD40, la pyrophosphatase inorganique NURF38 et la grande sous-unité E(bx)/NURF301 qui contient un motif à doigts PHD qui reconnaît H3K4me3 (figure 20) (Grimaud *et al.,* 2006 ; Badenhorst *et al.,* 2002).

3.3 Les "Enhancers" de Trithorax et Polycomb (ETP)

L'activité des complexes PcG et TrxG est modulée par des co-facteurs appelés « Enhancers de Trithorax et Polycomb » (ETP). Lors d'un crible génétique visant à identifier d'autres gènes du groupe *trithorax*, Gildea et ses collaborateurs ont montré que des gènes initialement identifiés comme des gènes *Polycomb* [*Asx*, *E(z)*, *E(Pc)*, *Psc*, *Scm* et *Su(z)2*] se comportaient génétiquement à la fois comme des gènes PcG et comme des gènes trxG (tableau 6) (Grimaud *et al.,* 2006 ; Gildea *et al.,* 2000). Les mutants des ETP ont des phénotypes similaires à ceux des mutants PcG et trxG. Par la suite, d'autres gènes ont été reclassés ou identifiés comme des *ETP*, comme *Trl* qui code GAF (Horard *et al., 2000*), *dsp1* (Decoville *et al.,* 2001), *pho* (Mohd-Sarip *et al.,* 2002), *corto* (Salvaing *et al.,* 2003), *CAF1/p55* (Anderson *et al.,* 2011), *dHSF* (Rodriguez-Jato *et al.,* 2011).

PcG complexes		trxG complexes	
PRC1	PC PH PSC dRING SCM	TAC1	TRX dCBP SBF1
PRC2	E(Z) ESC Su(Z)12 NURF-55	ASH1	ASH1 dCBP ...
		ASH2	ASH2 ...
DNA-binding PcG/trxG recruiters			
PHO/PHOL Pipsqueak Grainyhead			Zeste GAF
PcG/trxG cofactors			
Asx E(Pc) Su(Z)2 Corto Lola/Batman PCL Domino dMi2	ACF ISWI ACF	BRM BRM MOIRA OSA SNR1	Kismet Tonalli Skuld Kohtalo NURF NURF-301 ISWI NURF-55 NURF-38

Tableau 6 : Classification des protéines impliquées dans les fonctions Polycomb (PcG) et Trithorax (TrxG). (Adapté de Grimaud *et al.* 2006)

3.4 Complexes PcG et TrxG et mémoire épigénétique

3.4.1 La mémoire épigénétique est médiée par des régions cis-régulatrices

Les complexes PcG et TrxG se fixent sur des séquences appelées PRE/TRE pour Polycomb Response Element / Trithorax Response Element situées dans les régions *cis*-régulatrices des gènes, ainsi que sur les promoteurs. Ces PRE et TRE n'étant pas dissociables fonctionnellement, il a été proposé le terme générique « Maintenance Elements » (ME) pour les renommer (Brock et van Lohuizen, 2001). Les ME sont impliqués dans le maintien de la répression ou de l'activation des gènes établi précédemment au cours du développement (Cavalli et Paro, 1996). Différentes protéines possèdent un domaine de liaison à l'ADN, comme DSP1 (Dorsal Switch Protein 1), GAF (GAGA Associated Factor), Pho et Zeste. Ces protéines pourraient en se fixant aux ME permettre le recrutement des complexes PcG et TrxG.

3.4.2 Répression par les complexes PcG

PRC2 est recruté *via* des protéines de liaison à l'ADN, comme par exemple Pho, méthyle H3K27. Cette marque est reconnue par PC, ce qui induit le recrutement du complexe PRC1 et la répression de l'expression des gènes en maintenant la compaction de la chromatine, en favorisant la pause transcriptionnelle, en induisant la production d'ARN non codants (Dellino *et al.,* 2004), ou en bloquant l'accessibilité à l'ADN de divers facteurs de transcription (Cao *et al.,* 2014 ; Zhang 2004). Il faut noter toutefois que ce mode de recrutement de PRC1 n'est pas unique. En effet, des études sur l'ensemble du génome ont montré que la distribution de H3K27me3 n'est pas exactement identique à celle de PRC1. PRC1 pourrait être recruté en absence de PRC2 (Schuettengrunber *et al.,* 2009). Enfin, le complexe PRC1, comme le complexe dRAF, ubiquitine la lysine 118 de H2A qui corrèle également avec les régions transcriptionnellement réprimées.

3.4.3 Activation par les complexes TrxG

Les complexes TrxG maintiennent l'activation de la transcription par l'apposition de marques épigénétiques activatrices comme H3K4me3 réalisée par TRX, membre du complexe TAC1, ou ASH1 qui tri-méthyle également K36. Par ailleurs, l'histone acétyl-transférase dCBP, membre du complexe TAC1, acétyle les histones au niveau des promoteurs (Petruck *et al.,* 2001) empêchant ainsi la répression de l'expression génique par les complexes PcG (Klymenko *et al.,* 2006 ; Müller, 2004). D'autre part, les complexes de remodelage de la chromatine SWI/SNF et NURF, dont le recrutement est facilité par H3K4me3 (Wysocka *et al.,* 2006), mobilisent les nucléosomes sur les promoteurs et dans le corps des gènes, permettant ainsi la liaison de l'ARN Pol II ainsi que sa progression.

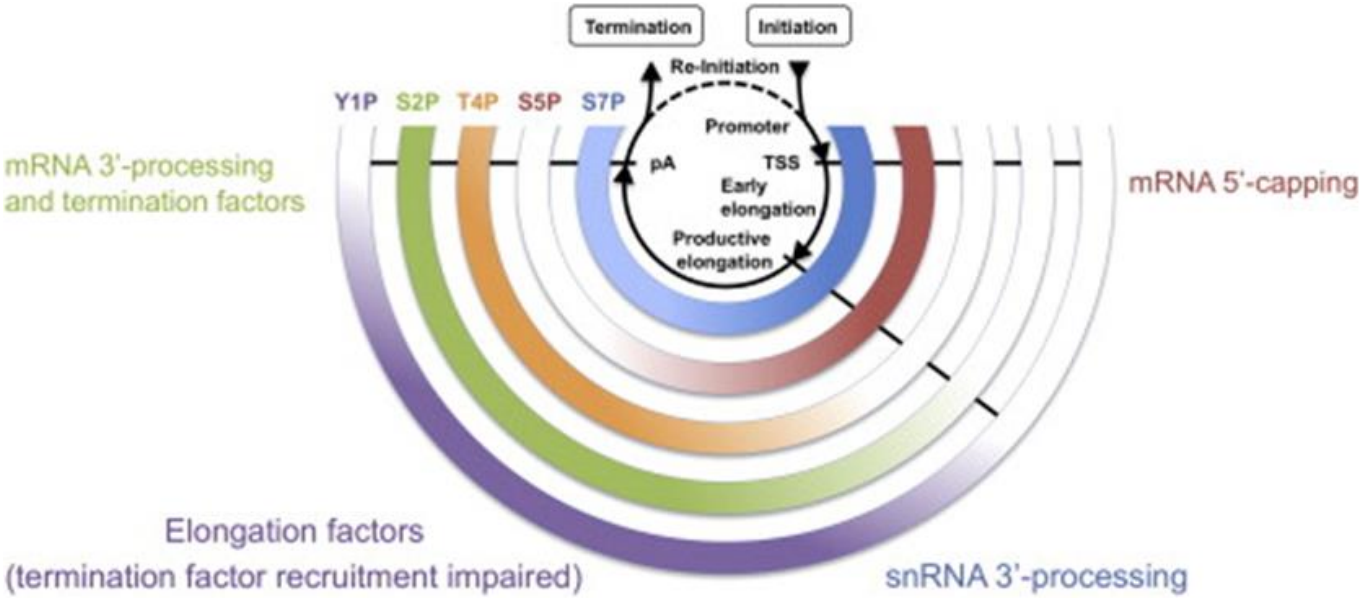

Figure 21 : Profil de phosphorylation du CTD de l'ARN pol II au cours du cycle de transcription. Pendant le cycle de transcription, le niveau de phosphorylation du CTD sur les résidus Tyr1, Ser 2, Thr4, Ser5 et Ser7, change comme cela est illustré par les gradients violet (Tyr1-P), vert (Ser2-P), orange (Thr4-P), marron (ser5-P) et bleu (ser-P).
(Heidemann *et al*., 2013).

Chapitre III - La transcription et l'épissage des ARNm

1. La transcription :

L'expression des gènes est un processus très complexe, précisément orchestré et régulé à de multiples niveaux. La transcription peut être divisée en trois étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison. Elle fait intervenir trois ARN polymérases : I, II et III qui sont responsables respectivement de la transcription des ARN ribosomiques, des ARN messagers (ARNm) et des petits ARN. Dans ce chapitre, je ne développerai que la transcription par l'ARN polymérase II (ARN pol II).

1.1 L'ARN polymérase II

Chez les eucaryotes l'ARN polymérase II est un complexe multi-protéique composé de 12 sous-unités (RBP1 à 12), dont 5 sont extrêmement conservées. Les deux sous-unités principales RBP1 et RBP2 portent l'activité catalytique. La plus grande, RBP1, possède un domaine carboxy-terminal (CTD) constitué de motifs heptapeptidiques répétés ($Y_1S_2P_3T_4S_5P_6S_7$), le nombre de répétition variant selon les organismes (26 chez la levure, 45 chez la drosophile, 52 chez les mammifères) (Hampsey et Reinberg, 2003). Ce motif joue un rôle clef dans la régulation des différentes étapes de la transcription (initiation *versus* élongation) et dans la coordination entre transcription et maturation des ARNm. En effet, une délétion totale ou incomplète du CTD chez la souris est partiellement létale et diminue la transcription globale (Loyer *et al.,* 2005). Au cours de la transcription, le CTD peut être phosphorylé sur cinq sites : les sérines 2, 5 et 7, la tyrosine 1 et la thréonine 4 (Hsin et Manley, 2012). L'activité différentielle de kinases et de phosphatases spécifiques crée un code de phosphorylation du CTD et permet d'établir des interactions spécifiques avec des facteurs de transcription tout au long du cycle de transcription (figure 21) (Fernandes de Almeidi et Carmo-Fonseca, 2014).

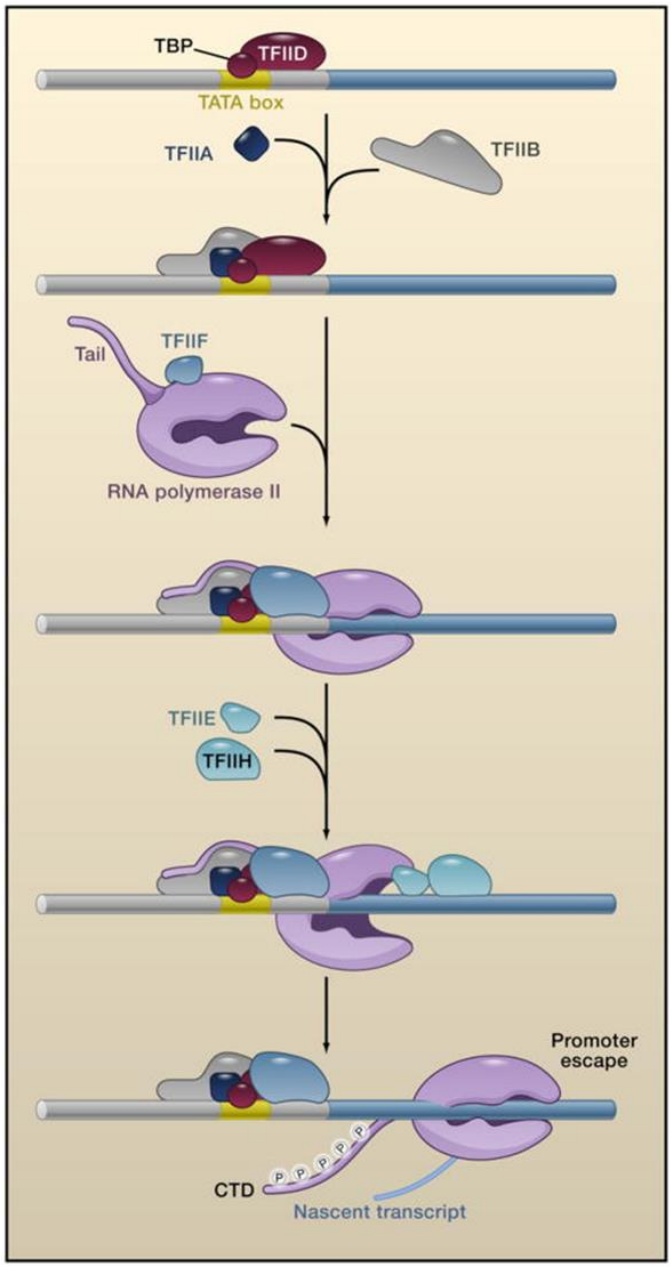

Figure 22 : Premières étapes d'initiation de la transcription par l'ARN pol II. La transcription est initiée par la fixation du facteur de transcription TFIID, sur des éléments spécifiques au niveau du promoteur, TATA box (via TBP). Cela conduit au recrutement de facteurs de transcription généraux supplémentaires (TFIIA, TFIIB, TFIIF), puis de l'ARN polymérase II. Le complexe d'assemblage de pré-initiation ou PIC est instable. A cette étape, le complexe promoteur est dans une conformation fermée. Le recrutement de TFIIH conduit à la formation d'un complexe ouvert et le début de la transcription. L'efficacité de la transcription dépend de la phosphorylation du CTD de l'ARN Pol II, qui favorise la fuite du promoteur. (Adapté de Gilmour,2009 ; Levin, 2011).

1.2 Le cycle de transcription

La transcription requiert l'intervention constante de facteurs communs ou plus spécifiques. En effet, certains gènes sont transcrits de façon permanente, ce sont les gènes qui maintiennent les fonctions essentielles de la cellule. D'autres gènes, en revanche, ne sont transcrits que de façon très spécifique (au cours du développement, lors de certaines phases du cycle cellulaire, lors de la différenciation d'un tissu …). Leur transcription fait appel à la machinerie transcriptionnelle de base, composée de l'ARN pol II et d'un ensemble de protéines ou complexes protéiques appelés facteurs de transcription généraux (GTF). Ces GTF comprennent les complexes TFIID, TFIIA, TFIIB, TFIIF, TFIIH, TFIIE (Shandilya et Roberts, 2012).

1.2.1 L'initiation

Le cycle de transcription débute par la reconnaissance et la fixation d'activateurs en amont du promoteur. Cet évènement conduit au recrutement de complexes d'adaptation ou co-activateurs, comme le complexe SAGA (Spt-Ada-Gcn5 Acetyltransferase) ou le complexe Mediator, qui relient les protéines activatrices aux GTF (Green, 2005 ; Thomas et Chiang, 2006). L'ARN pol II lié aux GTF se positionne sur le promoteur pour former le complexe d'assemblage de pré-initiation ou PIC (figure 22). L'association des facteurs TFIIF, TFIIE et TFIIH ouvre l'ADN double brin sur quelques nucléotides permettant ainsi de démarrer la synthèse de l'ARN. Lorsque le transcrit atteint environ 10 pb, la synthèse stoppe. Cette étape marque la fin de l'initiation, l'ARN pol II est alors phosphorylée par TFIIH sur la sérine 5 du CTD. Cette phosphorylation induit une perte de contact entre l'ARN pol II et le promoteur, et ainsi le relargage des facteurs de transcription TFIIB, E, F et H. La phosphorylation de la sérine 5 du CTD provoque l'entrée en élongation précoce en favorisant le recrutement de différents facteurs comme les facteurs de polymérisation, d'épissage, ou des facteurs impliqués dans la structuration de la chromatine (Hahn, 2004).

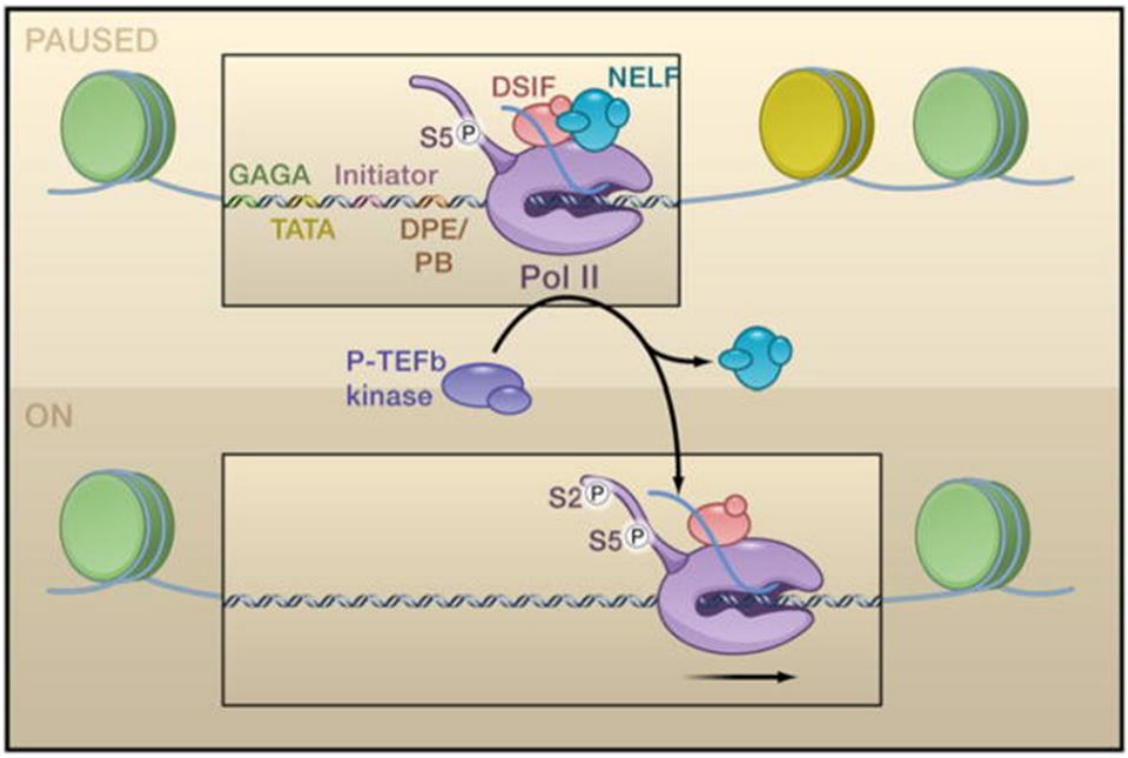

Figure 23 : ARN Pol II en pause et sa libération du promoteur proximal. Le schéma du haut représente un promoteur où est liée l'ARN Pol II en pause. La région promotrice contient des séquences qui favorisent la liaison et l'activation de l'ARN Pol II (GAGA, TATA, initiateur et les motifs DPE/PB (downstream promoter element/pause button)). L'ARN Pol II est généralement en pause juste en aval de la région DPE. L'ARN pol II, phosphorylée sur la sérine 2 du CTD, s'échappe du promoteur. Elle est maintenue en pause par le complexe répresseur DSIF/NELF juste après la séquence DPE/PB. L'activation et le recrutement de P-TEFb provoque la libération de NELF et la phosphorylation de la Ser2 du CTD, ce qui libère l'ARN Pol II et relance la transcription. (D'après Levin, 2011)

1.2.2 L'élongation

Trois complexes d'élongation ont été identifiés : l'hétérodimère DSIF (DRB-Sensitivity Inducing Factor), composé des protéines Spt4 et Spt5, le complexe NELF (Negative Elongation Factor Complex) formé de quatre sous-unités NELF-A, NELF-B, NELF-C/NELF-D, and NELF-E (Wada *et al.,* 1998 ; Yamagichi *et al.,* 1999), et la kinase cycline dépendante P-TEFb (Positive-Transcription Elongation Factor b) formée d'une sous unité catalytique, CDK9, et d'une sous-unité régulatrice, Cycline T (Price, 2000 ; Peng *et al.,* 1998). Lorsque le transcrit atteint environ 20 pb, les complexes NELF et DSIF en association avec l'ARN pol II forment une structure stable qui induit une pause de la transcription (figure 23) (Adelman et Lis, 2012). La pause induite par ce complexe permet le recrutement des facteurs qui ajoutent la coiffe méthyl-guanosine à l'extrémité 5' des ARNm. Elle permettrait également le recrutement de différents facteurs de maturation de la transcription, comme les facteurs d'épissage, ou bien le recrutement de facteurs nécessaires à la mise en place d'une élongation productive, ainsi que des protéines impliquées dans la surveillance des ARN messagers (Levine, 2011 ; Adelman et Lis, 2012).

Le complexe P-TEFb phosphoryle les complexes DSIF et NELF ainsi que la sérine 2 du CTD de l'ARN pol II permettant une transition vers l'élongation productive (figure 23) (Peterlin et Price, 2006) en causant la dissociation de NELF de l'ARN pol II et en convertissant DSIF en activateur (Wada *et al.,* 1998; Yamada *et al.,* 2006). D'autres facteurs sont impliqués dans la régulation de l'élongation comme les protéines Elongines et les facteurs d'élongation ELL, qui stimulent le taux l'élongation de l'ARN pol II (Sims *et al.,* 2004). Le complexe PAF (Polymerase Associated Factor) facilite l'élongation de la transcription et est lié au recrutement de facteurs modifiant les histones et de facteurs de terminaison de la transcription (Jaehning, 2010).

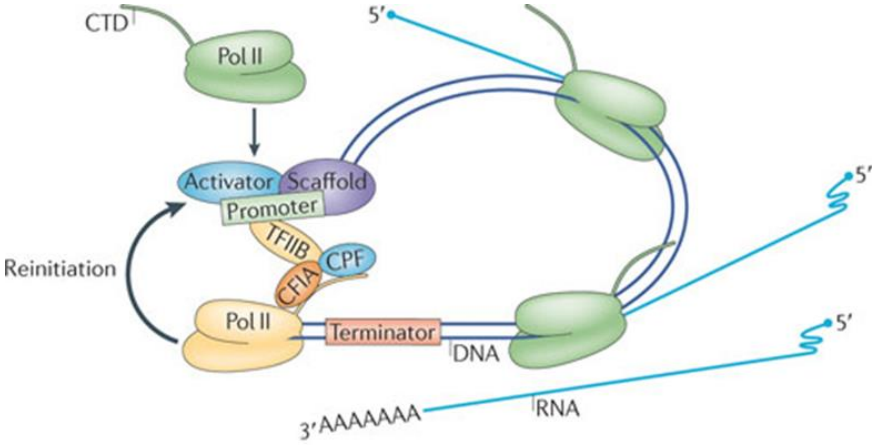

Figure 24 : Processus de recyclage des facteurs de transcription. Une boucle se forme entre le site d'initiation et le site de terminaison à la fin du premier cycle de transcription. La boucle est mobile, elle est maintenue par l'interaction physique entre les facteurs des complexes du site d'initiation de la transcription (TFIIB) et les facteurs de terminaison CPF « clivage and polyadenylation factor » et CF-1A « clivage factor 1A ». L'ARN pol II effectuera ainsi plusieurs cycles de transcription sans se décrocher (Kuehner *et al.* 2011)

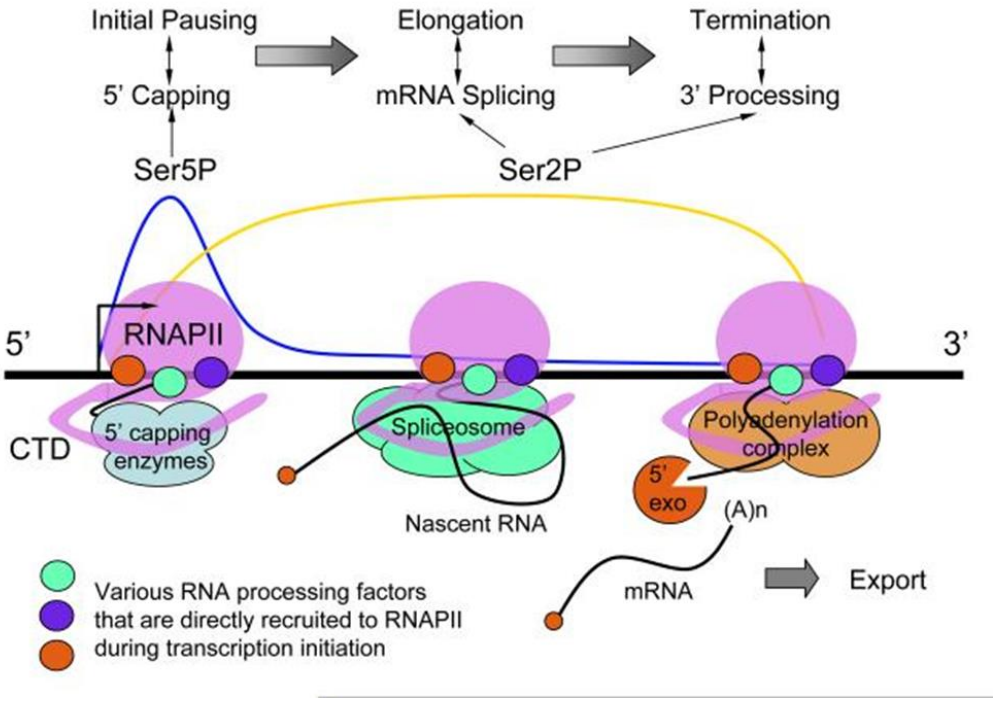

Figure 25 : Couplage des mécanismes de transcription et de maturation des ARN pré-messagers. Le profil de phosphorylation du CTD de L'ARN pol II change au cours du cycle de transcription. La sérine 5 du CTD est phosphorylée en début de cycle (courbe bleue), la sérine 2 est phosphorylée à partir du milieu du cycle et en fin de cycle (courbe jaune). Les facteurs permettant les modifications en 5' (coiffe) du transcrit naissant sont recrutés via des interactions directes avec la sérine 5 phosphorylée du CTD au début de la transcription. Au cours de la phase d'élongation, divers facteurs d'épissage sont également recrutés. De plus, la polyadénylation de l'extrémité 3' du transcrit est liée à la terminaison de la transcription. (Pandit *et al.,* 2008)

1.2.3 La terminaison

La terminaison est directement liée à la maturation de l'extrémité 3' de l'ARNm transcrit. Ce mécanisme fait intervenir un grand nombre de facteurs qui clivent l'ARNm transcrit et le polyadénylent à l'extrémité 3' (queue polyA). Des études ont montré que certains facteurs de terminaison se lient au CTD de l'ARN pol II, comme les facteurs Pcf11 et Nrd1 qui reconnaissent la sérine 2 phosphorylée du CTD, entraînant la déstabilisation du complexe d'élongation et la libération de l'ARNm transcrit (Lunde *et al.,* 2010).

La polyadénylation des transcrits joue plusieurs rôles essentiels. Elle intervient dans la protection contre la dégradation des ARNm matures, dans le transport nucléo-cytoplasmique, et dans la traduction (Dower *et al.,* 2004 ; Hilleren *et al.,* 2001). D'autre part, des études montrent que la maturation de l'extrémité 3' des transcrits favoriserait le recyclage des facteurs de transcription du site de terminaison vers le site d'initiation (figure 24) (Mapendano *et al.,* ; Kuehner *et al.,* 2011).

Ainsi, la synthèse du transcrit s'accompagne de sa maturation avec l'ajout de la coiffe en 5' et de la queue poly A en 3' mais également par l'élimination des introns, processus appelé épissage. Ces modifications ont lieu pendant la transcription (mécanismes co-transcriptionnels) (figure 25) (Maniatis et Reed, 2002 ; Kornblihtt *et al.,* 2004).

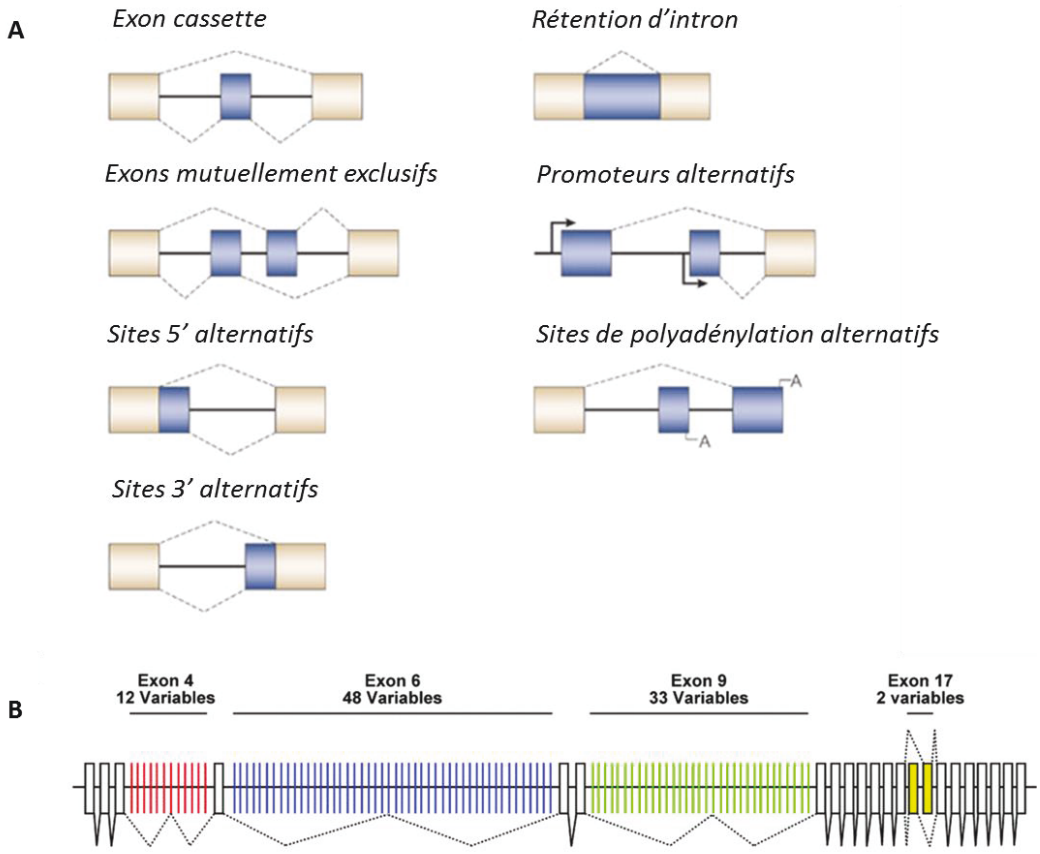

Figure 26 : Différents types d'épissages alternatifs. A) Les exons constitutifs sont représentés en gris, les régions alternativement épissées sont en bleu. Les introns sont représentés par des traits noirs et les lignes en pointillés correspondent aux évènements d'épissages alternatifs. B) Gène *Dscam* de *Drosophila melanogaster*. Les exons constitutifs sont représentés en blanc, les exons alternatifs des groupes d'exons 4, 6, 9 et 17 sont en rouge, bleu, vert et jaunes respectivement. Le profil d'épissage d'une isoforme de l'ARNm de *Dscam* est indiqué par les traits noirs. (Matlin *et al*. 2005 ; Hemani et Soller, 2012).

2. L'épissage

Chez les eucaryotes, la plupart des gènes codant des protéines présente une alternance entre des exons et des introns. L'épissage est un mécanisme très complexe, qui excise les introns et forme une jonction entre les exons. Il existe deux types d'épissage, l'épissage constitutif, qui assemble les exons systématiquement inclus dans le transcrit mature, et l'épissage alternatif, qui correspond à l'inclusion ou à l'exclusion de certains exons. Ce dernier type d'épissage conduit à la production de très nombreux produits fonctionnels différents (figure 26A) (Maltin *et al.,* 2005). Le cas le plus extrême concerne certainement le gène *dSCAM* de la drosophile, qui peut générer jusqu'à 38 016 isoformes protéiques différentes (figure26B) (Schumcker *et al.,* 2000, Hemani et Soller, 2012). L'épissage alternatif est une des sources majeures de la diversité du protéome (Johnson *et al.,* 2003). Chez la drosophile, par exemple, il est impliqué dans le déterminisme du sexe ou la diversité neuronale (Salz, 2011 ; Chen *et al.,* 2006). Par ailleurs, l'épissage alternatif a un impact sur le niveau d'expression des gènes. Des analyses par RNA-seq montrent qu'environ 25% des événements d'épissage alternatif conduisent à l'apparition de codons stop prématurés (PTC) dans le cadre de lecture des transcrits. Ces transcrits portant un PTC seront pris en charge par le mécanisme de contrôle de la qualité de l'ARNm « Nonsense Mediated mRNA Decay (NMD) qui les dégrade (Huang et Wilkinson, 2012 ; Lareau *et al.,* 2015). D'autre part, l'épissage alternatif peut spécifiquement conduire les ARNm vers leur dégradation *via* le NMD, en favorisant l'inclusion d'exons alternatifs possédant des codons stop (figure 27) (Huang et Wilkinson, 2012). L'analyse génomique comparative de l'épissage chez plusieurs organismes modèles indique que l'épissage alternatif est plus abondant chez les organismes multicellulaires que chez les organismes unicellulaires ce qui suggère qu'il contribuerait à la complexité phénotypique (Kim *et al.,* 2007). Ces analyses montrent également que le taux d'épissage alternatif n'est pas proportionnel au nombre de gènes. Par exemple, la souris et l'homme ont un nombre similaire de gènes (respectivement 22740 et 22180). Tandis que le l'épissage alternatif concerne 95 à 100% des gènes chez l'homme, il concerne seulement 63% des gènes chez la souris (tableau 7) (Lee et Rio, 2015).

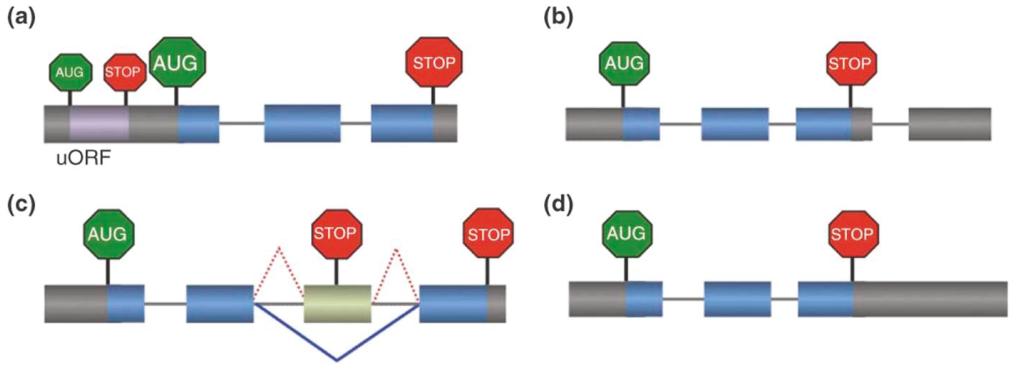

Figure 27 : Evénements induisant le mécanisme de "Non sense-mediated RNA decay" (NMD). NMD peut être obtenu par la présence (a) d'un cadre de lecture ouvert en amont (uORF), (b) d'un codon d'arrêt suivi d'un intron, (c) d'un événement d'épissage alternatif qui génère un codon de terminaison prématuré (PTC), ou (d) d'une longue région 3' UTR non traduite.

	Humain	Souris	Drosophile	Vers
taille du génome (MB)	3,300	3,300	165	100
gènes codant des protéines	22,180	22,740	13,937	20,541
Gènes multi-exoniques (2+isoformes)	21,144 (88%)	19,654 (63%)	11,767 (45%)	20,008 (25%)
Isoformes (moy/géne)	160,040 (7.0)	75,737 (3.3)	26,951 (1.9)	30,446 (1.5)
nombre moyen d'exons par gène (médiane)	30 (23)	19 (12)	7.5 (4)	8.4 (6)
nombre moyen d'introns par gène multi-éxonique (médiane)	28 (21)	19 (12)	7.2 (4)	7.2 (5)
Taille moyenne des exons	324 bp	333 bp	515 bp	223 bp
taille moyenne des introns	7,563 bp	6,063 bp	2,068 bp	561 bp
nombre de gènes	57,952	39,017	15,443	46,726
Isoformes (nombre moyen par gène)	195,501 (3.4)	94,647 (2.4)	29,173 (1.9)	56,820 (1.2)

Tableau 7 : Comparaison du niveau d'épissage chez plusieurs métazoaires bien étudiés (Lee et Rio, 2015).
(http://uswest.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Annotation and http://uswest.ensembl.org/Mus_musculus/Info/Annotation and http://uswest.ensembl. org/Drosophila_melanogaster/Info/Annotation and http://uswest.ensembl.org/Caenorhabditis_elegans/Info/Annotation)

2.1 Mécanisme moléculaire de l'épissage

2.1.1 La réaction d'épissage

La précision et l'efficacité de l'épissage sont liées à la présence de sites donneurs d'épissage (en 5' des introns) et accepteurs d'épissage (en 3' des introns) - séquences consensus dégénérées, à l'exception des nucléotides GT et AG situés respectivement en 5' et 3' de l'intron - et du point de branchement (PB), localisé quelques bases en amont du site accepteur 3' (Cartening *et al.,* 2002). La réaction d'épissage proprement dite s'accomplit en deux étapes, schématisées par la figure 28 (Chen et Cheng, 2012).

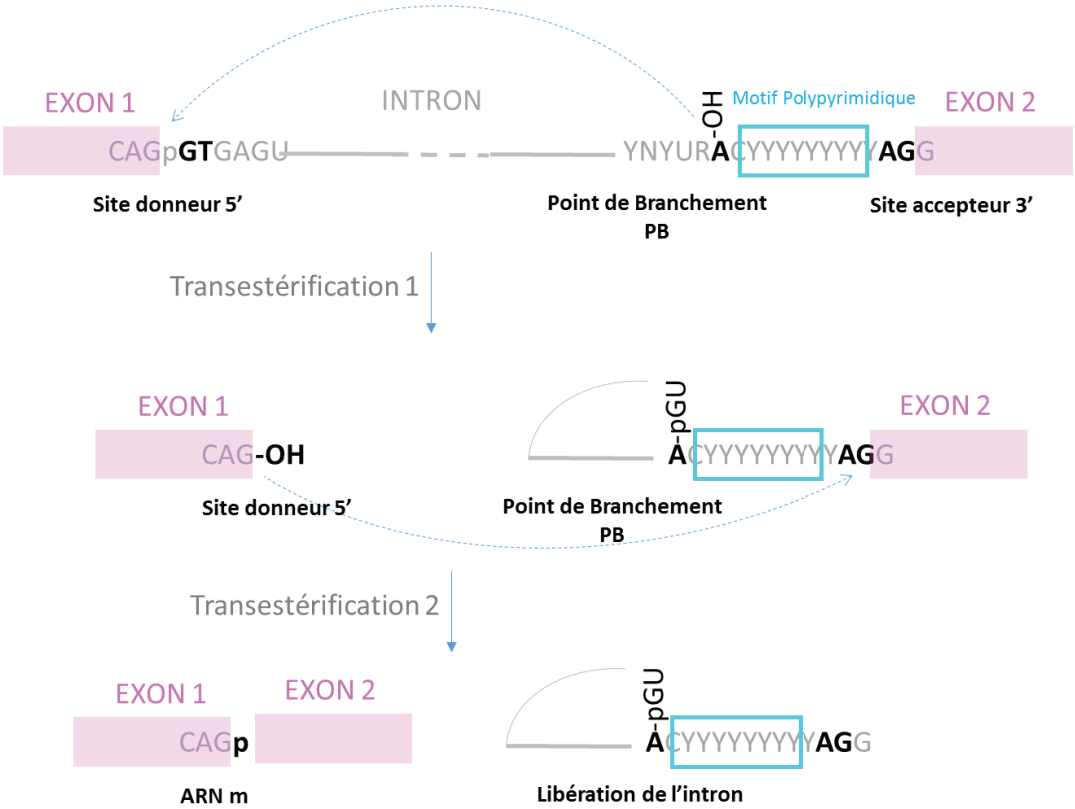

Figure 28 : Structure d'un ARN pré-messager et réaction d'épissage.
La première figure représente les différents motifs présents au niveau des introns nécessaires à la réaction d'épissage. En 5' de l'intron se trouve le site donneur d'épissage (GT), le site accepteur d'épissage est en 3' (AG), le point de branchement (A) et un motif polypyrimidique (YYYYYYYY). Les deux figures suivantes résument les 2 réactions de trans-estérification permettant la ligation des exons entre eux ainsi que la formation d'une structure en lasso (lariat) correspondant à l'intron éliminé. La première réaction met en jeu le point de branchement et le site donneur d'épissage en 5'. La seconde réaction fait intervenir l'extrémité 3'-OH libre de l'exon 1 et le site accepteur 3' (exon 2). Les flèches en pointillés représentent les attaques nucléophiles des phosphates des sites d'épissage par les groupements hydroxyles. (Adapté de chen et cheng, 2012).

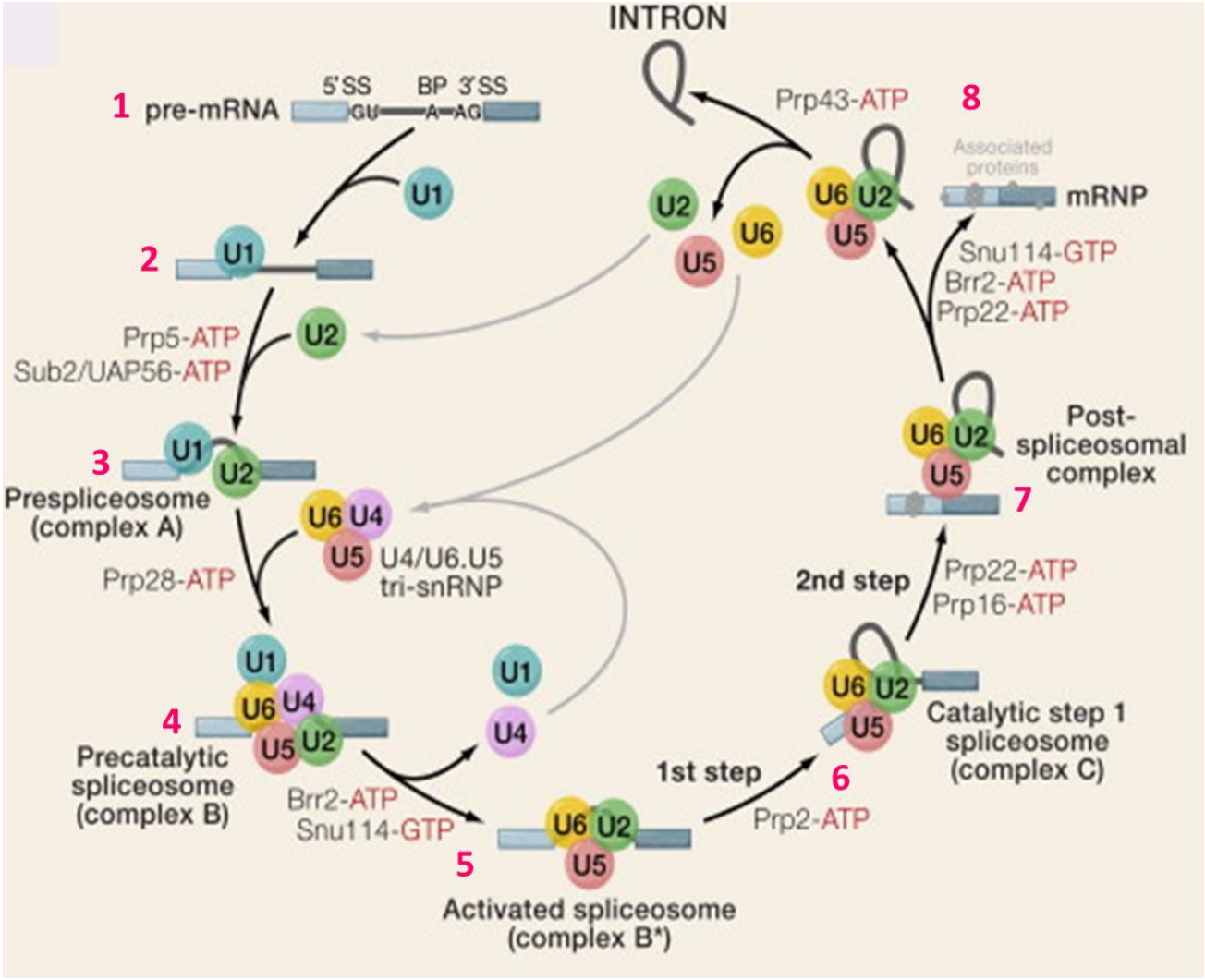

Figure 29 : Assemblage séquentiel du spliceosome. Les exons sont représentés par des rectangle bleus foncés et clairs. (1) ARN pré-messager, (2) le snRNP U1 interagit avec le site donneur 5', (3) le snRNP U2 s'associe au point de branchement , formant le complexe A, (4) U4/U5-U6 s'associent à l'ARN formant le complexe B, (5) relargage de U1 et U4 formation du complexe B catalytique actif, (6-7) réactions de trans-estérification successives, (8) ligation des exons entre eux et élimination de l'intron. (Adapté de Wahl *et al*., 2009)

2.1.2 Le spliceosome

L'épissage des ARN pré-messagers est catalysé par un complexe ribonucléprotéique de très grande taille appelé spliceosome. Ce complexe macromoléculaire regroupe cinq sous-complexes. Chaque sous-complexe est formé de petites ribonucléoprotéines nucléaires les 'Uridine-rich' snRNP ou U-snRNP (small nuclear RiboNucleoProtein Complex ; U1, U2, U4, U5 et U6) et de nombreuses protéines non-snRNP, dites protéines accessoires, telles que les protéines de la famille SR (sérine/arginine-riches) ou les protéines hnRNP (Will et Lührmann, 2011). Les U-snRNP sont les composants principaux du spliceosome. Chaque U-snRNP est composé d'un snARN ('small nuclear RNA') spécifique, de 7 protéines cœurs - SM (pour Smith, le nom du patient chez qui elles ont été découvertes) ou LSM (pour 'like SM') - et de 7 à 21 autres protéines aux fonctions diverses. Un grand nombre de ces protéines accessoires participe à l'épissage (Will et Lührmann., 2001).
Les U-snRNP participent à la reconnaissance des sites d'épissage et ont une fonction essentielle dans le mécanisme d'épissage car elles permettent les interactions snARN-ARN pré-messagers (Will et Lührmann, 2011). Des études réalisées *in vitro* montrent que l'assemblage du spliceosome est séquentiel et très dynamique (Brow, 2002). La figure 29 décrit l'assemblage séquentiel du spliceosome (Wahl *et al.,* 2009).

Plusieurs protéines jouent un rôle essentiel dans l'enchaînement de ces évènements. Elles sont divisées en trois classes :

- Les hnRNPs (pour 'heterogenous nuclear RiboNucleoProteins') ont un domaine de liaison à l'ARN de type RRM ou de type KH, ces protéines se fixent à l'ARN *via* les régions riches en pyrimidines qui précèdent le site 3' accepteur. Elles sont pour la plupart décrites comme inhibitrices de l'épissage alternatif, comme PTB (Polypyrimidine Tract Binding Protein). Toutefois, certaines peuvent être activatrices, comme par exemple hnRNP-H qui active l'épissage d'un ARN pré-messager de HIV-1 (Huelga*et al.,* 2012).
- Les protéines SR, qui tiennent leur nom d'un domaine C-terminal riche en sérines et en arginines, le domaine SR ; ce domaine d'interaction protéine–protéine est indispensable à la formation du spliceosome ; ces protéines sont

très conservées; elles sont requises lors de l'épissage constitutif et peuvent également influencer l'épissage alternatif ; les protéines SR présentent généralement un ou deux motifs RRM de liaison à l'ARN, qui leur confèrent leur spécificité (Cáceres et Kornblihtt, 2002 ; Änkö, 2014).

- Les protéines 'RNA binding' (RNABP), exprimées dans certains tissus ; elles comprennent les protéines NOVA, Rbfox et CELF (Darnell, 2013 ; Zhang *et al.,* 2008 ; Cáceres et Kornblihtt, 2002). Ces protéines agissent comme activateurs ou répresseurs de l'épissage (Lee et Rio, 2015).

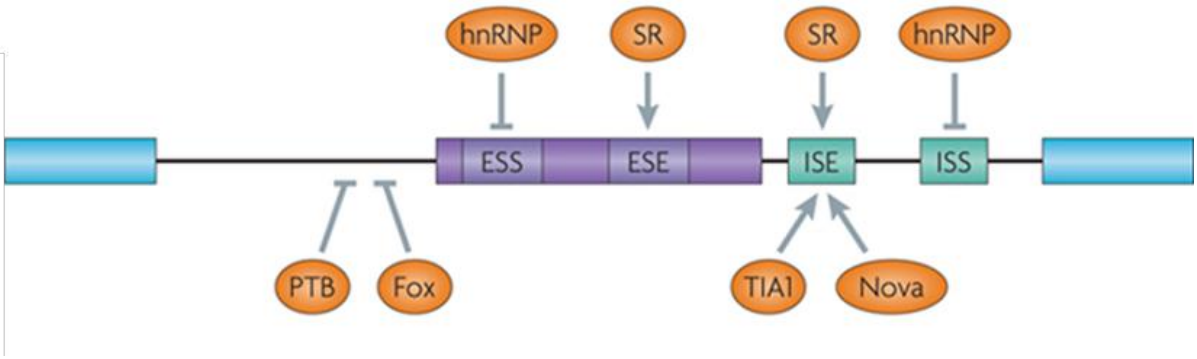

Figure 30 : Séquences cis-régulatrices impliquées dans la régulation de l'épissage alternatif. En plus des séquences d'épissage constitutives, des séquences régulatrices sont présentes dans les introns et les exons. Elles sont activatrices (ESE, ISE) ou inhibitrices (ESS, ISS). Le contrôle combinatoire des séquences cis-régulatrices et des facteurs régulateurs permet de réguler la reconnaissance des exons par les facteurs d'épissages généraux. (Keren *et al*, 2010).

2.2 Régulation de l'épissage

L'efficacité de l'épissage dépend de l'équilibre entre différents facteurs, comme des éléments *cis*-régulateurs, la transcription ou l'état de compaction de la chromatine (Luco *et al.,* 2011). Les étapes de reconnaissance et de sélection des sites d'épissage sont dépendantes de régions *cis*-régulatrices présentes sur l'ARN pré-messager. L'épissage alternatif résulte donc de la modulation de ces séquences *cis*-régulatrices par des facteurs *trans*-régulateurs. Les séquences *cis*-régulatrices sont classées selon leur localisation intron/exon et leur fonction inhibitrice/activatrice. Elles sont réparties en quatre catégories (figure 30) (Matlin *et al.,* 2005, Keren et al., 2010) : les séquences exoniques activatrices (ESE), les séquences exoniques inhibitrices (ESS), les séquences introniques activatrices (ISE) et les séquences introniques inhibitrices (ISS). Les séquences ESE sont souvent des sites de liaison des protéines SR (Graveley, 2000) alors que les séquences ESS, ISS et ISE sont reconnues par les protéines hnRNP (Pozzoli et Sironi 2005 ; Matlin *et al.,* 2005 ; Hung *et al.,* 2008). D'autre part, les séquences des sites d'épissage sont définies comme ayant une forte ou faible affinité (Yeo et Burge, 2004). Plus la séquence du site d'épissage est proche de la séquence consensus plus le site est considéré comme de forte affinité et inversement. En général, les sites d'épissage dits forts sont représentatifs d'un épissage constitutif. En revanche, les sites d'épissage dits faibles sont souvent liés à un épissage alternatif.

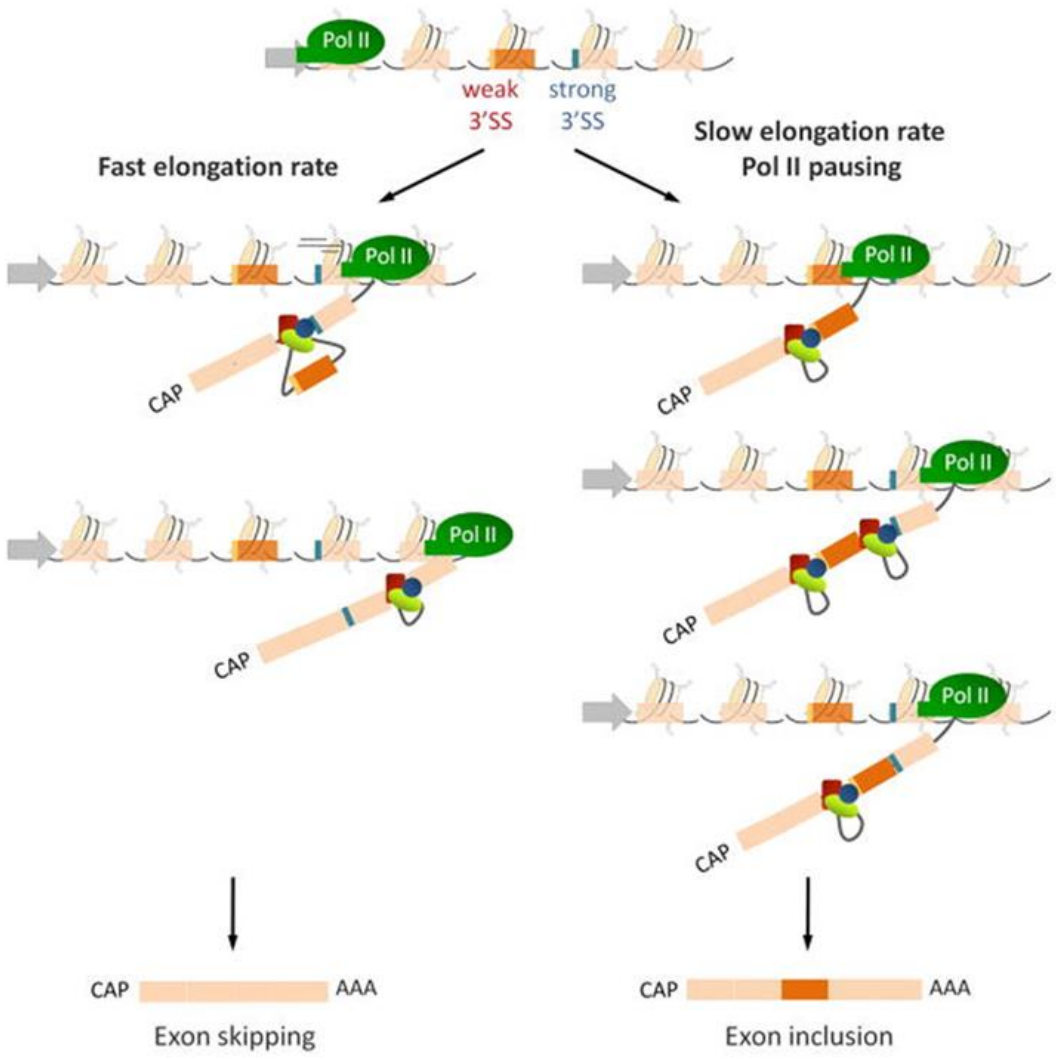

Figure 31 : Influence de la vitesse d'élongation de l'ARN pol II sur l'épissage alternatif. Lorsque le site 3' d'épissage de l'exon alternatif en amont est plus faible que le site de l'exon en aval, une vitesse d'élongation de la transcription rapide favorisera l'exclusion de l'exon alternatif (site faible). A l'inverse, une vitesse d'élongation lente permettra une meilleure reconnaissance du site 3' d'épissage faible favorisant ainsi l'inclusion de l'exon alternatif (Luco *et al,* 2011).

2.2.1 Influence de la transcription sur l'épissage

Au cours de la transcription, la machinerie d'épissage est très rapidement recrutée sur le transcrit naissant et l'épissage débute avant même que la synthèse de l'ARN ne soit terminée (l'épissage est dit co-transcriptionnel) (Luco *et al.,* 2011 ; Perales et Bentley., 2009). Plusieurs études ont montré une relation entre la vitesse d'élongation de la transcription par l'ARN pol II et la régulation de l'épissage alternatif (figure 31) (Kornblihtt *et al.,* 2004 ; Luco *et al.,* 2011). Des études menées en cellules humaines, sur le gène codant la fibronectine, montrent que la réduction de la vitesse de progression de l'ARN pol II favorise l'inclusion d'exons alternatifs (de la Mata *et al.,* 2003 ; Robson-Dixon et Garcia-Blanco, 2004). En effet, dans des cellules humaines pouvant exprimer une forme mutante de l'ARN pol II, moins rapide que la forme endogène et résistante à l' α-amanitine (inhibiteur de l'ARN pol II), l'inclusion de l'exon alternatif EDI présent dans le transcrit de la fibronectine est augmenté après inhibition par l'α-amanitine de l'ARN pol II endogène (de la Mata *et al.,* 2003). L'influence de la vitesse d'élongation de l'ARN pol II a également été mise en évidence chez la levure (Howe *et al.,* 2003). Des levures traitées par un inhibiteur de l'élongation de la transcription montrent une augmentation de l'inclusion d'exons normalement absents. A l'inverse, une augmentation de la vitesse d'élongation favorise l'exclusion de ces exons (Howe *et al.,* 2003). Chez la drosophile, des mutants présentant une vitesse d'élongation de la transcription plus lente (Chen *et al.,* 1996), ont un profil d'épissage du gène homéotique *Ultrabithorax* modifié. En effet, on observe, en condition mutante, une augmentation de l'un des transcrits d'*Ubx* par rapport au sauvage (De la Mata *et al.,* 2003). Ces résultats suggèrent que le ralentissement de la machinerie transcriptionnelle favorise l'épissage alternatif en permettant la formation de l'isoforme court de l'ARNm. Un ralentissement de l'élongation pourrait laisser plus de temps aux facteurs d'épissage pour sélectionner des sites d'épissage rares.

Les phosphorylations du domaine CTD de l'ARN pol II semblent également avoir une influence sur l'épissage. En effet, lorsqu'un gène normalement transcrit par l'ARN pol II est placé artificiellement sous le contrôle de l'ARN pol I ou de l'ARN pol III, la transcription a lieu mais le transcrit est très peu épissé (Luco *et al.,* 2010). De nombreux facteurs d'épissage interagissent avec le CTD de l'ARN pol II, comme les

protéines SR, le complexe snRNP U1, (Das *et al.,* 2007). L'association des facteurs d'épissage dépendrait de l'état de phosphorylation de celui-ci (Misteli et Spector, 1999).

2.2.2 Influence de la structure de la chromatine

Dans les années 90, Beckmann et Trifonov ont montré que la longueur des introns, comme celle des exons, est un multiple de 205 nucléotides, ce qui est très proche de la taille d'un nucléosome (Beckmann et Trifonov, 1991). Cette observation suggère qu'il existerait un lien entre épissage et structure de la chromatine (Beckmann et Trifonov, 1991). Plus tard, une étude à l'échelle du génome entier a révélé que les exons présentent un nombre plus important de nucléosomes comparé aux introns et ceci indépendamment du taux d'expression du gène (Andersson *et al.,* 2009 ; Tilgner *et al.,* 2009). De plus, des exons isolés par de très longs introns présentent une plus grande concentration de nucléosomes que des exons séparés par des introns plus petits (Spies *et al.,* 2009). En revanche, des exons à sites d'épissage de forte affinité présentent un taux d'occupation en nucléosomes plus faible que des exons à sites d'épissage de faible affinité (Tilgner *et al.,* 2009). Plus révélateur encore, les exons alternatifs les plus souvent utilisés seraient plus riches en nucléosomes que ceux qui le sont moins souvent (Schwartz *et al.,* 2009). Ceci suggère que les nucléosomes joueraient un rôle dans la régulation de l'épissage.

Des études menées *in vitro* ont montré que les nucléosomes forment un obstacle à la machinerie transcriptionnelle et augmentent ainsi localement le temps de pause de la polymérase. Il s'en suit que la reconnaissance de sites donneurs et accepteurs de plus faible affinité par des facteurs d'épissage est favorisée (Hodges *et al.,* 2009).

Chez la levure, l'histone acétyl-transferase GCN5 interagit avec U2 (Gunderson and Johnson, 2009) et l'histone arginine méthyl-transferase CARM1 interagit avec U1 (Ohkura *et al.,* 2005). Ceci suggère un rôle des modifications post-traductionnelles des histones dans l'assemblage du spliceosome sur l'ARN pré-messager, et renforce l'idée d'un rôle direct de la structure de la chromatine sur le recrutement des facteurs d'épissage (Gunderson et Johnson, 2009). En outre, chez la drosophile et chez l'homme, le complexe SWI/SNF joue un rôle dans l'épissage alternatif. Chez

l'homme, ce complexe interagit avec les complexes U1, U2 et U5 ainsi qu'avec les facteurs d'épissage PRP6 et Sam68 (Batché et Muchardt, 2006). Dans les cellules S2 de drosophile, une perte de SWI/SNF modifie l'abondance de transcrits alternatifs d'un sous-ensemble de gènes impliqué dans la régulation du développement et la mort cellulaire (Tyagi *et al.,* 2009).

2.2.3 Influence des modifications épigénétiques des histones

L'analyse, à l'échelle du génome, de 42 modifications post-traductionnelles des histones montre que certaines d'entre elles sont enrichies spécifiquement sur les exons par rapport aux introns (H3K36me3, H3K4me3, H3K27me2) (Kolasinska-Zwierz *et al.,* 2009 ; Spies *et al.,* 2009 ; Andersson *et al.,* 2009 ; Schwartz *et al.,* 2009) alors que d'autres sont réduites (H3K9me3) (Dhami *et al.,* 2010 ; Spies *et al.,* 2009). Ceci suggère un rôle de ces modifications des histones dans la régulation de l'épissage (Luco *et al*., 2010). Plusieurs études le corroborent. L'inhibition des histones désacétylases par le TSA dans des cellules humaines révèle une augmentation de l'exclusion de l'exon 18 du gène *NCAM* (Schor *et al.,* 2009). La marque épigénétique H3K9me3 semble jouer un rôle dans la régulation de l'épissage alternatif de l'ARN pré-messager du gène *CD44*. En effet, le gène *CD44* présente un taux d'enrichissement élevé de la marque H3K9me3 et de la protéine HP1δ sur les exons alternatifs (figure 32) (Saint-Andre *et al.,* 2011). La présence de H3K9me3 et HP1δ est corrélée avec l'augmentation de l'inclusion des exons alternatifs dans le transcrit de *CD44* (figure 32). Les auteurs suggèrent qu'une diminution locale de la vitesse de transcription faciliterait le recrutement de facteurs d'épissage spécifiques, favorisant la reconnaissance des exons alternatifs par le spliceosome et permettant leur inclusion.

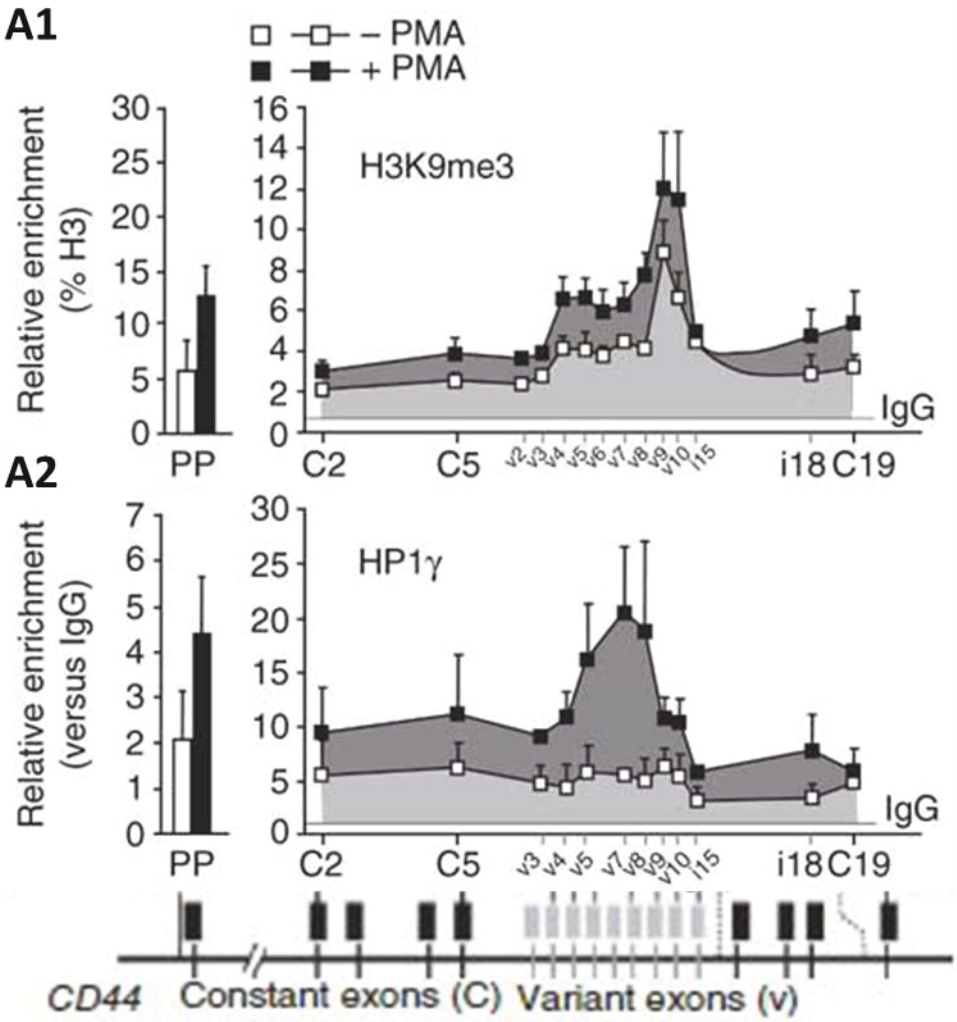

Figure 32 : H3K9me3 et HP1 sont enrichies au niveau des exons alternatifs de *CD44*. Expériences de CHIP qPCR réalisées à partir de chromatine issue de cellules HeLa. A1) Avec un anticorps dirigé contre H3K9me3, A2) avec un anticorps dirigé contre HP1. Les exons constitutifs et alternatifs sont représentés par des boîtes noires et grises, respectivement, sur la carte du gène *CD44* sous les graphiques. Le promoteur proximal (PP) correspond au site de début de transcription (St Andrée *et al*, 2011).

Chez l'homme, le gène *FGFR2* (*Fibroblast Growth Factor Receptor 2*) possède deux exons mutuellement exclusifs (IIIb et IIIc) utilisés dans différents tissus. L'exon IIIb est préférentiellement inclus dans les cellules PNT2s (cellules épithéliales de la prostate) alors que l'exon IIIc est exclusif dans les cellules hMSCs (cellules mésenchymateuses) (figure 33) (Carstens *et al.,* 2000 ; Wagner *et al.,* 2002).

L'inclusion ou l'exclusion de ces exons est régulée par la protéine PTB (Polypyrimidine Tract-Binding) qui se fixe à une séquence régulatrice inhibitrice près de l'exon IIIB. Une étude par immunoprécipitation de la chromatine de cette région montre que dans les cellules hMSCs, les marques H3K36me3, H3K4me1 sont enrichies sur cette séquence, contrairement aux marques H3K27me3, H3K4me3 et H3K9me1. L'inverse est observé dans les cellules PNT2 (Luco *et al.,* 2010). De façon intéressante, la modulation de ces modifications par surexpression, déplétion ou inhibition des méthyltransférases concernées change le profil d'épissage du gène *FGFR2* (Luco *et al*., 2010). Ces résultats indiquent qu'Il pourrait exister un rôle des marques épigénétiques dans la régulation de l'épissage alternatif.

D'autres études montrent que des modifications post-traductionnelles des histones pourraient jouer un rôle dans la régulation de l'épissage alternatif en recrutant directement ou non des facteurs d'épissage. Par exemple, la présence du facteur d'épissage PTB corrélerait avec la présence de certaines modifications d'histones, on parle d'épissage alternatif PTB-dépendant, comme pour le gène FGFR2. En effet, dans ces conditions, les exons exclus sont enrichis en H3K36me3 et pauvres en H3K4me3. De plus, de façon intéressante, une corrélation existe entre l'enrichissement de H3K36me3 et la présence de l'histone acétylase MRG15. Dans ce cas, la marque H3K36me3 présente au niveau des exons alternatifs serait reconnue par MRG15 qui à son tour serait reconnue par la protéine inhibitrice hnRNP 1 (ou PTB) permettant sa fixation sur le transcrit naissant au niveau de l'exon à exclure (Luco *et al.,* 2010).

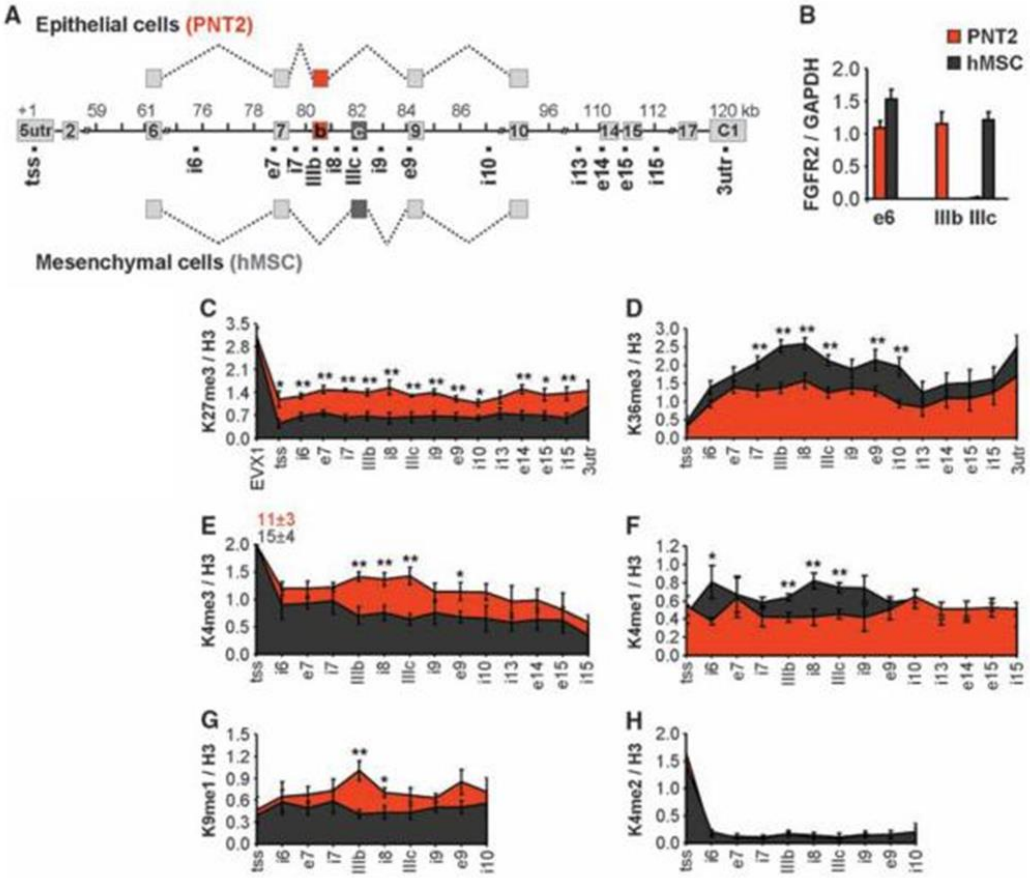

Figure 33: Epissage et modification d'histones spécifiques. (A) Représentation schématique du gène *FGFR2* humain. L'exon IIIb (rouge) est inclus dans les cellules épithéliales PNT2, l'exon IIIc (noir) est inclus dans les cellules hMSCs. Les points carrés indiquent les couples d'oligonucléotides utilisées pour l'analyse. (B) Les niveaux d'expression de l'exon inclus de *FGFR2* par rapport à GAPDH dans les cellules PNT2 (rouge) ou hMSCs (noir) déterminés par PCR quantitative. Enrichissement des marques d'histones (C) H3K27me3, (D) H3K36me3, (E) H3K4me3, (F) H3K4me1, (G) H3K9me1, et (H) H3K4me2 sur *FGFR2* dans les cellules PNT2 (rouge) et hMSC (noir) réalisé par ChIP qPCR. Le pourcentage d'Input a été normalisé par rapport à H3 non modifié. * P <0,05, ** P <0,01, test t de Student (Luco *et al,.* 2010)

D'autres exemples semblables de systèmes de régulation commencent à émerger (figure 34) : La protéine à chromodomaine CHD1 qui reconnaît la marque H3K4me3 est capable de recruter des facteurs d'épissage comme des composants de U2snRNP. En effet, des études réalisées en cellules humaines montrent qu'une baisse du niveau d'expression de *Chd1,* par ARN interférant, ou une diminution de la marque H3K4me3 entraîne une réduction de l'association entre SF3, composant de U2snRNP, et les ARN pré-messagers. Une altération de l'épissage alternatif est également constatée (Sims *et al.,* 2007). La protéine GCN5 se lie aux histones H3 acétylées et permet de recruter des composants de U2snRNP (Li et Shogren-Knaak, 2009). Enfin, HP1 pourrait servir d'adaptateur en se liant à H3K9me3 et à des facteurs d'épissage comme la protéine SRSF1 ou hnRNP (Loomis *et al.,*2009 ; Piacentini *et al.,* 2009).

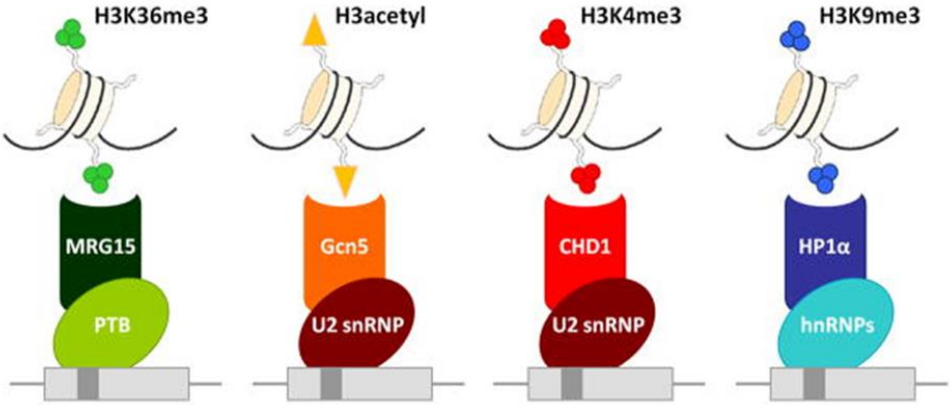

Figure 34 : Complexes adaptateurs entre la chromatine et les facteurs d'épissage.
Plusieurs protéines de la chromatine reconnaissent et fixent des marques d'histones et interagissent avec les facteurs d'épissage (Luco *et al.,* 2010; Sims *et al.,* 2007; Gunderson et ohnson, 2009; Piacentini *et al.,* 2009; Loomis *et al.,* 2009).

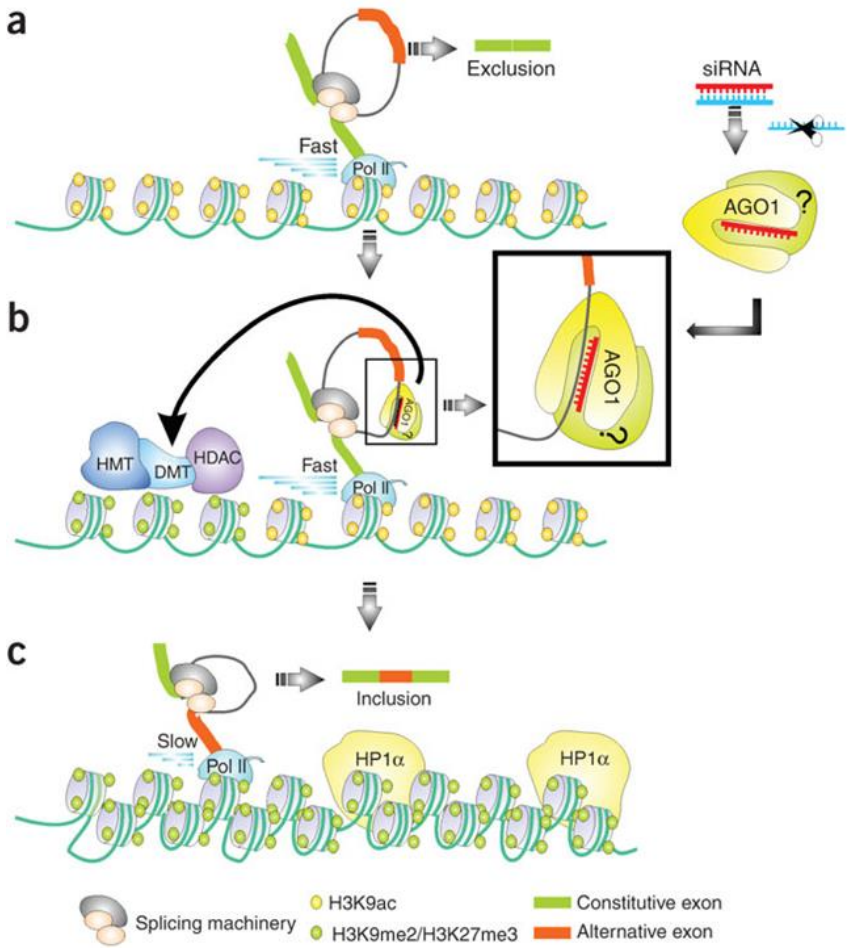

Figure 35 : Influence des siARN dans l'épissage alternatif. (a) En l'absence de siARN, une organisation nucléosomique relachée caractérisée par la marque H3K9 acétylée (H3K9ac; cercles jaunes) favorisant une élongation de la transcription rapide et l'exclusion de l'exon alternatif (rouge). (b) La transfection de siARN ciblant l'intron en aval de l'exon alternatif favorise la diméthylation et la triméthylation de H3K9 et H3K27, respectivement (cercles verts). (c) les méthylations de H3K9 et H3K27 se propagent, favorisant le recrutement de HP1a induisant la compaction de la structure de la chromatine et un ralentissement de l'ARN Pol II, provoquant l'inclusion de l'exon alternatif. (Allo *et al*., 2009).

2.2.4 Influence d'ARN non codants

Récemment, il a été montré que des ARN non codants peuvent également influencer l'épissage alternatif en participant à la régulation de l'expression de facteurs d'épissage ou en modifiant localement leur concentration. Par exemple, le micro-ARN 124 (miR-124), spécifique des neurones, entraîne la dégradation des transcrits du facteur d'épissage PTB (Makeyev *et al.,* 2007). Une diminution de PTB entraîne une modification du profil d'épissage, aboutissant à la différenciation neuronale. Certains siARN sont également impliqués dans la régulation de l'épissage alternatif. Dans des cellules de mammifères, un siARN complémentaire du transcrit du gène codant la fibronectine permettrait l'inclusion de l'exon alternatif EDI en favorisant localement la compaction de la chromatine (figure 35) (Allo *et al.,* 2009).

2.2.5 Influence d'autres protéines sur l'épissage

Comme nous l'avons vu précédemment, le spliceosome est caractérisé par une grande plasticité de sa composition. Chez l'homme par exemple, on dénombre plus de 50 protéines associées aux différents snRNPs et plus de 100 protéines non snRNP, indépendantes ou associées en complexes auxiliaires (complexe d'assemblage d'exons, complexe de fixation de la coiffe, complexe de rétention et d'épissage…).

De nombreuses protéines initialement étudiées pour leur rôle dans des processus cellulaires ou moléculaires autres que l'épissage, s'avèrent impliquées dans l'épissage. Voici quelques exemples :

Chez *Drosophila melanogaster*, la protéine Ecdysoneless (Ecd) intervient dans la synthèse des hormones stéroïdes. Ecd interagit également avec plusieurs sous-unités du complexe snRNP U5, en particulier les sous-unités Prp8 et Aar2. Ces interactions empêchent l'épissage du premier intron du transcrit du gène *CYP307A2*/*spookier* (*spok*), intermédiaire de la voie de synthèse de l'ecdysone. Ceci entraîne le blocage de la synthèse d'ecdysone et donc celui de la métamorphose (Claudius *et al.,* 2014).

MLE, homologue de l'ARN hélicase A des mammifères, appartient au complexe de compensation de dose, MSL, qui, chez la drosophile, maintient une hyperactivité des gènes du chromosome X chez le mâle. La présence de la sous-unité MLE dans les

cellules somatiques femelles a poussé une équipe à approfondir son rôle. Dans les cellules S2 (femelles), MLE interagit avec trois hnRNP : Pep (Protein on ecdysone puffs), Hrb87F (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein at 87F) et Hrb98DE (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein at 98DE) (Cugusi *et al.,* 2015). D'autre part, Pep et Hrb87F sont présents en de nombreux sites actifs du génome, dont les « puffs » induits par l'ecdysone où la protéine HP1 est également présente. De façon intéressante, MLE a une localisation similaire. De plus, en contexte mutant pour MLE ces études montrent une modification du niveau de transcription pour certains gènes (*Eip74EF*, *BR-C*) contrôlés par l'ecdysone. Les auteurs proposent que l'activité hélicase de MLE facilite la modification de la structure secondaire de l'ARN et ainsi permet l'accès aux facteurs d'épissage.

Trois études indépendantes ont montré, chez l'homme, la drosophile et la levure, que le complexe SWI/SNF est impliqué dans la régulation de l'épissage alternatif d'exons faiblement épissés. Des interactions avec les protéines d'épissage, Prp2 chez la levure (Patrick *et al.,* 2014), Prp6 et Sam68 chez l'homme (Batsché *et al.,* 2006), et Hrp45 et Y12 chez la drosophile (Tyagi *et al*., 2009) diminueraient la vitesse d'élongation de l'ARN pol II favorisant ainsi le recrutement de facteurs d'épissage sur les sites accepteurs et receveurs de faible affinité (Batsché *et al.,* 2006 ; Patrick *et al.,* 2014).

Chapitre IV – Cycline G

Les cyclines représentent une grande famille de protéines qui contrôlent la progression des cellules à travers le cycle cellulaire par l'activation de kinases, les « Cyclin-Dependent Kinases » (CDK). Ces protéines sont structurellement définies par la présence d'un domaine très conservé, le domaine Cycline (Errico *et al*., 2010). Beaucoup de cyclines ont deux domaines cyclines, un domaine amino-terminal impliqué dans la liaison aux CDK, et un domaine carboxy-terminal impliqué dans le repliement de la cycline (Malumbres, 2014). Les cyclines sont regroupées en trois groupes : le groupe I composé des cyclines A, B, D, E, F, G, J, I et O, ces cyclines jouent un rôle essentiel dans le cycle cellulaire (Ma *et al.,* 2012), le groupe II formé de Cycline Y, cycline exprimée dans des tissus différenciés, et le groupe III qui rassemble les Cyclines C, H, K, L et T, principaux partenaires de CDK impliqués dans le contrôle de la transcription (Cao *et al*., 2014 ; Ma *et al.,* 2012).

1. Les Cyclines G

1.1 Chez les vertébrés

Chez les vertébrés, il existe deux Cyclines G, Cycline G1 et Cycline G2. Leur rôle dans le cycle cellulaire est encore mal connu.

1.1.1 Cycline G1 (CCNG1)

Cycline G1 a été identifiée lors de deux cribles : le premier visait à identifier des kinases de la famille SRC (Tamura *et al.,* 1993), le deuxième visait à découvrir des cibles transcriptionnelles du suppresseur de tumeurs P53 (Okamoto et Beach, 1994). Cette cycline possède un domaine cycline typique et un site potentiel de phosphorylation des récepteurs aux facteurs de croissance épidermiques dans sa partie C-terminale. Elle ne présente pas de boîte de destruction et n'a pas de séquence PEST, séquence généralement impliquée dans la dégradation des

protéines *via* le protéasome. CCNG1 est principalement nucléaire et est exprimée pendant tout le cycle cellulaire. Son expression est variable selon le type cellulaire et au cours du développement (Horne *et al.,* 1996 ; Reiner *et al.,* 1999). Enfin, elle interagit avec deux kinases : GAK (« Cyclin-associated kinase ») et CDK5 (Kanaoka *et al .,* 1997)

Cycline G1 contrôle négativement le cycle cellulaire. En effet, *CCNG1*, qui code Cycline G1, est induit après lésion de l'ADN, entraînant un arrêt du cycle cellulaire en G2/M (Okamoto et Prives, 1999 ; Kimura *et al.,* 2001). *CCNG1* est une cible directe du suppresseur de tumeur p53 (Okamoto et Beach, 1994). D'autre part, CCNG1 peut également avoir un rôle positif sur le cycle cellulaire. Il a été montré que *CCNG1* est surexprimé dans certains cancers et que sa surexpression dans des cellules de carcinome induit une prolifération cellulaire (Reimer *et al.,* 1999 ; Kwon *et al.,* 2008). Par ailleurs, la surexpression de *CCNG1* semble inhiber certains points de contrôle du cycle cellulaire. Par exemple, la surexpression de *CCNG1* dans des cellules cancéreuses inhibe le point de contrôle G2/M en activant le complexe Cycline B/CDK1 (Seo *et al.,* 2006). La surexpression de *CCNG1* permet également de passer le point de contrôle G1/S en inhibant RB (Smith *et al.,* 1997).

1.1.2 Cycline G2 (CCNG2)

CCNG2 possède 53% d'identités et 72% de similarités avec *CCNG1* (Horn *et al.,* 1996). Contrairement à CCNG1, CCNG2 présente en C-terminal un domaine PEST qui pourrait induire sa dégradation par le protéasome (Horne *et al* ., 1997). *CCNG2* n'est pas une cible transcriptionnelle de p53. CCNG2 est présente dans le noyau mais elle est majoritairement cytoplasmique. Elle varie au cours du cycle cellulaire et présente un pic en fin de phase S et en début de phase G2 (Horne *et al.,* 1997). D'autre part, Cycline G2 est associée aux centrosomes et intervient dans la stabilité et la croissance des microtubules (Arachchige Don *et al.,* 2006).

Cycline G2 semble avoir un effet inhibiteur sur le cycle cellulaire. En effet, *CCNG2* est sous-exprimé dans certains cancers et sa surexpression induit un arrêt du cycle cellulaire en G1/S (Kim *et al.,* 2004 ; Stossi *et al.,* 2006). Par ailleurs, dans des cellules murines, en présence d'inhibiteurs de prolifération ou d'inducteurs d'apoptose, le gène *CCNG2* est surexprimé (Horne *et al.,* 1997 ; Bennin *et al.,* 2002).

1.2 Chez *Drosophila melanogaster*

La drosophile ne possède qu'un seul gène codant pour une Cycline G (*CycG*). Il a été isolé lors de deux cribles double-hybride indépendants dirigés contre des régulateurs transcriptionnels de la famille des Enhancers de Trithorax et Polycomb, Corto et ASX (Salvaing *et al.,* 2008a ; Salvaing *et al.,* 2008b ; Gildea *et al.,* 2000 ; Dupont et al., 2015). *CycG* est exprimé de façon ubiquitaire au cours du développement et dans tous les tissus. *CycG* est essentiel au développement, son inactivation par ARN interférence au cours du développement induit une forte létalité (31% chez les femelles et 56% chez les mâles). L'analyse du domaine cycline de Cycline G montre une grande similitude avec celui de CCNG1 et CCNG2, respectivement 42% et 46% (Salvaing *et al.,* 2008a). En outre, Cycline G contrairement à ses homologues vertébrés possède un domaine N-terminal, qui semble avoir été acquis chez les diptères. Ce domaine pourrait donc lui conférer des fonctions spécifiques chez ces espèces.

Cycline G possède, comme CCNG2, un domaine PEST en C-terminal qui pourrait constituer un domaine d'adressage au protéasome.

1.2.1 Cycline G et le cycle cellulaire

Cycline G semble avoir un effet inhibiteur sur la croissance cellulaire et le contrôle du cycle cellulaire. En effet, lorsque l'on surexprime *CycG* de façon ubiquitaire, les mouches adultes présentent un retard de développement et ont une taille et un poids réduits par rapport aux mouches sauvages. D'autre part, la surexpression ubiquitaire de *CycG* entraîne une forte diminution de la taille des cellules de l'aile. A l'inverse, en contexte d'inactivation de *CycG* la taille des cellules de l'aile est

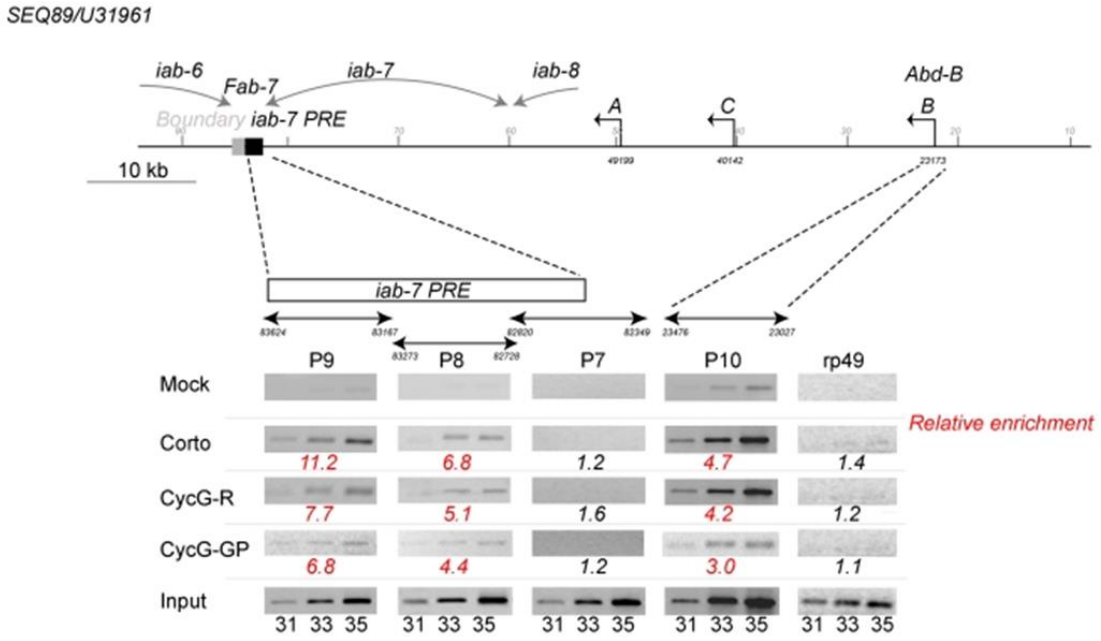

Figure 36 : Corto et Cyclin G se fixent sur le PRE *iab-7* et sur le promoteur d'*Abd-B*. Représentation du locus *Abd-B* (SEQ89 / U31961). Expérience de CHIP réalisée contre Corto ou CycG à partir de chromatine totale. Amplification à partir de l'ADN de l'immuno-précipité : région de l'iab-7 PRE (p9, p8) et chevauchant l'iab-7 PRE (p7) ou promoteur d'Abd-B B (p10). Un fragment du gène *rp49* a été utilisé comme témoin négatif. L'enrichissement relatif représente le rapport entre Corto ou CycG immunoprécipitations et le mock. L'input montre l'amplification de l'ADN de la chromatine totale avec les mêmes amorces. L'iab-6, iab-7 et 8 iab-cis-régulatrices domaines sont indiqués. (Salvaing *et al,.* 2008)

augmentée (Faradji *et al.,* 2011 ; Faradji *et al.,* 2014). Ces données suggèrent un rôle négatif de Cycline G dans le contrôle de la croissance cellulaire. De plus, la surexpression de *CycG* dans le compartiment postérieur du disque imaginal d'aile, entraîne une diminution de sa taille par rapport au compartiment antérieur. La réduction de taille de ce compartiment est également associée à une diminution du nombre et de la taille des cellules. De façon intéressante, le phénomène n'est pas associé à de l'apoptose. L'expression de *p35*, inhibiteur de l'apoptose, ne restaure pas la taille du compartiment postérieur (Faradji *et al.,* 2011 ; Faradji *et al.,* 2014). L'ensemble de ces données suggére que Cycline G régule négativement la prolifération et la croissance cellulaire pendant le développement.

D'autre part, il a été montré qu'en contexte de surexpression de *CycG* la transition G1/S est freinée et la phase S est ralentie (Faradji *et al.,* 2011 ; Faradji *et al.,* 2014). De façon intéressante, la dérégulation de *CycG* montre une perte de corrélation entre la croissance et la prolifération cellulaire (Faradji *et al.,* 2011 ; Faradji *et al.,* 2014). Il a également été mis en évidence par des expériences de co-immunoprécipitation que Cycline G interagit avec CDK4 et CDK2. Or, les complexes Cycline D/CDK4 et Cycline E/CDK2 régulent respectivement la croissance cellulaire au cours de la phase G1 et l'entrée en phase S. La surexpression de *Cyc*G pourrait perturber ces complexes par compétition.

1.2.2 Cycline G et la transcription

Comme les Cyclines C, K, H et T, Cycline G joue un rôle dans la régulation de la transcription. Cycline G interagit physiquement, *via* son domaine N-terminal, avec le facteur chromatinien de la famille des « enhancers de trithorax et Polycomb » Corto (Salvaing *et al.,* 2008). De plus, *CycG* et *corto* sont impliqués dans la régulation de l'expression du gène homéotique *Abdominal-B* (*AbdB*) dans l'épithélium de jeunes pupes. *Corto* réprimerait et *CycG* activerait l'expression d'*AbdB* (Salvaing *et al.,* 2008). En outre, en embryons, Cycline G et Corto sont présentes sur le PRE *iab-7* et sur le promoteur d'*AbdB* (figure 36) (Salvaing *et al*., 2008).

Par ailleurs, Cycline G co-localise en de nombreux sites avec l'ETP Corto et la protéine PcG PH sur les chromosomes polytènes de glandes salivaires larvaires, se qui suggére que les cibles transcriptionnelles de cycline G sont nombreuses (Salvaing *et al.,* 2008).

1.2.3 Cycline G et l'homéostasie de développement

Comme je l'ai précisé précédemment, chez la drosophile, une surexpression ubiquitaire du gène *Cyclin G* (*CycG*) induit une augmentation très forte de l'AF de taille et de forme des ailes (figure 37), Cycline G jouerait un rôle dans la stabilité du développement (Debat *et al.,* 2011 ; Debat et Peronnet, 2013). L'analyse cellulaire des ailes montre que la croissance et la prolifération ne sont plus coordonnées. Ceci suggère que la compensation croissance cellulaire/prolifération cellulaire serait un des processus importants pour la stabilité du développement (Debat *et al.,* 2011 ; Debat et Peronnet, 2013).

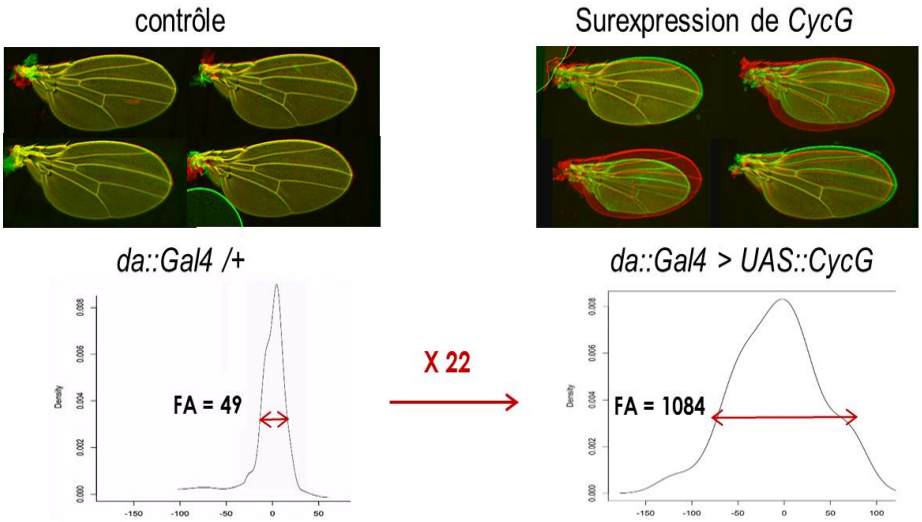

Figure 37 : Asymétrie fluctuante très élevée en contexte de surexpression de *CycG.* A gauche superposition des ailes gauches (vert) et droites (rouge) chez une mouche contrôle et mesure de l'AF. A droite superposition des ailes gauches (vert) et droites (rouge) en contexte de surexpression de *CycG*, l'AF est augmentée d'un facteur 22. (Debat *et al,* 2011).

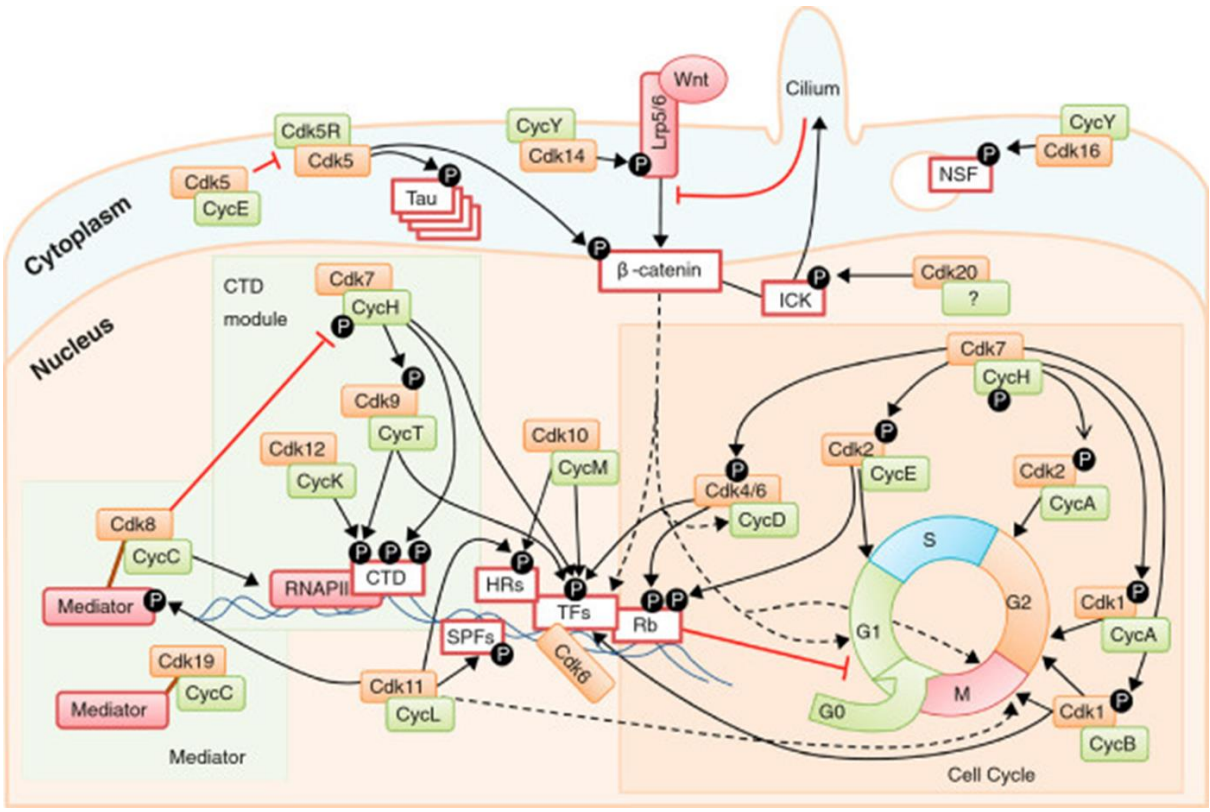

Figure 38 : Aperçu des fonctions des complexes Cycline/CDK dans la cellule.
Chaque CDK (carrés orange) est représenté en complexe avec son partenaire majeur (vert) - pour plus de clarté, seuls quelques substrats sont représentés.
La plupart des CDK fonctionnent dans le noyau (fond orange), certains complexes Cycline / CDK sont attachés à la membrane cellulaire ou ont une activité cytoplasmique (fond bleu). Les CDK Classiques du cycle cellulaire : Cdk4, Cdk6, Cdk2 et Cdk1 – elles régulent les transitions à travers les différentes phases du cycle cellulaire. Ces activités sont au moins partiellement médiés par le contrôle de plusieurs facteurs de transcription ou des éléments de régulation tels que la protéine du rétinoblastome (Rb). CDK10 et Cdk11 contrôlent également la transcription en phosphorylant des facteurs de transcription, des récepteurs hormonaux et les régulateurs associés (HR), ou des facteurs d'épissage. CDK7, CDK9 et CDK12 phosphorylent directement le domaine C-terminal (CTD) de l'ARN polymérase II (ARNPII), modulant ainsi les différentes phases de la transcription. Le complexe Mediator est spécifiquement régulé par CDK8 ou CDK19. CDK7 phosphoryle directement plusieurs des CDK mentionnés ci-dessus. Cdk5 a de nombreuses fonctions dans la cellule, mais son rôle majeur est le contrôle spécifique de protéines telles que Tau (neurones). Cdk14 et Cdk16 sont activés à la membrane par la cycline Y, ils participent également à de nombreuses voies de signalisation. Il est important de noter que, par souci de clarté, de nombreuses interactions entre CDK et d'autres partenaires, des substrats ou des processus cellulaires ne sont pas représentés.
(Malumbres, 2014).

1.3 Le contrôle de la transcription par les Cyclines

Les complexes Cycline/CDK interviennent à de nombreux niveaux comme le montre la figure 38 (Malumbres, 2014). Notamment, certaines CDK phosphorylent le CTD de l'ARN pol II et sont ainsi impliquées dans la régulation de la transcription. C'est le cas de Cycline H/CDK7, Cycline T/CDK9, Cycline K/CDK12 et Cycline C/CDK8 (figure 39) (Lania *et al.,* 1999 ; Loyer *et al.,* 2008, Malumbres, 2014). Contrairement aux cyclines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, les cyclines liées à la régulation transcriptionnelle ont une expression continue au cours du cycle (Adamczewski *et al.,* 1996 ; Garriga *et al.,* 1998 ; Nigg, 1996 ; Rickert *et al.,* 1996).

1.3.1 Cycline H/CDK7

CDK7 est une des dix sous-unités du facteur de transcription TFIIH qui phosphoryle les sérines 5 et 7 du CTD pendant la phase d'initiation de la transcription induisant une pause transcriptionnelle (figure 39) (Larochelle *et al.,* 2012). Cette étape, comme nous l'avons vu précédemment, sert de point de contrôle pour le recrutement des protéines impliquées dans les processus de maturation des transcrits et des facteurs d'élongation. CDK7 active CDK9 en la phosphorylant (figure 38). La phosphorylation de CDK 9 permet l'entrée en phase d'élongation productive (Brès *et al.,* 2008).

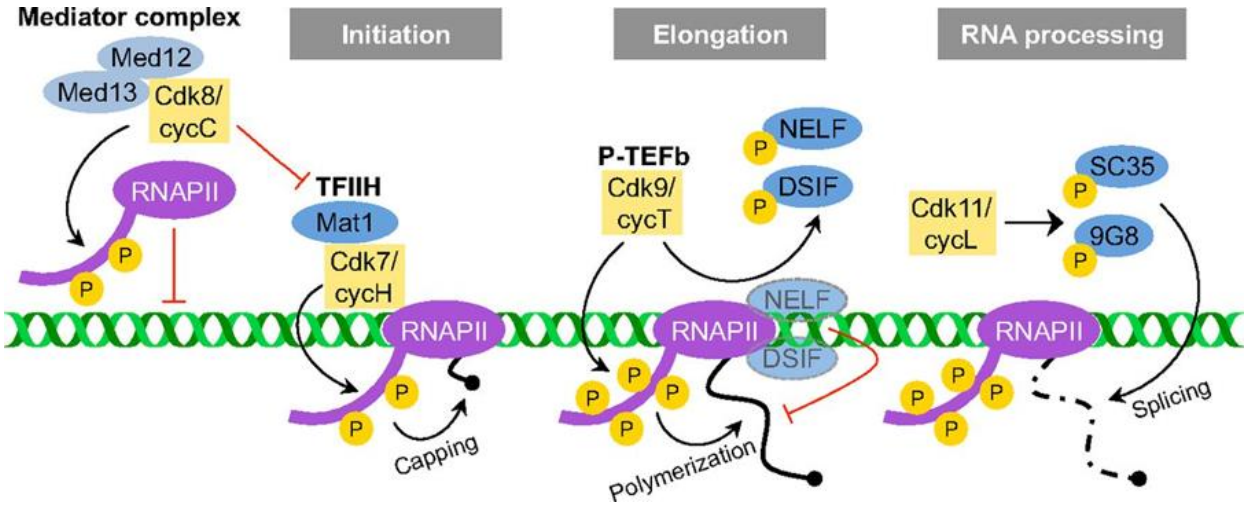

Figure 39 : Complexes Cycline / CDK impliqués dans la régulation de la transcription. Le complexe Cycline C/CDK8 fait partie du complexe Mediator, qui inhibe la transcription (1) en phosphorylant le CTD de l'ARN pol II empêchant ainsi son recrutement et (2) en phosphorylant la Cycline H régulant ainsi négativement l'activité de TFIIH. Le complexe Cycline T/CDK9 fait partie du facteur P-TEFb, qui favorise l'entrée en phase de transcription productive par (1) phosphorylation des facteurs NELF et DSIF pour libérer le blocage du complexe d'élongation et (2) phosphorylation du CTD de l'ARN pol II. Le complexe Cycline L/CDK11 interagit avec plusieurs facteurs d'élongation de la transcription facilitant celle-ci (Ell2, TFIIF, TFIIS et FACT). Cycline L/CDK11 est impliqué dans la maturation des ARN pré-messagers en phosphorylant des facteurs d'épissage comme SC35 (Srfs2) et 0G8 (Srfs7). (Lim et Kaldis, 2013)

1.3.2 Cycline T/CDK9

CDK9 est la sous-unité catalytique du facteur d'élongation P-TEFb, formé d'un dimère Cycline T/CDK9 (Peng *et al.,* 1998). L'activité du complexe P-TEFb est régulée par l'acétylation de la Cycline T (Cho *et al.,* 2009). Le complexe Cycline T/CDK9 est impliqué dans la régulation de l'élongation de la transcription en maintenant l'état de phosphorylation du CTD (Marshall *et al.,* 1996). En effet, la phosphorylation de la sérine 2 du CTD par P-TEFb permet la levée de la pause transcriptionnelle et l'entrée en phase d'élongation processive (Peterlin et Price, 2006). Des études récentes chez la drosophile et en cellules humaines, suggèrent que CDK12 en complexe avec Cycline K serait également capable de phosphoryler la sérine 2 du CTD (figure 38) (Bartkowiak *et al.,* 2010). Cependant, le complexe Cycline K/CDK12 serait spécifique du contrôle de la transcription des gènes impliqués dans la réponse aux lésions de l'ADN (Blazek *et al.,* 2011).

1.3.3 Cycline C /CDK8

Le Complexe Cycline C/CDK8 joue un rôle double dans la régulation de la transcription (Nemet *et al.,* 2014). En association avec MED12 et MED13, il forme un des modules du complexe Mediator (figure 39) (Carlsten *et al.,* 2013). Ce module répond à de nombreux signaux intracellulaires et est souvent associé à la répression de la transcription. En effet, il phosphorylerait la sérine 5 du CTD prématurément, empêchant ainsi la formation du complexe de pré-initiation de la transcription (Hengartner *et al.,* 1998). De plus, CDK8 module l'activité de CDK7 en phosphorylant la Cycline H, bloquant ainsi l'activité de CDK7 et inhibant l'initiation de la transcription (figure 39) (Egly et Coin, 2011). Cependant, CDK8 a des multiples cibles et phosphoryle de nombreux facteurs de transcription, comme TFIID, Med2, Sip4, affectant leur activité (Ansari *et al.,* 2002 ; Vincent *et al.,* 2001 ; Hallberg *et al.,* 2004). Il pourrait également induire la dissociation du complexe de pré-initiation de la transcription, favorisant l'entrée en élongation (Liu *et al.,* 2004).

1.3.4 La Cycline L

Cycline L s'associerait avec les CDK11, 12 et 13 et jouerait un rôle dans la régulation de l'épissage (Loyer *et al.,* 2008 ; Chen *et al.,* 2008 et 2009). D'autre part, en plus du domaine cycline, Cycline L possède un domaine RS comme les protéines SR impliquées dans l'épissage. Son mode de fonctionnement dans la régulation de l'épissage est encore mal connu. Mais des expériences réalisées chez la souris montrent que Cycline L s'associerait avec l'ARN pol II hyperphosphorylée et le facteur d'épissage SC-35 (figure 39) (Dickinson et al., 2002 ; Berker et al., 2001 ; Boucher et al., 2001)

Chapitre V – Présentation du projet de thèse

Cycline G est un régulateur transcriptionnel. Cette Cycline joue un rôle dans le contrôle de la transcription du gène homéotique *AbdB* (Salvaing *et al.,* 2008b). De plus, elle est présente en de nombreux sites sur les chromosomes polytènes des glandes salivaires larvaires ce qui suggère que ses cibles transcriptionnelles sont nombreuses. Elle co-localise avec les protéines PH et Corto en de très nombreux sites sur les chromosomes polytènes, ce qui indique que Cyline G agirait avec ces facteurs chromatiniens. Cycline G serait également impliquée dans la stabilité du développement (Debat *et al.,* 2011, Debat et Peronnet, 2013). L'objectif de ma thèse a été d'analyser le rôle de Cycline G dans le contrôle de la transcription et de déterminer si cette fonction de régulateur transcriptionnel participe au maintien de la stabilité du développement.

Pour cela, j'ai analysé la localisation de Cycline G, sur les chromosomes polytènes, par rapport à des marques épigénétiques particulières reflétant la répression ou l'activation transcriptionnelle. J'ai déterminé, par une analyse du transcriptome (RNAseq), l'ensemble des cibles transcriptionnelles de Cycline G dans un tissu en prolifération, le disque imaginal d'aile au 3ème stade larvaire.

Afin d'approfondir le rôle que jouerait Cycline G dans la stabilité du développement, j'ai étudié l'importance du domaine d'interaction avec les ETP de Cycline G dans la stabilité du développement. Nous avons également testé l'effet d'une série de mutations pour des gènes PcG et trxG sur l'AF induite par la surexpression de *CycG*. Enfin, un grand nombre de partenaire de Cycline G est impliqué dans l'épissage. Nous nous sommes demandé si le rôle de cette Cycline dans la stabilité du développement pouvait être lié à un défaut d'épissage. Pour cela, nous avons testé l'effet de mutations ou de la surexpression de gènes codant des facteurs d'épissage sur l'AF induite par *CycG*.

RESULTATS

ARTICLE I

Cycline G et l'entretien épigénétique de l'expression des gènes au cours du développement, chez la drosophile

Dans cet article, nous étudions d'autres implications de Cycline G dans le maintien épigénétique de l'expression des gènes. En effet, nous avons montré que Cycline G co-localise en de nombreux sites sur la chromatine avec l'ETP ASX et qu'elle interagit physiquement avec celui-ci en cellules S2 *via* son domaine N-terminal. L'interaction entre Cycline G et ASX a également été confirmée *in vivo* par des expériences de co-immunoprécipitation en utilisant des extraits protéiques issus de larves de stade 3.

Par ailleurs, Cycline G est préférentiellement présente au niveau des inter-bandes de DAPI, représentatives de la chromatine dite ouverte. De plus, Cycline G co-localise en de très nombreux sites sur la chromatine avec l'ARN polymérase II phosphorylée sur la sérine 2 du CTD, spécifique de la transcription en cours d'élongation. Ces résultats suggèrent que Cycline G interviendrait au cours de l'élongation.

CycG interagit génétiquement avec *ASX* et des gènes *PcG* et *TrxG* impliqués dans le maintien de l'expression des gènes *Hox*. Ces études d'interactions génétiques montrent que *CycG* se comporterait comme un « Enhancer » des gènes *Polycomb*. En effet, les phénotypes homéotiques présents chez des mutants *PcG* (*crm, mxc, Pc* et *ph*) sont renforcés en contexte perte de fonction pour *CycG* et supprimés quand *CycG* est surexprimée. A l'inverse, les phénotypes homéotiques présents chez des mutants *TrxG* sont amplifiés (*ash1, trx*) ou induits (*brm*) par la surexpression de *CycG*. En outre, dans des disques imaginaux d'ailes, la dérégulation de *CycG* modifie l'expression des protéines Hox (SCR et UBX) chez des mutants *PcG*. Ces résultats suggèrent un rôle de Cycline G dans la répression des gènes Hox en association avec les gènes *PcG*.

L'ensemble de nos résultats suggère que Cycline G agit selon le stade de développement, le tissu ou le gène cible, comme un activateur ou un répresseur transcriptionnel.

ARTICLE II

Cycline G et les complexes répresseurs Polycomb, PRC1 et PR-DUB, participent ensemble à la stabilité du développement

CycG est essentiel pour la stabilité du développement (Debat *et al.,* 2011 ; Debat et Peronnet, 2013). En effet, la dérégulation de *CycG*, notamment sa surexpression, induit une AF très élevée, jamais observée auparavant, qui suggère que ce gène joue un rôle particulier dans la stabilité du développement.

Dans cet article, nous montrons un rôle des gènes *PcG*, en interaction avec *CycG*, dans la stabilité du développement. L'expression d'un variant de Cyline G délété du domaine d'interaction avec les ETP, ASX et Corto, génère une AF très élevée. Ceci suggère que l'interaction entre Cycline G et ces régulateurs de la chromatine serait impliquée dans la stabilité du développement (Salvaing *et al.,* 2008 ; Dupont *et al.,* 2015). De plus, nos données montrent une forte augmentation de l'AF, induite par la surexpression de *CycG,* par des mutants de gènes codant des protéines des complexes PcG, PRC1 (P*c, Ph, Sce* et *Scm*), et PR-DUB (*Asx* et *caly*).

De façon intéressante, l'analyse par RNA-seq du transcriptome de disques imaginaux d'ailes de larves de drosophile qui surpexpriment *CycG*, montre que 548 gènes sont dérégulés par rapport au contrôle. L'ontologie de ces gènes indique qu'ils sont impliqués dans la croissance et le métabolisme.

Cyclin G and the Polycomb Repressive Complexes PRC1 and PR-DUB cooperate for Developmental Stability

Delphine Dardalhon-Cuménal[1,2], Jérôme Deraze[1,2]*, Camille A Dupont[1,2]*, Valérie Ribeiro[1,2], Stéphane Le Crom[4,5,6], Hélène Thomassin[1,2], Vincent Debat[3], Neel B Randsholt[1,2] and Frédérique Peronnet[1,2].

[1] Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS), UMR 7622, Developmental Biology, F-75005, Paris, France

[2] CNRS, IBPS, UMR 7622, Developmental Biology, F-75005, Paris, France

[3] Muséum National d'Histoire Naturelle, UMR CNRS 7205 OSEB, Département Systématique et Evolution, 45 rue Buffon, Paris, F-75005 France.

[4]École Normale Supérieure, Institut de Biologie de l'ENS, IBENS, Plateforme Génomique, Paris, F-75005 France. Inserm, U1024, Paris, F-75005 France. CNRS, UMR 8197, Paris, F-75005 France.

[5] Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS), F-75005, Paris, France

[6] CNRS, IBPS, F-75005, Paris, France

*These authors participated equally to the work.

Keywords : *Drosophila melanogaster*, Developmental Stability, Fluctuating Asymmetry, Developmental noise, Polycomb, Cyclin G

ABSTRACT

Background

Developmental stability, the ability to buffer developmental noise, is a fundamental property of multicellular organisms, yet its genetic bases remain elusive. Imperfect bilateral symmetry, or fluctuating asymmetry, is commonly used to estimate developmental stability. The gene *Cyclin G* (*CycG*) of *Drosophila melanogaster* encodes a protein involved in transcriptional regulation and in the cell cycle. Cyclin G physically interacts with two chromatin regulators of the Enhancers of Trithorax and Polycomb family (ETP). Furthermore, *CycG* genetically interacts with several *Polycomb-group* (*PcG*) genes in the regulation of homeotic genes and behaves as an *Enhancer of Polycomb*. Finally, expression of a short Cyclin G isoform, deleted of its 25 C-terminal amino-acids, generates high fluctuating asymmetry in the wing, thus providing a destabilized system well-suited to tackle the genetic bases of developmental stability.

Results

We show here that the presence of the Cyclin G ETP-interacting domain reduces *CycG*-induced fluctuating asymmetry, suggesting that the interaction between Cyclin G and chromatin regulators/controls developmental noise. We also find that mutations for several *ETP* or *PcG* genes (*Additional sex combs, calypso, Polycomb*, *polyhomeotic*, *Sex combs extra* and *Sex comb on midleg)* substantially increase *CycG*-induced fluctuating asymmetry. Transcriptomic analyses of wing imaginal discs deregulating *CycG* reveal that high developmental noise correlates with deregulation of a subset of genes involved in energy consumption, growth and metabolism. Using published datasets, we find that many of these deregulated genes are bound by ASX and PRC1 in the developing wing.

Conclusion

Cyclin G and the PcG complexes PR-DUB and PRC1 might cooperate in sustaining developmental stability. Our data suggest that developmental noise, as measured by fluctuating asymmetry, may be the consequence of the noisy transcription of a subset of growth control genes. If noisiness in the expression of growth control genes has been evolutionary selected, the

question arises whether it confers adaptive advantages to growing tissues, such as resistance to fluctuation in resource availability.

INTRODUCTION

Developmental stability has been described as the result of processes that buffer disruption of a developmental trajectory within a particular environment (Palmer, 1994). In other words, developmental stability offsets the random stochastic perturbations of processes at play during development. Many mechanisms working at scales from the molecular to the whole organism levels contribute to developmental stability (Nijhout and Davidowitz, 2003). For example, at the molecular level, chaperones such as heat-shock proteins, that protect misfolded proteins from denaturation and are thus involved in a large variety of developmental processes, participate in developmental stability (Feder and Hofmann, 1999; Queitsch et al., 2002; Rutherford, S et al., 2007). At the cellular level, adjustment of cell growth to cell proliferation is essential for robustness of wing size in *Drosophila*, and thus also participates in developmental stability (Debat et al., 2011; Debat and Peronnet, 2013).

Developmental noise, the "sum" of the stochastic part of each developmental process, can be observed macroscopically for morphological traits. In bilaterians, departure from symmetry, the so-called fluctuating asymmetry (FA), is the most commonly used method to estimate developmental noise (Van Valen, 1962; Palmer and Strobeck, 1992). Indeed, the two sides of bilaterally symmetrical traits are influenced by the same genes and environmental conditions, and differences between them are only due to developmental noise. Hence, the use of FA as an index of developmental noise makes the study of the mechanistic and genetic bases of developmental stability compatible with the custom genetic and molecular approaches of developmental biology.

Despite many speculations about the evolutionary role of developmental stability, its genetic bases remain elusive. Experiments showing the role of the Hsp90 chaperone in buffering genetic variation led to the idea that developmental stability could be ensured by specific genes (Rutherford and Lindquist, 1998; Milton et al., 2003; Debat et al., 2006; Yeyati et al., 2007; Sangster et al., 2008). On the other hand, both theory and experiments show that complex genetic networks can become intrinsically robust to perturbations, notably through negative and positive feedbacks, suggesting

that the topology of gene networks is of paramount importance to sustain developmental stability (Barabasi and Albert, 1999; Siegal and Bergman, 2002; Newman, 2003; Kitano, 2004). Several authors have further suggested that the most connected genes of networks, *i.e.* hubs, might be of particular importance for developmental stability (Rutherford et al., 2007; Levy and Siegal, 2008). Two recent studies scanned the *Drosophila* genome for regions involved in developmental stability using FA as an estimator of developmental noise (Breuker et al., 2006; Takahashi et al., 2011). Several deletions increased FA showing clear genetic bases for developmental stability. However, genes responsible for this effect inside the deletions were not identified. Nevertheless, these studies confirm that the determinism of developmental stability would be polygenic, as suggested by previous Quantitative Trait Loci analyses in mouse (Leamy et al., 2002; Leamy et al., 2005), thus reinforcing the idea that developmental stability depends on gene networks.

We recently discovered that the gene *Cyclin G* (*CycG*) of *Drosophila*, that encodes a protein involved in transcriptional regulation and in the cell cycle, is essential for developmental stability (Salvaing et al., 2008; Faradji et al., 2011; Faradji et al., 2014; Debat et al., 2011; Dupont et al., 2015). Indeed, expression of a short Cyclin G isoform, that deletes the 25 amino-acid long C-terminal PEST-rich sequence, generates a very high FA in several organs, notably in the wing. Interestingly, FA induced by *Cyclin G* deregulation correlates with high variability of cell size, implying that the noisy process would in that case be cell growth. Hence, *Cyclin G* deregulation provides a convenient destabilized system to tackle the impact of cell growth stochasticity on developmental stability. Cyclin G is a transcriptional cyclin, and might thus control cell growth *via* regulation of genes involved in growth pathways. Importantly, Cyclin G physically interacts with two chromatin regulators of the Enhancer of Polycomb and Trithorax family (ETP), Corto and Additional Sex Combs (ASX), and binds polytene chromosomes at many sites, suggesting that it impacts on the regulation of many genes by modifying or maintaining the chromatin state (Salvaing et al., 2008; Dupont et al., 2015) .

During development, epigenetic maintenance of gene expression patterns is under control of evolutionary conserved proteins encoded by *Polycomb-group*

(*PcG*), *trithorax-group* (*trxG*), and *ETP* genes (for recent reviews see (Grossniklaus and Paro, 2014; Kingston and Tamkun, 2014). *PcG* genes are involved in long-term gene repression, whereas *trxG* genes participate in maintenance of gene activation and counteract *PcG* action. *ETP* genes encode co-factors of both *trxG* and *PcG* genes, and behave alternatively as repressors or activators of target genes (Gildea et al., 2000; Grimaud et al., 2006; Beck et al., 2010). PcG as well as TrxG proteins form large multimeric complexes that bind chromatin and appose or recognize histone post-translational modifications. In *Drosophila* few PcG complexes have been described (PRC2, PRC1, PR-DUB, dRAF, Pho-RC, Pcl-PRC2) (Nekrasov et al., 2007; Scheuermann et al., 2010; Grossniklaus and Paro, 2014). PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2) contains Extra Sex Combs (ESC) and Enhancer of Zeste [E(Z)], a SET-domain histone methyltransferase that trimethylates histone 3 on lysine 27 (H3K27me3). PRC1, comprises the eponymous protein Polycomb (PC), several PcG proteins [Polyhomeotic (PH), Posterior Sex Combs (PSC) and Sex Comb on Midleg (SCM)] as well as the H2A ubiquitinase Sex Combs Extra (SCE) (reviewed in (Di Croce and Helin, 2013). PRC1 silences genes through ubiquitination of histone H2A on lysine 119 in mammals – homolog to lysine 118 in *Drosophila* - and chromatin compaction (de Napoles et al., 2004; Grau et al., 2011). A third PcG complex more recently identified in *Drosophila*, called PR-DUB (Polycomb Repressive Deubiquitinase), includes the deubiquitinase Calypso and the ETP ASX (Scheuermann et al., 2010). Mammalian PR-DUB contains BAP1, homolog to Calypso, ASXL1 and ASXL2, two ASX homologs, as well as several additional partners (Dey et al., 2012; Baymaz et al., 2014). In both *Drosophila* and mammals, PR-DUB catalyzes deubiquitination of H2AK118/119, binds PcG targets, and is essential for promoter silencing (Scheuermann et al., 2012). *Drosophila* ASX and its murine homologs are required for both activation and repression of homeotic genes, which makes them genuine ETPs, and suggests that they might also act outside PR-DUB (Milne et al., 1999; Baskind et al., 2009; Fisher et al., 2010).

We recently showed that Cyclin G is an Enhancer of Polycomb for the regulation of homeotic genes (Dupont et al., 2015). To investigate further the

role of *Cyclin G* and its interactions with *PcG* or *ETP* genes in developmental stability, we made transgenic lines allowing production of different versions of the protein. We show here that expression of an isoform of Cyclin G that removes the N-terminal domain – *i.e.* the ASX and Corto interacting domain – increases FA. This suggests that the interaction between Cyclin G and chromatin regulators might limit developmental noise. We next assay genetic interactions between *PcG* or *ETP* genes, and *CycG* for FA. Our results show that several mutations for these genes substantially increase *CycG*-induced FA. This is notably the case for mutations of *Asx* and *calypso* (*caly*), as well as of *Polycomb* (*Pc*), *polyhomeotic* (*ph*), *Sex combs extra* (*Sce*) and *Sex comb on midleg* (*Scm*). Transcriptomic analyses of wing imaginal discs deregulating *CycG* show that developmental noise correlates with deregulation of genes involved in growth and metabolism. Using published datasets, we show that many of these deregulated genes are bound by ASX and PRC1 in the developing wing, leading us to hypothesize that Cyclin G and the PcG complexes PR-DUB and PRC1 cooperate in sustaining developmental stability.

MATERIAL AND METHODS

Plasmids

The *pPMW-attB* plasmid was built as follows: Gateway® vector *pPMW* (Invitrogen, a gift from T. Murphy; (Huynh and Zieler, 1999) was linearized by digestion with *NsiI*; the *attB* sequence was amplified from *pUASTattB* (Bischof et al., 2007) using primers *attB-NsiIF* and *attB-NsiIR* (Table S1) and the PCR product was digested with *NsiI*; the digested PCR product and the linearized plasmid were ligated and sequenced. This plasmid was deposited at Addgene (plasmid # 61814).

The full-length *CycG* cDNA (encoding the 566 amino-acid protein) was amplified using primers *CycGnF* and *CycGnR* from S2 cell cDNAs. cDNAs encoding truncated forms of Cyclin G (amino-acids 1 to 541: Cyclin G deleted of the putative PEST domain; amino-acids 130 to 566: Cyclin G deleted of the ETP interacting domain; amino-acids 130 to 541: Cyclin G deleted of both domains) were amplified from the full-length *CycG* cDNA using primers

CycGnF and *CycG541R*, *CycG130F* and *CycGnR*, and *CycG130F* and *CycG541R*, respectively (Table S1 and (Dupont et al., 2015). The PCR products were cloned into *pENTR/D-TOPO*® (Invitrogen), transferred into *pPMW-attB* and the resulting plasmids *pPMW-attB-CycG*^{FL}, *pPMW-attB-CycG*$^{\Delta P}$, *pPMW-attB-CycG*$^{\Delta E}$, *pPMW-attB-CycG*$^{\Delta E\Delta P}$ were sequenced.

***Drosophila melanogaster* strains and genetics**

Flies were raised on standard yeast-cornmeal medium at 25°C.

CycG transgenic lines were obtained by PhiC31-integrase mediated insertion in strain *y*^{1}*M{vas-int.Dm}ZH-2Aw***;M{3xP3-RFP.attP'}ZH-51C* (stock BL-24482). Plasmids *pPMW-attB-CycG*, *pPMW-attB-CycG*$^{\Delta P}$, *pPMW-attB-CycG*$^{\Delta E}$ and *pPMW-attB-CycG*$^{\Delta E\Delta P}$ were injected in embryos, G0 adults were back-crossed to *yw*, and G1 transformants were crossed to *yw* again to obtain G2 transformants (plan H, BestGene Inc.). Transformants were individually crossed with *yw; Sp/CyO*, and the curly wing siblings were crossed with each other. Homozygous transgenic lines were then obtained by crossing 5 females and 5 males. The resulting lines were named *UAS::CycG*^{FL}*, UAS::CycG*$^{\Delta P}$*, UAS::Myc-CycG*$^{\Delta E}$ and *UAS::Myc-CycG*$^{\Delta E\Delta P}$. To estimate fluctuating asymmetry (FA), five replicate crosses were performed for each genotype, wherein 6 females *daughterless::Gal4* (*da::Gal4*) were mated with 5 transgenic males. Parents were transferred into a new vial every 48h (three times) then discarded. 30 females were sampled from the total offspring. The experiment was performed in triplicate.

The *da>CycG*$^{\Delta P}$ third chromosome, obtained by recombination of *da::Gal4* and the original *RCG76 UAS::CycG*$^{\Delta P}$ transgene, was used to test genetic interactions between *CycG* and *Polycomb-group* or *Enhancer of Trithorax and Polycomb* gene mutants (Faradji et al., 2011; Faradji et al., 2014; Dupont et al., 2015). Alleles used are described in (Salvaing et al., 2006; Gaytán de Ayala Alonso et al., 2007; Beuchle et al., 2001; Fritsch et al., 2003; Gutiérrez et al., 2012; Soto et al., 1995) (Table 1). To estimate FA, 5 crosses were performed for each genotype, wherein 6 *PcG* or *ETP* mutant females were mated with 5 *da>CycG*$^{\Delta P}$ males. The parents were transferred in a new vial every 48h (three times) then discarded. 30 females combining the *PcG* or *ETP* mutation and *da>CycG*$^{\Delta P}$ were sampled from the offspring.

Morphometrics

For each cross, right and left wings of the sampled 30 females were mounted on one slide, dorsal side up, in Hoyer's medium. Slides were scanned with a Hamamatsu Nanozoomer Digital Slide scanner, running the Nanozoomer software with a 20x objective and an 8-bit camera. Wing pictures were separately exported into tif format using NDP.view and the 5x lens. All wings were oriented with the hinge to the left. Image J was used to digitize 15 landmarks (Figure 1). Analyses of centroid size FA was performed as described previously (Debat et al., 2011) using the FA10 index as FA estimator *i.e.* FA corrected for measurement error and directional asymmetry (Palmer and Strobeck, 1992). For all genotypes the interaction individual*side was significant, indicating that FA was larger than measurement error.

Immunolocalization on polytene chromosomes

Squashes of w^{1118} third instar larval salivary glands and immunostainings were performed as described previously (Salvaing et al., 2003) using guinea-pig anti-Cyclin G antibody (1:40) and rabbit anti-human H2AK119ub antibody validated in *Drosophila* (1:40; #8240, Cell Signaling) (Lee et al., 2015). Secondary antibodies (Alexa Fluor® 488 goat anti-guinea pig, Alexa Fluor® 594 goat anti-rabbit IgG, Molecular Probes) were used at a 1:1000 dilution.

RNA-seq Analysis

Wing imaginal discs from *da>CycG*$^{\Delta P}$ and *da::Gal4/+* third instar female larvae were dissected and total RNAs were extracted as previously described (Coléno-Costes et al., 2012). Three biological replicates were generated for each genotype. Illumina HiSeq 2000 sequencing (multiplexed 50 bp single-end sequencing) was performed at the Genomic Paris Centre facility. A mean of 38.1 ± 4.8 million reads was obtained for each of the 6 samples (Table S2). They were aligned with the *Drosophila melanogaster* genome (dm3, r5.9) using TopHat 2 (v2.0.10) (Kim et al., 2013). Unambiguously mapping reads (a mean of 24.9 ± 4.9 million reads) were then assigned to genes and exons described by the Ensembl BDGP5 v77 assembly, by using the "summarizeOverlaps" function from the "GenomicAlignments" package (v

1.2.2) in “Union” mode (Lawrence et al., 2013). Library size normalization and differential expression analysis were both performed with DESeq 2 (v 1.6.3) and genes with adjusted P-value below 0.05 were retained as differentially expressed (Love et al., 2014). Gene Ontology analysis was performed using DAVID (Huang et al., 2009; Huang et al., 2009).

An interactome was built using Cytoscape (v 2.8.3) and the DroID plugin (v 1.5) was used to introduce protein-protein interactions (Murali et al., 2011). The jActiveModules plugin (v 2.23) was used to find subnetworks of co-deregulated genes in the interactome by using “overlap threshold” 0.8, “score adjusted for size”, and “regional scoring” (Ideker et al., 2002) and the ClueGO plugin (v 1.4) was used to determine if the nodes in the putative module were enriched for GO Biological Processes and validate subnetwork prediction (Bindea et al., 2009).

Published datasets (Scheuermann et al., 2010; Schaaf et al., 2013) were used to compare Cyclin G regulated genes and binding of several ETP, PcG proteins and RNA Polymerase II. Overlap significance assessment was made as follows: under the null hypothesis, genes that are bound by chromatinian factors should not exhibit any bias towards Cyclin G-regulated genes. Thus, the overlap between $\mathbf{n}$ bound genes and $\mathbf{K}$ Cyclin G-regulated genes should be explained by random sampling without replacement of $\mathbf{n}$ genes within the total amount $\mathbf{N}$ of *Drosophila melanogaster* genes. The amount of overlap under the null hypothesis $\mathbf{X}$ follows a hypergeometric law: $X \sim HY(K, N, n)$. The significance of the observed overlap $\mathbf{k}$ was computed as the probability of observing $\mathbf{X}$ higher or equal to $\mathbf{k}$ under the null hypothesis: $\mathrm{P}(\mathrm{X} \geq \mathrm{k})$.

RESULTS

Presence of the ETP interacting domain limits Cyclin G-induced fluctuating asymmetry

The 566 amino-acid Cyclin G protein exhibits 3 remarkable domains: a 130 amino-acid N-terminal domain that interacts with the ETP Corto and ASX, a cyclin domain (amino-acids 287 to 360) that presents high similarity with the cyclin domain of vertebrate G-type cyclins, and a putative PEST domain (amino-acids 541 to 566) (Salvaing et al., 2008; Faradji et al., 2011; Faradji et

al., 2014; Dupont et al., 2015). We previously observed that overexpression of *CycG* deleted of this PEST encoding sequence (*CycG*$^{\Delta P}$) generates extremely high levels of FA in the wing, *i.e.* an increase by a factor of at least 40, whatever the Gal4 driver, whether ubiquitous or wing imaginal disc-specific (Debat et al., 2011). This was an unprecedented effect in any system or trait, thus providing a tool to investigate developmental stability in depth. To test whether transcriptional regulation by Cyclin G could be a causative factor of developmental noise, we generated new transgenic lines allowing to express different versions of the Cyclin G cDNA, *CycG*^{FL} (encoding the full-length protein), *CycG*$^{\Delta E}$ (encoding the ETP interacting domain deleted protein), *CycG*$^{\Delta P}$ (encoding the PEST domain deleted protein), and *CycG*$^{\Delta E \Delta P}$ (encoding the PEST domain and the ETP interacting domain deleted protein). In order to express these different cDNAs at the same level and compare the levels of FA they induced, we used the PhiC31 integrase system to integrate all transgenes at position 51C on the second chromosome. Expression of these transgenic lines was ubiquitously driven with *da::Gal4*. First, we confirmed that expression of *CycG*$^{\Delta P}$ induced very high FA as compared to the *yw* and *da::Gal4/+* controls. Furthermore, expression of *CycG*^{FL} also significantly increased FA, although to a much lesser extent (half as much). Interestingly, expression of either *CycG*$^{\Delta E}$ or of *CycG*$^{\Delta E \Delta P}$ significantly increased FA as compared to the effects of *CycG*^{FL} or *CycG*$^{\Delta P}$, respectively (twice as much) (Figure 2 and Table 2). These results show that presence of the ETP interacting domain tends to limit Cyclin G-induced developmental noise and suggest that the interaction between Cyclin G and chromatin regulators might be important for developmental stability.

Genetic interactions between *PcG* or *ETP* mutants and *CycG* highlight a role of chromatin regulators in developmental stability

We next addressed the role of chromatin regulators in developmental stability. To do so, we first measured FA in heterozygotes for several *PcG* or *ETP* mutations (Table 1 and Figure 3A). FAs were similar to the one of +/+ flies except for heterozygotes *ph*^{401}*ph*^{602}/+, *Sce*^{KO4}/+ and *Scm*^{D1}/+, who exhibited a slightly lower FA (Figure 3A). We then combined the same mutant alleles for these *PcG* and *ETP* genes with the *da>CycG*$^{\Delta P}$ chromosome. Many of them

significantly increased the FA induced by *da>CycG*$^{\Delta P}$ (Figure 3B). This was notably the case for *Asx*^{22P4} and *caly*^{2}, two alleles of *ph* (*ph*^{410} and *da>php*^{RNAi}), several alleles of *Sce* (*Sce*^{1}, *Sce*^{33M2} and *Sce*^{KO4}), and *Scm*^{D1}. Interestingly, *Asx* and *caly* encode proteins of the Polycomb complex PR-DUB whereas *Pc*, *ph*, *Sce* and *Scm* encode proteins of the Polycomb complex PRC1. No modification of the FA induced by *da>CycG*$^{\Delta P}$ was observed for the other alleles we tested. This was true in particular for two alleles of *corto* that encodes an ETP directly interacting with Cyclin G (Salvaing et al., 2008), as well as for *E(z)*^{63} and *esc*^{21} that encode two proteins of the Polycomb complex PRC2. Taken together, these results suggest that Cyclin G interacts with the PcG complexes PR-DUB and PRC1 for developmental stability.

Cyclin G controls expression of genes involved in growth

Cyclin G was shown to bind polytene chromosomes at many sites, co-localizing extensively with ASX and RNA Polymerase II phosphorylated on serine 2 (Dupont et al., 2015). Previous work also showed that Cyclin G controls expression of the *Abd-B* gene and more globally participates, with *PcG* and *trxG* genes, in the regulation of homeotic gene expression (Salvaing et al., 2008; Dupont et al., 2015). We thus hypothesized that the high FA induced by *da>CycG*$^{\Delta P}$ might be related to the deregulation of Cyclin G transcriptional targets.

The two genes *caly* and *Sce* encode antagonistic enzymes: SCE/dRing is the H2AK118 ubiquitinase subunit of PRC1 and Calypso/dBap1 is a major deubiquitinase of the same H2A residue (Scheuermann et al., 2010; Scheuermann et al., 2012). To gain insight into the mechanism by which Cyclin G controls transcription, we immunostained polytene chromosomes from *w*^{1118} larvae with anti-Cyclin G and anti-human H2AK119ub antibodies. Cyclin G and H2AK118ub co-localized at many sites on chromosome arms suggesting that Cyclin G transcriptional activity might be somehow connected to the presence of this histone mark (Figure 4). However, expression of *CycG*$^{\Delta P}$ or *CycG*$^{\Delta E \Delta P}$ in the posterior compartment of wing imaginal discs using the *en::Gal4* driver (*en>CycG*$^{\Delta P}$ and *en>CycG*$^{\Delta E \Delta P}$ larvae) did not markedly modify the global amount of H2AK119ub (data not shown).

To further address the role of Cyclin G in transcriptional regulation, and more particularly which genes are deregulated in the genetic context where high FA is generated, we deep-sequenced transcripts from wing imaginal discs of *da>CycG*$^{\Delta P}$ third instar larvae. Total RNAs from *da>CycG*$^{\Delta P}$ and *da::Gal4/+* third instar larval wing imaginal discs were isolated and sequenced on an Illumina high throughput sequencer. Sequence reads were aligned with the *D. melanogaster* genome to generate global gene expression profiles. Differential analyses were performed to obtain expression changes for *da>CycG*$^{\Delta P}$ as compared to the *da::Gal4/+* control. With a threshold adjusted P-value of 0.05, we retrieved a list of 548 genes whose expression was significantly different between the two genotypes (Table 4). Surprisingly, mean overexpression of *CycG* was only moderate (increased by a factor 1.29). Among the 548 deregulated genes, 232 were up- and 316 down-regulated. By comparison with published datasets obtained in the same tissue (Scheuermann et al., 2010; Schaaf et al., 2013), we observed that among these 548 genes, 76 were bound by ASX, 337 by PC, 420 by PH, 155 by PSC and 372 by RNA Polymerase II, and these overlaps were significantly higher than the ones that could be explained by chance (Table 5). On the opposite, the overlaps between these 548 genes and Calypso binding sites or presence of H3K27me3 were not significant.

Analysis of Gene Ontology (GO) revealed that both up- and down-regulated genes were enriched in categories *structural component of the ribosome, catabolic processes, mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex, mitochondrial respiratory chain complex, hydrogen-exporting ATPase activity, phosphorylative mechanism*, suggesting that Cyclin G coordinates expression of genes involved in energy production, growth and metabolism (Table S3). To isolate networks of co-deregulated genes, we first built an interactome based on genes expressed in control wing imaginal discs (with a cutoff of 10 reads). Edges corresponding to protein-protein interactions (PPI) were integrated in the interactome through DroID (Murali et al., 2011). The resulting interactome was composed of 8270 nodes (genes) connected via 31,068 edges (interactions). Interestingly, Cyclin G has a very high betweenness centrality in this network, being at the 19th position among 8270 nodes. Betweeness centrality corresponds to the total number of non

redundant shortest paths going through a certain node (Yu et al., 2007). Nodes with high betweenness centrality control most of the information flow in the network, and represent critical point(s) in the network. We then used JactiveModules (Ideker et al., 2002) to identify active subnetworks in this interactome, *i.e.* connected regions of the network that show significant expression change in *da>CycG*$^{\Delta P}$ as compared to *da::Gal4/+* wing imaginal discs. A significant subnetwork of 165 nodes was found (Z score 14.08) which clusterized in Gene Ontology categories *negative regulation of mitotic cell cycle phase transition, nucleoside diphosphate phosphorylation, positive regulation of cellular amide metabolic process, ribosome biogenesis* (Figure 5 and Table S4). This indicates that developmental stability would require coordinated control of growth.

DISCUSSION

The *CycG* gene of *Drosophila melanogaster* encodes a cyclin involved in transcriptional control, cell growth and the cell cycle (Salvaing et al., 2008; Faradji et al., 2011; Faradji et al., 2014). Mild overexpression of a cDNA encoding Cyclin G deleted of a short C-terminal sequence potentially involved in its degradation (a PEST-rich domain; *da>CycG*$^{\Delta P}$) induces high Fluctuating Asymmetry (FA), notably of the wings (Debat et al., 2011). Under laboratory conditions (*i.e.* little environmental variation combined with near isogenic lines), this FA should mainly result from developmental noise (Debat and Peronnet, 2013). Thus, *da>CycG*$^{\Delta P}$ provides an unparalleled tool to tackle the genetic bases of developmental stability. Cyclin G interacts physically with two chromatin regulators of the Enhancers of Trithorax and Polycomb family (ETP), and *CycG* genetically interacts with many *Polycomb-group* (*PcG*) and *trithorax-group* (*trxG*) genes (Dupont et al., 2015). This prompted us to examine more deeply the involvment of transcriptional control *via* Cyclin G and chromatin regulators in developmental stability. First, we show that deletion of the ETP interacting domain doubles *CycG*-induced FA, whether the PEST domain is present or not, suggesting that interaction between Cyclin G and these chromatin regulators might be important to minimize developmental noise. However, as very high FA is induced by a cDNA

encoding the central part of Cyclin G that contains a cyclin domain, the underlying cause of this phenotype might be the titration of Cyclin-Dependent Kinases (CDK). Indeed, Cyclin G interacts with many CDKs: CDK1,2,4,5 Cks85A and Cks30A (Giot et al., 2003; Stanyon et al., 2004; Schwartz et al., 2009; Jensen et al., 2009; Faradji et al., 2011; Faradji et al., 2014). Further analyses will be necessary to test this hypothesis.

Growth of developing organs is basically controlled by extrinsic nutriment-sensitive signals (*i.e.* Insulin-like growth factor 1 and Insulin-like peptides which activate the InR/TOR pathway) and intrinsic signals (*i.e.* morphogen gradients) orchestrating cell proliferation (Parker, 2011). Both these sources of growth signals affect developmental stability. In *Drosophila* larvae, injury of imaginal discs induces a delay in metamorphosis, allowing damaged tissue to be repaired (Parker and Shingleton, 2011). This growth retardation is induced by expression of *drosophila insulin-like peptide 8*, *dilp8,* and secretion of the corresponding peptide into the haemolymph, where it suppresses production of ecdysone by the ring gland (Garelli et al., 2012; Colombani et al., 2012). The *dilp8* mutant displays high FA suggesting that, even in a non-pathological situation, systemic coordination of growth is necessary for developmental stability (Garelli et al., 2012). During imaginal disc growth, metabolically disadvantaged cells are eliminated by their healthier neighbours by a process termed cell competition. This phenomenon occurs when disadvantaged loser cells, for instance *Minute/+* cell clones (*Minute* mutations inactivate ribosomal protein encoding genes) or *diminutive* hypomorphic cell clones (*diminutive* encodes the proto-oncogene Myc), are surrounded by wild-type cells, called winner cells (Morata and Ripoll, 1975; Simpson, 1979; de Beco et al., 2012). Winner cells activate the JNK pathway in loser cells, which induces their death *via* the proapoptotic gene *hid* (Neto-Silva et al., 2009). Interestingly, *hid* mutants have elevated wing FA suggesting that cell competition intrinsically ensures developmental stability. Additional evidence further connects growth misregulation and developmental stability. Indeed, *CycG*-induced high developmental noise is associated with high variance in cell size and loss of correlation between cell size and cell number. As Cyclin G is involved in the control of growth in G1 phase of the cell cycle (Faradji et al., 2011; Faradji et al., 2014), this highlights that a mechanism linked to intrinsic regulation of the

cell cycle supports developmental stability (Debat et al., 2011). Altogether, these observations suggest that noisiness of growth is a major factor impeding developmental stability. The fact that genes deregulated in wing imaginal discs expressing *CycG*$^{\Delta P}$ are involved mainly in energy consumption, growth and metabolism, strengthens this hypothesis.

Genetic interactions between *CycG* and *ETP* or *PcG* mutants emphasize a potential role for the two Polycomb repressive complexes PR-DUB and PRC1 in control of developmental noise. Strikingly, many of the genes that are deregulated in *da>CycG*$^{\Delta P}$ wing imaginal discs are bound by ASX and by several proteins of PRC1, suggesting that PR-DUB and PRC1 participate in fine-tuning these genes. On the other hand, we observed no overlap between Cyclin G deregulated genes and Calypso binding sites, suggesting that the interaction between ASX and Cyclin G antagonizes PR-DUB or takes place outside of PR-DUB. Interestingly, PR-DUB and PRC1 contain antagonistic enzymes (Calypso and SCE/dRING) that respectively deubiquitinate and ubiquitinate H2A on lysine 118 in *Drosophila* (lysine 119 in human). Both *caly* and *Sce* mutations increase *CycG*-induced FA and Cyclin G co-localizes at many sites with H2AK118ub on polytene chromosomes. However, no modification in the global level of H2AK118 ubiquitination was detected in tissues where *CycG*$^{\Delta P}$ is expressed. Furthermore, *Psc* that encodes one of the mandatory partners of the ubiquityl transferase SCE/dRING does not increase *CycG*-induced FA. It was recently shown that canonical PRC1 accounts for only a small fraction of global H2AK118ub, most of it being due to L(3)73Ah, a homolog of mammalian PCGF3 (Lee et al., 2015). Altogether this suggests that H2AK118ub is not involved in developmental stability. Our data thus argue in favor of an interaction between Cyclin G and canonical PRC1 for developmental stability. Recently, PRC2 activity was shown to be important to prevent spurious transcription of inactive genes and to suppress pervasive transcription of intergenic regions (Lee et al., 2015). Mutations of *E(z)* and *esc* that encode two PRC2 members have no effect on *CycG*-induced FA. These results indicate that dysfunction of PRC2-dependent spurious transcription control is unlikely to be the cause of *CycG*-induced developmental noise. Interestingly, a similar but weaker effect on intergenic transcription was attributed to PRC1 (Lee et al., 2015). Hence our data could

indicate that cooperation between Cyclin G and PRC1 and/or PR-DUB is important to limit pervasive transcription of growth control genes.

An increasing corpus of data suggests that noise in gene expression is an important biological trait and there are clear indications that the process of gene regulation can strongly affect variability in gene expression among adjacent cells (for a review see (Sanchez et al., 2013). Numerous examples of phenotypic variations in isogenic populations of both prokaryotic and eukaryotic cells may thus be the result of such stochastic gene expression mechanisms (McAdams and Arkin, 1997). Transcriptional noise may arise from transcriptional initiation. The architectural features of promoters (*i.e.* number of transcription factor binding sites, presence or absence of a TATA box, propensity to be occupied by nucleosomes) have clear effects on mRNA and protein fluctuations in a population of genetically identical cells (Sanchez et al., 2013). However, elongation also contributes to noisy transcription, notably *via* RNA polymerase II pausing (Rajala et al., 2010). In particular, H3K36 methylation prevents the spurious cryptic transcription from within the gene body that might interfere with production of full-length transcripts (Venkatesh et al., 2012). Interestingly, in several cases, noise in gene expression specifically concerns a subset of genes (Weinberger et al., 2012). For example, H3K36 methylation hinders cryptic transcription in a subclass of genes involved in longevity in *S. cerevisiae* and *C. elegans (Sen et al., 2015)*. As Cyclin G co-localizes with RNA PolII S2ph (Dupont et al., 2015) and regulates a subset of genes involved in growth control, it is tempting to speculate that at least a subpart of developmental noise induced by $CycG^{\Delta P}$ expression might be generated by failure to prevent spurious transcription of growth control genes. In depth analysis of Cyclin G transcriptional targets will be needed to test the hypothesis of noisiness in their expression.

These results suggest that fluctuating asymmetry might be the consequence of the noisy transcription of a subset of growth control genes. Control lines also exhibit fluctuating asymmetry albeit at a very low level, suggesting that these genes could exhibit some amount of transcriptional noise in a normal situation. Although high fluctuating asymmetry is considered as deleterious, we wonder whether the amount of developmental noise observed under normal conditions could be advantageous. Indeed, whereas a precise amount

of expression is required for some genes, noise in the expression of others could provide diversity in a genetically identical population (Blake et al., 2006). If noisiness in the expression of growth control genes has been evolutionary selected, the question arises whether it confers some adaptive advantage to growing tissues, such as resistance to fluctuation in resource availability.

Figure 1: Acquisition of morphometric data.

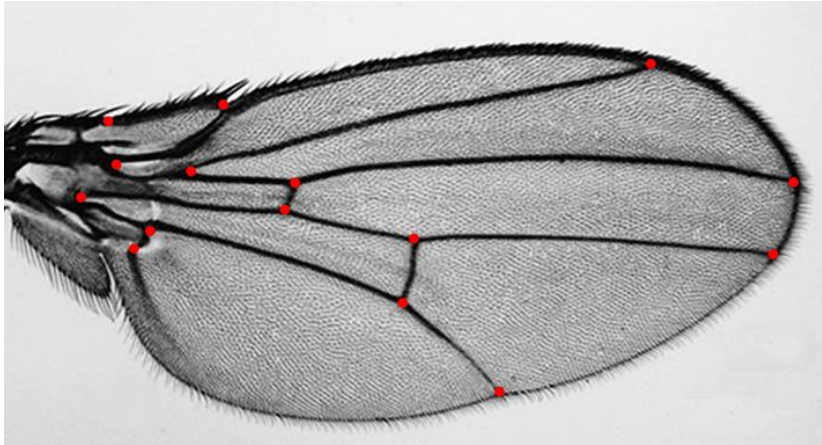

Figure 2: Fluctuating asymmetry of transgenic lines expressing different variants of *CycG*.

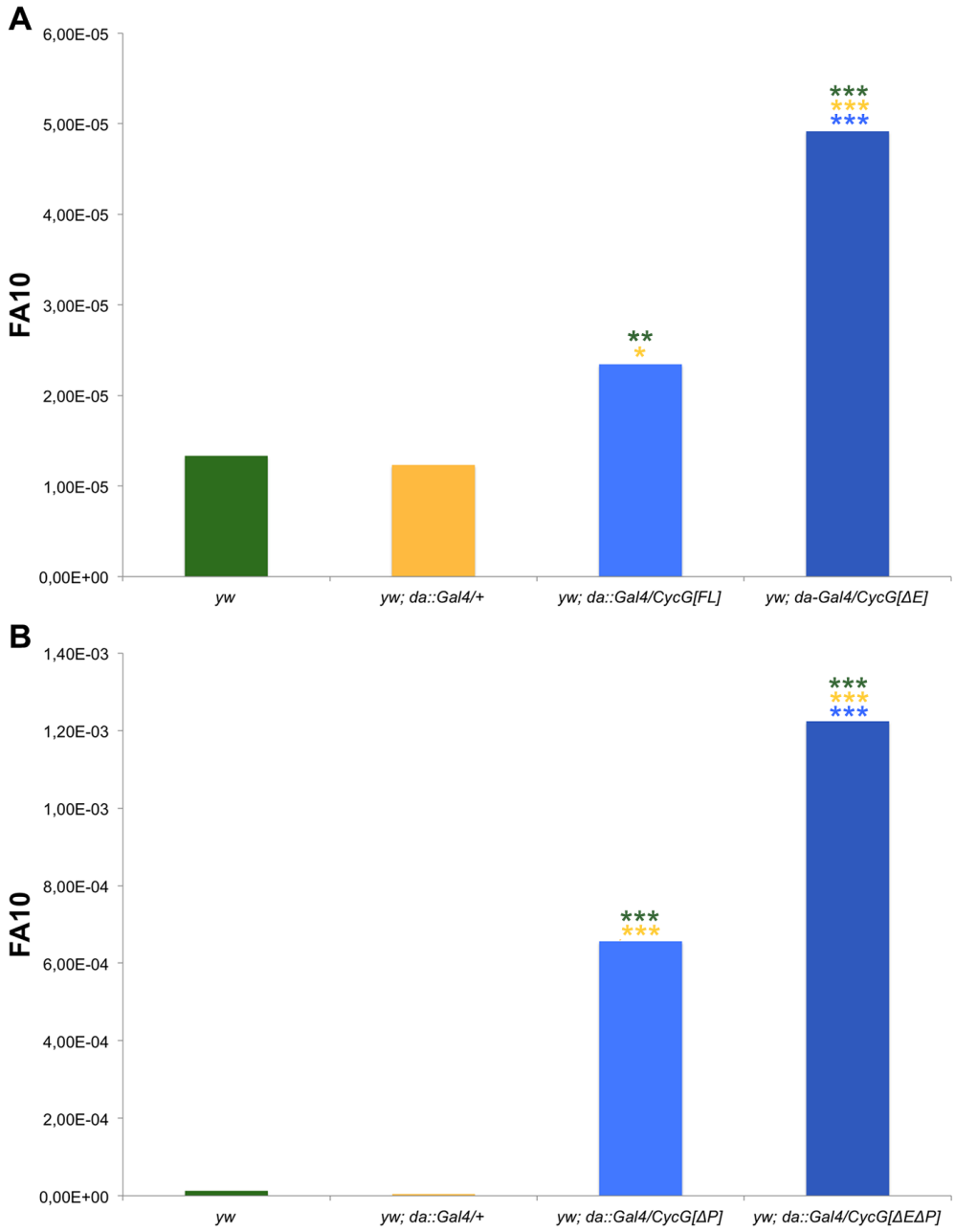

Figure 3: Genetic interactions between *CycG* and *PcG* or *ETP* genes.

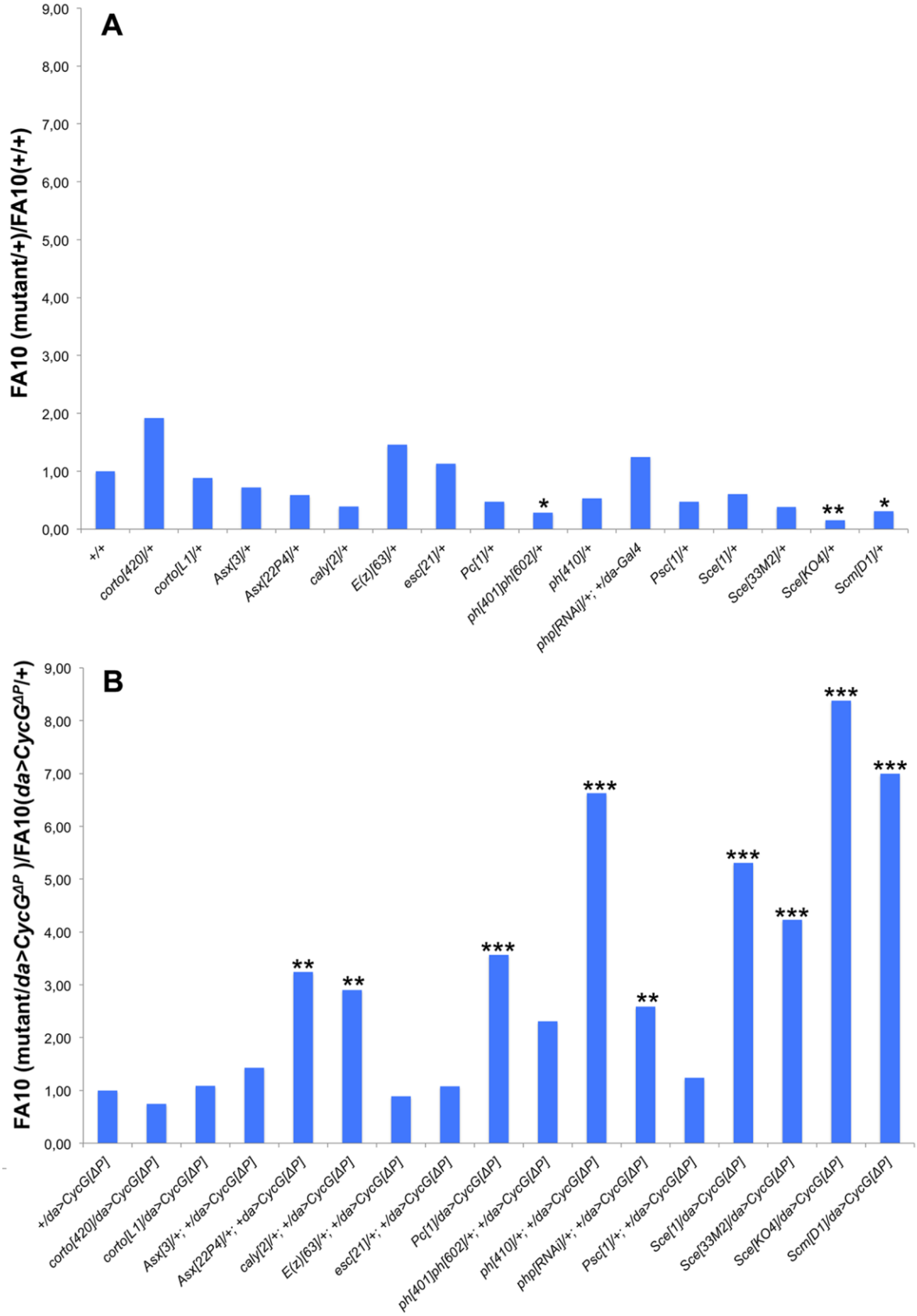

Figure 4: Cyclin G co-localizes with H2AK118ub at many sites.

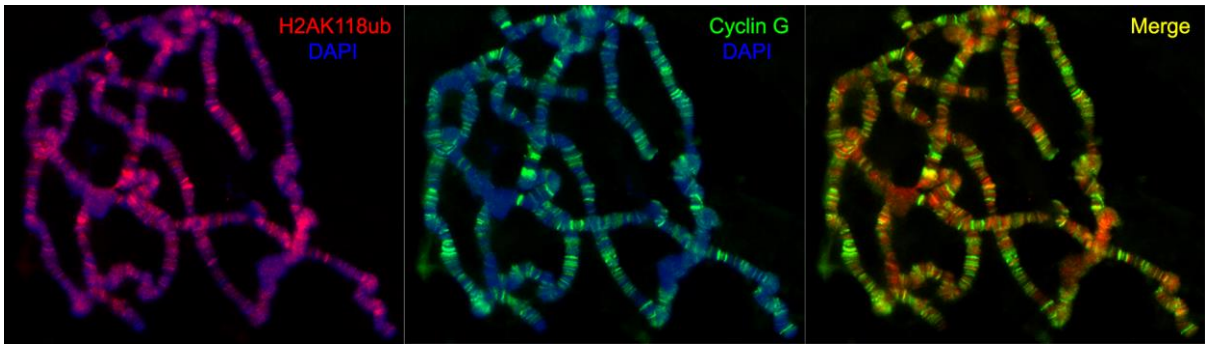

Figure 5: Functional subnetwork of 165 genes identified in *da>CycG$^{\Delta P}$* wing imaginal discs.

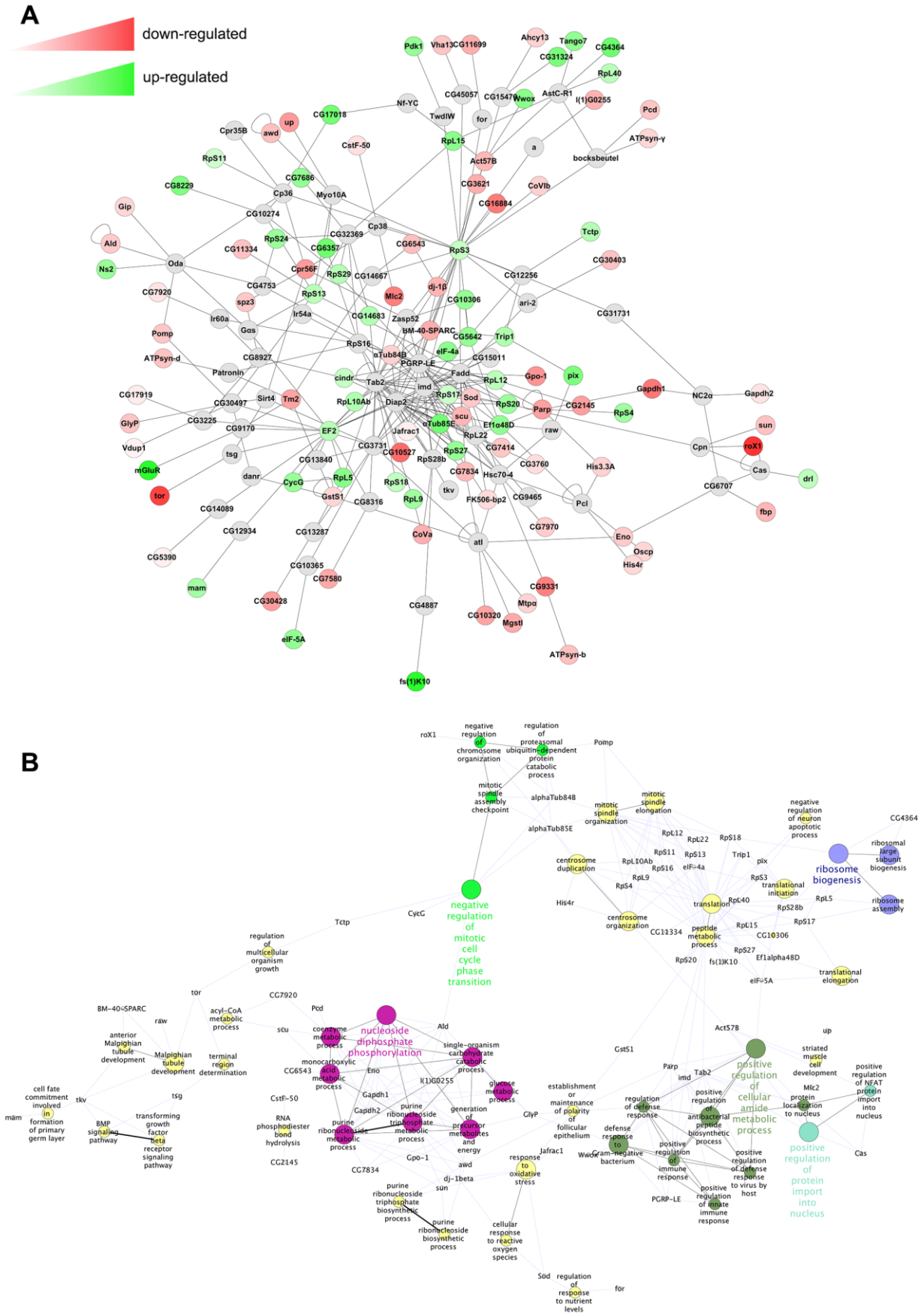

Figure legends

Figure 1: Acquisition of morphometric data.

The red dots show the position of the 15 landmarks digitized on the wings. FA10 was computed using these landmarks obtained on the left and right wings of at least 30 females randomly sampled from the population as described in (Debat et al., 2011).

Figure 2: Fluctuating asymmetry of transgenic lines expressing different variants of *CycG*.

A - Fluctuating Asymmetry (FA10) of females *yw* (green), *yw; da::Gal4*/+ (yellow), *yw; da::Gal4/CycG*^{FL} (light blue) and *yw; da::Gal4/CycG*$^{\Delta E}$ (dark blue).

B - Fluctuating Asymmetry (FA10) of females *yw* (green), *yw; da::Gal4/+* (yellow), *yw;da::Gal4/CycG*$^{\Delta P}$ (light blue), *yw;da::Gal4/CycG*$^{\Delta E \Delta P}$ (dark blue).

*P-value<0.05; ** P-value<0.01; *** P-value<0.001; The colour of the star corresponds to the colour of the genotype with which the comparison was performed.

Figure 3: Genetic interactions between *CycG* and *PcG* or *ETP* genes.

A – FA10 of *ETP* or *PcG* heterozygous mutant females relative to FA10 of +/+ females. Note that *ph*^{401}*ph*^{602}/+, *Sce33*^{KO4}/+, and *Scm*^{D1}/+ females exhibit reduced FA as compared to +/+ females.

B - FA10 of *ETP* or *PcG* heterozygous mutant females combined with *da>CycG*$^{\Delta P}$ relative to FA10 of *da>CycG*$^{\Delta P}$ females. Note that *Asx*^{22P4}, *caly*^{2}/+, *Pc*^{1}, *ph*^{410}, *Sce*^{1}, *Sce*^{33M2}, *Sce*^{KO4}, *Scm*^{D1} mutant females as well as *da>phpRNAi* females exhibit increased FA as compared to +/ *da>CycG*$^{\Delta P}$ females.

*P-value<0.05; ** P-value<0.01; *** P-value<0.001.

Figure 4: Cyclin G co-localizes with H2AK118ub at many sites.

Immunostaining of polytene chromosomes from *w*^{1118} third instar larvae. H2AK118ub (red), Cyclin G (green), DAPI (blue).

Figure 5: Functional subnetwork of 165 genes identified in *da>CycG$^{\Delta P}$* wing imaginal discs.

A – Schematic representation of a subnetwork identified using JactiveModules (Z score 14.08) (Ideker et al., 2002). Among these, 46 genes were up-regulated in *da>CycG$^{\Delta P}$ versus da::Gal4/+* wing imaginal discs (green gradient), 66 genes were down-regulated (red gradient), and 53 genes were not significantly deregulated (grey).

B – Validation of the subnetwork by Gene ontology analysis using ClueGO (Bindea et al., 2009). Genes are significantly enriched in GO Biological Process *negative regulation of mitotic cell cycle phase transition, nucleoside diphosphate phosphorylation, positive regulation of cellular amide metabolic process, ribosome biogenesis.*

Statistical Test Enrichment/Depletion (Two-sided hypergeometric test); Correction Bonferroni; Minimum GO Level 3, Maximum 8; KappaScore threshold 0.5.

REFERENCES

Barabasi, A.L., and Albert, R. (1999). Emergence of scaling in random networks. Science *286*, 509-512.

Baskind, H.A., Na, L., Ma, Q., Patel, M.P., Geenen, D.L., and Wang, Q.T. (2009). Functional conservation of asxl2, a murine homolog for the Drosophila enhancer of trithorax and polycomb group gene asx. PLoS One *4*, e4750.

Baymaz, H.I., Fournier, A., Laget, S., Ji, Z., Jansen, P.W., Smits, A.H., Ferry, L., Mensinga, A., Poser, I., et al. (2014). MBD5 and MBD6 interact with the human PR-DUB complex through their methyl-CpG-binding domain. Proteomics

Beck, S., Faradji, F., Brock, H., and Peronnet, F. (2010). Maintenance of Hox gene expression patterns. . *Adv Exp Med Biol 689*, 41-62.

de Beco, S., Ziosi, M., and Johnston, L.A. (2012). New frontiers in cell competition. Dev Dyn *241*, 831-841.

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

Bindea, G., Mlecnik, B., Hackl, H., Charoentong, P., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Fridman, W.H., Pagès, F., Trajanoski, Z., and Galon, J. (2009). ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. Bioinformatics *25*, 1091-93.

Bischof, J., Maeda, R.K., Hediger, M., Karch, F., and Basler, K. (2007). An optimized transgenesis system for Drosophila using germ-line-specific varphiC31 integrases. Proceedings of the National Academy of Sciences *104*, 3312-17.

Blake, W.J., Balázsi, G., Kohanski, M.A., Isaacs, F.J., Murphy, K.F., Kuang, Y., Cantor, C.R., Walt, D.R., and Collins, J.J. (2006). Phenotypic consequences of promoter-mediated transcriptional noise. Mol Cell *24*, 853-865.

Breuker, C.J., Patterson, J.S., and Klingenberg, C.P. (2006). A single basis for developmental buffering of Drosophila wing shape. PLoS One *1*, e7.

Coléno-Costes, A., Jang, S.M., de Vanssay, A., Rougeot, J., Bouceba, T.,

Randsholt, N.B., Gibert, J.M., Le Crom, S., Mouchel-Vielh, E., et al. (2012). New partners in regulation of gene expression: the enhancer of trithorax and polycomb corto interacts with methylated ribosomal protein l12 via its chromodomain. PLoS Genet *8*, e1003006.

Colombani, J., Andersen, D.S., and Léopold, P. (2012). Secreted peptide Dilp8 coordinates Drosophila tissue growth with developmental timing. Science *336*, 582-85.

Debat, V., and Peronnet, F. (2013). Asymmetric flies: The control of developmental noise in Drosophila. Fly (Austin) *7*, 1-8.

Debat, V., Bloyer, S., Faradji, F., Gidaszewski, N., Navarro, N., Orozco-Terwengel, P., Ribeiro, V., Schlötterer, C., Deutsch, J.S., and Peronnet, F. (2011). Developmental Stability: A Major Role for Cyclin G in Drosophila melanogaster. PLoS Genet *7*, e1002314.

Debat, V., Milton, C.C., Rutherford, S., Klingenberg, C.P., and Hoffmann, A.A. (2006). Hsp90 and the quantitative variation of wing shape in Drosophila melanogaster. Evolution *60*, 2529-538.

Dey, A., Seshasayee, D., Noubade, R., French, D.M., Liu, J., Chaurushiya, M.S., Kirkpatrick, D.S., Pham, V.C., Lill, J.R., et al. (2012). Loss of the tumor suppressor BAP1 causes myeloid transformation. Science *337*, 1541-46.

Di Croce, L., and Helin, K. (2013). Transcriptional regulation by Polycomb group proteins. Nat Struct Mol Biol *20*, 1147-155.

Dupont, C.A., Dardalhon-Cuménal, D., Kyba, M., Brock, H.W., Randsholt, N.B., and Peronnet, F. (2015). Drosophila Cyclin G and epigenetic maintenance of gene expression during development. Epigenetics Chromatin *8*, 18.

Faradji, F., Bloyer, S., Dardalhon-Cuménal, D., Randsholt, N.B., and Peronnet, F. (2011). Drosophila melanogaster Cyclin G coordinates cell growth and cell proliferation. Cell Cycle *10*, 1-14.

Faradji, F., Bloyer, S., Dardalhon-Cuménal, D., Randsholt, N.B., and Peronnet, F. (2014). Erratum to Faradji F, et al. Cell Cycle Volume 10, Issue 5; pp. 805 - 818. Cell Cycle *13*, 2480-0.

Feder, M.E., and Hofmann, G.E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological

physiology. Annual review of physiology *61*, 243-282.

Fisher, C.L., Lee, I., Bloyer, S., Bozza, S., Chevalier, J., Dahl, A., Bodner, C., Helgason, C.D., Hess, J.L., et al. (2010). Additional sex combs-like 1 belongs to the enhancer of trithorax and polycomb group and genetically interacts with Cbx2 in mice. Dev Biol *337*, 9-15.

Fritsch, C., Beuchle, D., and Müller, J. (2003). Molecular and genetic analysis of the Polycomb group gene Sex combs extra/Ring in Drosophila. Mech Dev *120*, 949-954.

Garelli, A., Gontijo, A.M., Miguela, V., Caparros, E., and Dominguez, M. (2012). Imaginal discs secrete insulin-like peptide 8 to mediate plasticity of growth and maturation. Science *336*, 579-582.

Gaytán de Ayala Alonso, A., Gutiérrez, L., Fritsch, C., Papp, B., Beuchle, D., and Müller, J. (2007). A genetic screen identifies novel polycomb group genes in Drosophila. Genetics *176*, 2099-2108.

Gildea, J.J., Lopez, R., and 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.

Giot, L., Bader, J.S., Brouwer, C., Chaudhuri, A., Kuang, B., Li, Y., Hao, Y.L., Ooi, C.E., Godwin, B., et al. (2003). A protein interaction map of Drosophila melanogaster. Science *302*, 1727-736.

Grau, D.J., Chapman, B.A., Garlick, J.D., Borowsky, M., Francis, N.J., and Kingston, R.E. (2011). Compaction of chromatin by diverse Polycomb group proteins requires localized regions of high charge. Genes Dev *25*, 2210-221.

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

Grossniklaus, U., and Paro, R. (2014). Transcriptional Silencing by Polycomb-Group Proteins. Cold Spring Harb Perspect Biol *6*

Gutiérrez, L., Oktaba, K., Scheuermann, J.C., Gambetta, M.C., Ly-Hartig, N., and Müller, J. (2012). The role of the histone H2A ubiquitinase Sce in Polycomb repression. Development *139*, 117-127.

Huang, D. .W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2009). Systematic and

integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nat Protoc *4*, 44-57.

Huang, d.a. .W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2009). Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. Nucleic Acids Res *37*, 1-13.

Huynh, C.Q., and Zieler, H. (1999). Construction of modular and versatile plasmid vectors for the high-level expression of single or multiple genes in insects and insect cell lines. J Mol Biol *288*, 13-20.

Ideker, T., Ozier, O., Schwikowski, B., and Siegel, A.F. (2002). Discovering regulatory and signalling circuits in molecular interaction networks. Bioinformatics *18 Suppl 1*, S233-240.

Jensen, L.J., Kuhn, M., Stark, M., Chaffron, S., Creevey, C., Muller, J., Doerks, T., Julien, P., Roth, A., et al. (2009). STRING 8--a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. Nucleic Acids Res *37*, D412-16.

Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., and Salzberg, S.L. (2013). TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. Genome Biol *14*, R36.

Kingston, R.E., and Tamkun, J.W. (2014). Transcriptional Regulation by Trithorax-Group Proteins. Cold Spring Harb Perspect Biol *6*

Kitano, H. (2004). Biological robustness. Nat Rev Genet *5*, 826-837.

Lawrence, M., Huber, W., Pagès, H., Aboyoun, P., Carlson, M., Gentleman, R., Morgan, M.T., and Carey, V.J. (2013). Software for computing and annotating genomic ranges. PLoS Comput Biol *9*, e1003118.

Leamy, L.J., Routman, E.J., and Cheverud, J.M. (2002). An epistatic genetic basis for fluctuating asymmetry of mandible size in mice. Evolution *56*, 642-653.

Leamy, L.J., Workman, M.S., Routman, E.J., and Cheverud, J.M. (2005). An epistatic genetic basis for fluctuating asymmetry of tooth size and shape in mice. Heredity (Edinb) *94*, 316-325.

Lee, H.G., Kahn, T.G., Simcox, A., Schwartz, Y.B., and Pirrotta, V. (2015). Genome-wide activities of Polycomb complexes control pervasive transcription. Genome Res

Levy, S.F., and Siegal, M.L. (2008). Network hubs buffer environmental

variation in Saccharomyces cerevisiae. PLoS Biol *6*, e264.

Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biol *15*, 550.

McAdams, H.H., and Arkin, A. (1997). Stochastic mechanisms in gene expression. Proceedings of the National Academy of Sciences *94*, 814-19.

Milne, T.A., Sinclair, D.A., and Brock, H.W. (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.

Milton, C.C., Huynh, B., Batterham, P., Rutherford, S.L., and Hoffmann, A.A. (2003). Quantitative trait symmetry independent of Hsp90 buffering: distinct modes of genetic canalization and developmental stability. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 13396-3401.

Morata, G., and Ripoll, P. (1975). Minutes: mutants of drosophila autonomously affecting cell division rate. Dev Biol *42*, 211-221.

Murali, T., Pacifico, S., Yu, J., Guest, S., Roberts, G.G., and Finley, R.L. (2011). DroID 2011: a comprehensive, integrated resource for protein, transcription factor, RNA and gene interactions for Drosophila. Nucleic Acids Res *39*, D736-743.

de Napoles, M., Mermoud, J.E., Wakao, R., Tang, Y.A., Endoh, M., Appanah, R., Nesterova, T.B., Silva, J., Otte, A.P., et al. (2004). Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. Dev Cell *7*, 663-676.

Nekrasov, M., Klymenko, T., Fraterman, S., Papp, B., Oktaba, K., Köcher, T., Cohen, A., Stunnenberg, H.G., Wilm, M., and Müller, J. (2007). Pcl-PRC2 is needed to generate high levels of H3-K27 trimethylation at Polycomb target genes. EMBO J *26*, 4078-088.

Neto-Silva, R.M., Wells, B.S., and Johnston, L.A. (2009). Mechanisms of growth and homeostasis in the Drosophila wing. Annu Rev Cell Dev Biol *25*, 197-220.

Newman, M.E.J. (2003). The structure and function of complex networks. SIAM Review *45*, 167-256.

Nijhout, F., and Davidowitz, G. (2003). Developmental Perspectives on

Phenotypic Variation, Canalization, and Fluctuating Asymmetry. In Developmental instability, causes and consequences, M. Polak, eds. (New York: Oxford University Press).

Palmer, A.R., and Strobeck, C. (1992). Fluctuating asymmetry as a measure of developmental stability: Implications of non-normal distributions and power of statistical tests. Acta Zool. Fennica *191*, 57-72.

Palmer, R.A. (1994). Fluctuating asymmetry analysis: a primer. In Developmental Instability: Its Origins and Evolutionary Implications (T. A. Markow. Netherlands, Kluwer Academic Publishers).

Parker, J. (2011). Morphogens, nutrients, and the basis of organ scaling. Evol Dev *13*, 304-314.

Parker, N.F., and Shingleton, A.W. (2011). The coordination of growth among Drosophila organs in response to localized growth-perturbation. Dev Biol *357*, 318-325.

Queitsch, C., Sangster, T.A., and Lindquist, S. (2002). Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. Nature *417*, 618-624.

Rajala, T., Häkkinen, A., Healy, S., Yli-Harja, O., and Ribeiro, A.S. (2010). Effects of transcriptional pausing on gene expression dynamics. PLoS Comput Biol *6*, e1000704.

Rutherford, S, Hirate, Y, and Swalla, BJ (2007). The Hsp90 capacitor, developmental remodeling and evolution: The robustness of gene networks and the curious evolvability of metamorphosis. Crit Rev Biochem Mol *42*, 355-372.

Rutherford, S., Knapp, J.R., and Csermely, P. (2007). Hsp90 and developmental networks. Adv Exp Med Biol *594*, 190-97.

Rutherford, S.L., and Lindquist, S. (1998). Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. Nature *396*, 336-342.

Salvaing, J., Decoville, M., Mouchel-Vielh, E., Bussière, M., Daulny, A., Boldyreva, L., Zhimulev, I., Locker, D., and 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, J.S., and Peronnet, F. (2003). The Drosophila Corto protein interacts with Polycomb-group proteins and

the GAGA factor. Nucleic Acids Res *31*, 2873-882.

Salvaing, J., Nagel, A.C., Mouchel-Vielh, E., Bloyer, S., Maier, D., Preiss, A., and Peronnet, F. (2008). The enhancer of trithorax and polycomb corto interacts with cyclin G in Drosophila. PLoS One *3*, e1658.

Sanchez, A., Choubey, S., and Kondev, J. (2013). Regulation of noise in gene expression. Annu Rev Biophys *42*, 469-491.

Sangster, T.A., Salathia, N., Undurraga, S., Milo, R., Schellenberg, K., Lindquist, S., and Queitsch, C. (2008). HSP90 affects the expression of genetic variation and developmental stability in quantitative traits. Proc Natl Acad Sci U S A *105*, 2963-68.

Schaaf, C.A., Misulovin, Z., Gause, M., Koenig, A., Gohara, D.W., Watson, A., and Dorsett, D. (2013). Cohesin and polycomb proteins functionally interact to control transcription at silenced and active genes. PLoS Genet *9*, e1003560.

Scheuermann, J.C., de Ayala Alonso, A.G., Oktaba, K., Ly-Hartig, N., McGinty, R.K., Fraterman, S., Wilm, M., Muir, T.W., and Müller, J. (2010). Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB. Nature *465*, 243-47.

Scheuermann, J.C., Gutiérrez, L., and Müller, J. (2012). Histone H2A monoubiquitination and Polycomb repression: the missing pieces of the puzzle. Fly (Austin) *6*, 162-68.

Schwartz, A.S., Yu, J., Gardenour, K.R., Finley, R.L., and Ideker, T. (2009). Cost-effective strategies for completing the interactome. Nat Methods *6*, 55-61.

Sen, P., Dang, W., Donahue, G., Dai, J., Dorsey, J., Cao, X., Liu, W., Cao, K., Perry, R., et al. (2015). H3K36 methylation promotes longevity by enhancing transcriptional fidelity. Genes Dev *29*, 1362-376.

Siegal, M.L., and Bergman, A. (2002). Waddington's canalization revisited: developmental stability and evolution. Proc Natl Acad Sci U S A *99*, 10528-532.

Simpson, P. (1979). Parameters of cell competition in the compartments of the wing disc of Drosophila. Dev Biol *69*, 182-193.

Soto, M.C., Chou, T.B., and Bender, W. (1995). Comparison of germline mosaics of genes in the Polycomb group of Drosophila melanogaster.

Genetics *140*, 231-243.

Stanyon, C.A., Liu, G., Mangiola, B.A., Patel, N., Giot, L., Kuang, B., Zhang, H., Zhong, J., and Finley, R.L. (2004). A Drosophila protein-interaction map centered on cell-cycle regulators. Genome Biol *5*, R96.

Takahashi, H., Okada, Teramura, and Tsujino (2011). Deficiency mapping of the genomic regions associated with effects on developmental stability in Drosophila melanogaster. Evolution *65*, 3565-577.

Van Valen, L. (1962). A study of fluctuating asymmetry. Evolution *16*, 125-142.

Venkatesh, S., Smolle, M., Li, H., Gogol, M.M., Saint, M., Kumar, S., Natarajan, K., and Workman, J.L. (2012). Set2 methylation of histone H3 lysine 36 suppresses histone exchange on transcribed genes. Nature *489*, 452-55.

Weinberger, L., Voichek, Y., Tirosh, I., Hornung, G., Amit, I., and Barkai, N. (2012). Expression Noise and Acetylation Profiles Distinguish HDAC Functions. Mol Cell *47*, 193-202.

Yeyati, P.L., Bancewicz, R.M., Maule, J., and van Heyningen, V. (2007). Hsp90 selectively modulates phenotype in vertebrate development. PLoS Genet *3*, e43.

Yu, H., Kim, P.M., Sprecher, E., Trifonov, V., and Gerstein, M. (2007). The importance of bottlenecks in protein networks: correlation with gene essentiality and expression dynamics. PLoS Comput Biol *3*, e59.

PARTIE III-Données complémentaires

De façon intéressante, une analyse systématique des interations protéine-protéine chez la drosophile, projet « Drosophila Protein interacing Map » (DPiM,) montre qu'une grande majorité des partenaires protéiques de Cycline G est impliquée dans l'épissage des ARNm, ce qui suggère que Cycline G pourrait jouer un rôle dans ce mécanisme (Guruharsha *et al,.* 2011). Nous nous sommes donc demandé si l'augmentation du bruit de développement induit par la dérégulation de *CycG* pouvait être liée à des défauts d'épissage. Ceci m'a conduit à réaliser une analyse des interactions génétiques entre *CycG* et des gènes codant certains de ses partenaires impliqués dans l'épissage.

D'autre part, comme je l'ai décrit dans l'introduction, chez plusieurs organismes, la protéine Trithorax Brahma (hBRM), sous-unité ATPase du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF, serait impliquée dans la régulation de l'épissage alternatif (Batché *et al,.* 2006 ; Saha *et al,.* 2006 ; Tyagi *et al*,. 2009). J'ai également testé l'effet de mutants de gènes codant des protéines du complexe SWI/SNF sur l'AF induite par *CycG*.

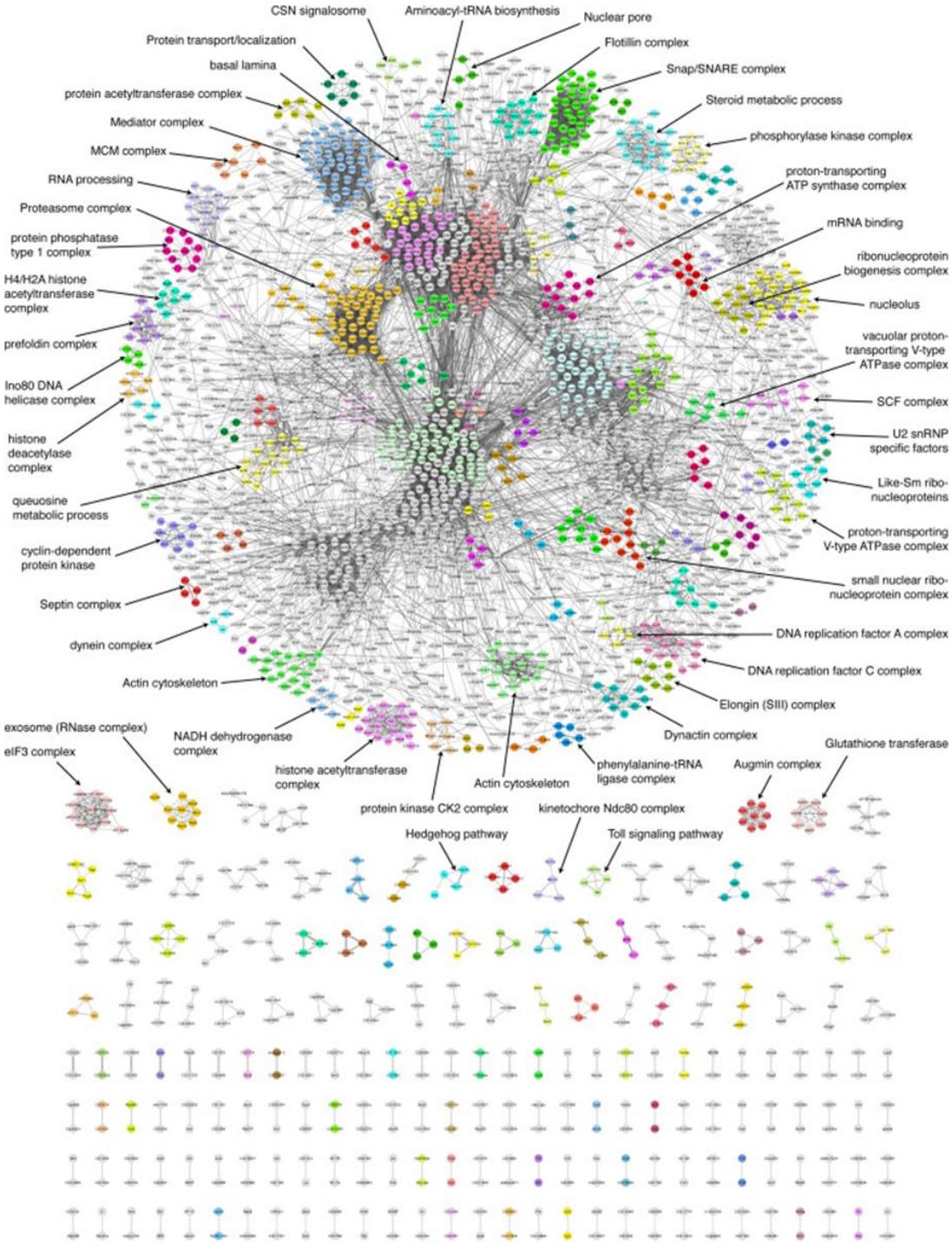

Figure 42 : Représentation graphique des 10969 interactions identifiées par le consortium DPiM (0,05% FDR) impliquant 2297 protéines. Les interactions protéiques sont représentées par des lignes grises. La carte contient 556 complexes, dont 377 sont interconnectés, ce qui représente près de 80% des protéines du réseau. Les cercles gris représentent les protéines dont la fonction n'est pas connue. (Guruharsha *et al.,* 2011)

1. Le consortium DPIM

L'objectif du projet DPiM est d'établir une carte complète des interactions protéine-protéine de *Drosophila melanogaster* (figure 42) (https://interfly.med.harvard.edu/). Pour cela, 5000 clones provenant de la collection BDGP exprimant des ADNc associés à une étiquette FLAG-HA ont été utilisés. Après transfection de chaque clone dans des cellules S2R+, et immunoprécipitation des protéines étiquetées, l'analyse par spectrométrie de masse (CoAP-MS) a permis d'identifier les partenaires protéiques de chaque protéine étiquetée. Cette analyse systématique a permis d'identifier 556 complexes protéiques (Guruharsha *et al.,* 2011).

De cette façon, le Consortium a identifié 39 protéines partenaires de Cycline G (tableau 8). De façon intéressante, 28 de ces partenaires sont impliqués dans l'épissage des ARNm. Parmi ceux-ci, il y a des membres des complexes snRNP comme SmD2, SmD3 et LSM12 ou des protéines plus particulièrement impliquées dans la régulation de l'épissage des ARNm comme les facteurs d'épissage SC35, qKr58E3 et RBM39 (Mount et Salz, 2000 ; Park, Parisky *et al,.* 2004 ; Olson, Blanchette *et al,.* 2007). Nous avons entrepris une analyse des interactions génétiques entre *CycG* et les gènes codant certains de ces facteurs d'épissage. Nous avons étudié si l'AF élevée due à la surexpression de *CycG* était modifié en contexte perte de fonction pour des gènes codant des partenaires de Cycline G. Puis nous avons réalisé la même étude en utilisant des souches permettant la surexpression de ces mêmes gènes.

Tableau 8 : Partenaires de Cycline G identifiés par DPiM chez *Drosophila melanogaster*

N°	Nom	FBgeneID	Localisation	GO Molecular Function	GO Biological Process
1	***CG10077***	FBgn0035720	65D3-65D4	ATP-dependent helicase activity, RNA helicase activity, nucleic acid binding, ATP binding	
2	***qkr58E-3/Kep1***	FBgn0022984	58D7-58D8	mRNA binding,RNA binding, regulation of alternative mRNA splicing, via spliceosome	regulation of alternative nuclear mRNA splicing, via spliceosome,apoptosis
3	***CG17838/Syp***	FBgn0038826	92F12-93A1	nucleotide binding, nucleic acid binding, mRNA binding, mRNA splicing, via spliceosome	
4	***CG4857/tyf***	FBgn0026083	4B1	partenaire d'Atx-2, positive regulation of translation	
5	***CG7878***	FBgn0037549	8,40E+14	ATP binding, ATP-dependent RNA helicase activity, helicase activity ,RNA binding	
6	***nito***	FBgn0027548	43F8-43F9	mRNA binding, nucleotide binding, nucleic acid binding, mRNA splicing, via spliceosome	regulation of transcription
7	***Psi***	FBgn0014870	53D14	mRNA binding, P-element somatic inhibitor, regulation of alternative mRNA splicing, via spliceosome, alternative splicing of P-element transposase	regulation of nuclear mRNA splicing, via spliceosome,negative regulation of nuclear mRNA splicing, via spliceosome,regulation of alternative nuclear mRNA splicing, via spliceosome,spermatogenesis,mRNA processing
8	***Zn72D***	FBgn0017453	72D6-72D10	zinc ion binding, mRNA binding, mRNA splicing, via spliceosome	phagocytosis, engulfment
9	***Atx2***	FBgn0041188	88F4	RNA-binding protein implicated in human neurodegenerative diseases, activator of PER translation in circadian neurons	phagocytosis, engulfment,compound eye development,regulation of actin filament polymerization,bristle development,oocyte differentiation

N°	Nom	FBgeneID	Localisation	GO Molecular Function	GO Biological Process
10	***bsf***	FBgn0032679	36F5	mRNA 3'-UTR binding, stabilization of bicoid mRNA	
11	***btz***	FBgn0045862	98B1-98B2	pole plasm oskar mRNA localization, colocalizes_with exon-exon junction complex	pole plasm protein localization,pole plasm oskar mRNA localization,oocyte microtubule cytoskeleton polarization,bicoid mRNA localization
12	***Cbp80***	FBgn0022942	4C11	RNA cap binding, protein binding, mRNA splicing, via spliceosome	RNA interference, production of siRNA,negative regulation of viral genome replication,nuclear mRNA splicing, via spliceosome,gene silencing by miRNA
13	***CG11505***	FBgn0035424	63C1	nucleic acid binding, nucleotide binding	
14	***CG15735***	FBgn0030364	11A1	splicing, Garcia, 2013	
15	***CG6995/Saf-B***	FBgn0039229	96A23	nucleic acid binding,mRNA binding, nucleotide binding, regulation of alternative mRNA splicing, via spliceosome	
16	***CG8021***	FBgn0037602	85A5	nucleotide binding, nucleic acid binding , mRNA binding, colocalizes_with exon-exon junction complex	
17	***eIF4AIII***	FBgn0037573	84F11	ATP-dependent RNA helicase activity, ATP binding, translation initiation factor activity, mRNA splicing, via spliceosome	translational initiation,cellular response to DNA damage stimulus
18	***Imp***	FBgn0030235	9F1-9F4	mRNA binding, IGF-II mRNA-binding protein, mRNA splicing, via spliceosome, (affected morphological traits only at 17°C, candidate plasticity gene, Carreira et al.)	spermatogenesis,nervous system development

N°	Nom	FBgeneID	Localisation	GO Molecular Function	GO Biological Process
19	***Map205***	FBgn0002645	100E3	microtubule binding	microtubule-based process
20	***SmD2***	FBgn0037434	83E4	RNA splicing factor activity, transesterification mechanism, mRNA splicing, via spliceosome	mitotic spindle organization,nuclear mRNA splicing, via spliceosome
21	***Upf1***	FBgn0030354	10F4	ATP binding, zinc ion binding,helicase activity, DNA binding, nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	gene silencing by miRNA,RNA interference,nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay
22	***CG10418***	FBgn0036277	69B2	regulation of alternative mRNA splicing, via spliceosome,	regulation of alternative nuclear mRNA splicing, via spliceosome,nuclear mRNA splicing, via spliceosome
23	***CG11266***	FBgn0031883	27D5	mRNA binding, nucleotide binding,RNA binding, regulation of alternative mRNA splicing, via spliceosome	regulation of alternative nuclear mRNA splicing, via spliceosome,RNA splicing
24	***CG17768***	FBgn0032240	3E1	U6 snRNA binding, splicing	
25	***CG2021***	FBgn0035271	62B4	ribonucleoprotein, LSM domain	nuclear mRNA splicing, via spliceosome
26	***CG3689***	FBgn0035987	67B5	hydrolase activity	mRNA cleavage
27	***CG9344***	FBgn0034564	89A5		nuclear mRNA splicing, via spliceosome
28	***coilin***	FBgn0033265	44B3		cajal body organization

N°	Nom	FBgeneID	Localisation	GO Molecular Function	GO Biological Process
29	***CycG***	FBgn0039858	100C7	cyclin-dependent protein kinase regulator activity	
30	***mRpL2***	FBgn0036135	68A7	structural constituent of ribosome	translation
31	***mTerf3***	FBgn0037008	77C6		mitochondrial DNA replication,transcription from mitochondrial promoter,mitochondrial translation
32	***nop5***	FBgn0026196	27C4		rRNA processing
33	***SC35***	FBgn0040286	33E4	nucleotide binding,mRNA binding,nucleic acid binding,protein binding	nuclear mRNA splicing, via spliceosome,regulation of alternative nuclear mRNA splicing, via spliceosome,mRNA splice site selection
34	***SmD3***	FBgn0023167	48E4		muscle organ development,peripheral nervous system development,mitotic spindle organization,lymph gland development,nuclear mRNA splicing, via spliceosome,central nervous system development,neuron differentiation
35	***CG14786***	FBgn0027794	2A4	transition metal ion binding, oxidoreductase activity	oxidation reduction
36	***CG3224***	FBgn0029885	6C3-6C4	nucleic acid binding,zinc ion binding	
37	***CG5746***	FBgn0039186	95F14		
38	***CG4611***	FBgn0035591	64C7	aucune info	
39	***CG6701***	FBgn0033889	99B9	zinc ion binding	

Tableau 9 : Lignées de *Drosophila melanogaster* utilisées pour l'analyse d'AF

Génes	Génotype	Référence/numéro de stock
ATX2	*yw; UAS-Atx2/+*	F001031
Bap170	*yw; P{EP}Bap170 ^{G5986} /CyO*	BL- 28471
Bap55	*yw; P{EPgy2}Bap55 ^{EY15967} /CyO*	BL- 21174
Brm	*yw; brm P{TRiP.HM04019}attP2*	BL-31712
	w; brm ^{2} /TM6B, Sb1 Tb1 ca1	BL-3619
	w; P{XP}brm ^{d00415}	BL-19144
Bsf	*yw; P{EPgy2}bsfEY23345*	BL-22624
Cbp80	*yw; P{TRiP.HMS00052}attP2*	BL-33648
CG11266	*yw; P{TRiP.GLC01382}attP2/TM3, Sb1*	BL-44431
CG11505	*yw; P{EPgy2}CG11505EY15686*	BL-21152
CG17768	*yW; P{TRiP.HM05217}attP2*	BL-29537
CG3224	*w; P{w[+mC]=UAS-CG3224.C}2*	BL-39618
CG3689	*yw; P{w[+mC]=EP}CG3689/TM3, Sb[1] Ser[1]*	BL-28422
CG7878	*yw; P{EPgy2}CG7878[EY03806]*	BL-19835
Coilin	*w; UAS-coilin[vw12]/+*	Liu *et al.*, 2009
CycG	*w ; da::gal4>>UAS::CycG$^{\Delta PEST}$*	Dardalhon-Cuménal *et al.* , 2015
EiF4AIII	*yw; UAS-eiF4AIII*	F001132
Kis	*kis1 $^{cn1\ bw1\ sp1}$ /SM6a*	BL-431
LSM12	*yw; p{EPgy2}CG15735[EY01098]*	BL-15060
MAP205	*w; UAS-MAP205-49/+*	Archambaut *et al.*, 2008
	w; UAS-MAP205-WT/+	Archambaut et al., 2008
Mor	*w; mor^{1} /TM6B, Tb1*	BL-3615
	yw; mor$^{[EY00296]}$ /+	
Osa	*w; P{neoFRT}82B osa ^{308} /TM6B, Tb1*	BL-5949
	yw; P{EPgy2}osa ^{EY09619} /TM3, Sb1 Ser1	BL-16944
Polybromo	*yw; P{EPgy2}polybromo ^{EY14080}*	BL-20789
Psi	*yw; P{TRiP.HMS00140}attP2*	BL-34825
qKr58E	*w; qKr58E[Df(2R)Exel7173] /CyO*	BL-7903
	w; qKr58E[Df(2R)02311]/CyO	BL-5421
	w; qkr58E-3[minus]/CyO	BL-40966
Saf-B	*yw; UAS-SafB-GFP/+*	Alfonso-Parra, 2010
	w; p{w[+mC]=Saf-B[G16146]/+	BL-32026
	yw; P{TRiP.HMC03311}attP2	BL-51759
SC35	*yw; P{EPgy2}SC35/+*	BL-20169
SmD2	*w; P{EP}SmD2EP3399/+*	BL-17122
	w; PBac{PB}CG17919^{c05035} SmD2 ^{c05035}	BL-17687
	w; SmD2[Df(3R)BSC744]/TM6C, Sb1 cu1	BL-26842
SmD3	*yw; P{w[+mC]=lacW}SmD3$^{[k09029]}$ /CyO*	BL-10414
	yw/w; UAS-SmD3-3HA/+; da::Gal4/+	F000755
Upf1	*w; P{EP}Upf1 ^{G1161}*	BL-33539
Zn72D	*w; Zn72D ^{5B1} P{neoFRT}80B/TM6B, Tb1*	BL-32669
	w; Zn72D ^{1A14} /TM6B, Tb1	BL-32668
	w; P{GSV1}Taf4 $^{EP-501}$	BL-43424

2. Méthodologie

2.1 Lignées et croisements

Afin de minimiser l'effet de l'environnement, nous avons travaillé dans des conditions très standardisées. Pour chaque mutant ou lignée « gain de fonction » testé, nous avons réalisé 5 croisements, chacun comprenant 5 mâles et 6 femelles. Les mouches ont été élevées à 25°C et repiquées tous les deux jours. Pour ces expériences, nous avons croisé des mâles *rec10* (porteurs d'un chromosome recombinant *da::gal4 ; UAS::CycG*$^{\Delta PEST}$ permettant de surexprimer de façon ubiquitaire *CycG*) avec des femelles mutantes (ou gain de fonction) pour des gènes codant des facteurs d'épissage des sous-unités du complexe SWI/SNF. Les lignées sont décrites dans le tableau 9 (figure 43).

2.2 Morphométrie

Pour chaque série de croisements, nous avons collecté au hasard 30 femelles. Les ailes droites et gauches de ces femelles ont été montées entre lame et lamelle, et les lames ont été scannées avec un Nanozoomer (Hamamatsu). Pour simplifier l'analyse, nous avons mesuré la longueur des ailes entre les points de repères 3 et 13 à l'aide du logiciel Image J (figure 44). Les valeurs d'AF ont été comparées entre les différents génotypes par un test F.

$$\frac{\textit{Mutant}}{\textit{Balanceur}} \quad X \quad \frac{\textit{da::Gal4}}{\textit{Balanceur}}$$

$$\frac{+}{+} \quad X \quad \frac{\textit{da::Gal4}}{\textit{Balanceur}}$$

$$\frac{+}{+} \quad X \quad \frac{\textit{rec10}}{\textit{Balanceur}}$$

$$\frac{\textit{Mutant}}{\textit{Balanceur}} \quad X \quad \frac{\textit{rec10}}{\textit{Balanceur}}$$

Figure 43 : Croisements pour analyser l'AF de la taille des ailes de la Drosophile.
LLe chromosome *rec10* est issu d'une recombinaison de*da::gal4* et *UAS::CycG*$^{\Delta PEST}$permettant de surexprimer de façon ubiquitaire *CycG*. Il est conservé en mâles à 18°C pour éviter les effets délétères de la surexpression de *CycG*.

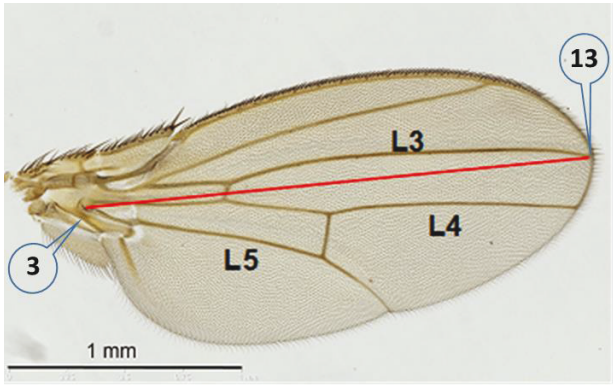

Figure 44 : Positionnement des points de repères utilisés pour les mesures de taille des ailes. En bleu, sont indiqués les points de repères 3 et 13 utilisés pour mesurer la longueur des ailes.

3. Résultats

3.1 Effet de mutations perte de fonction pour des facteurs d'épissage sur l'AF de taille des ailes induite par *CycG*.

Nous avons testé des lignées mutées pour les gènes *psi, LSM4, SmD2, SmD3, Zn72D, Saf-B, RBM39, qKr58E3.* Les différents mutants testés, les valeurs d'AF et les valeurs statistiques sont indiqués dans le tableau 10. Tous les mutants hétérozygotes testés présentent une AF identique à celle du contrôle négatif (tableau 10). Nos analyses montrent une augmentation significative de l'AF induite par *CycG* par les mutants *SmD2, SmD3, Saf-B* et *qKr58E3* (figure 45). A l'inverse, nous observons une suppression significative de l'AF induite par *CycG* par le mutant *RBM39* (figures 45). Ces résultats suggèrent que l'interaction entre *CycG* et ces 5 gènes est importante pour la stabilité du développement.

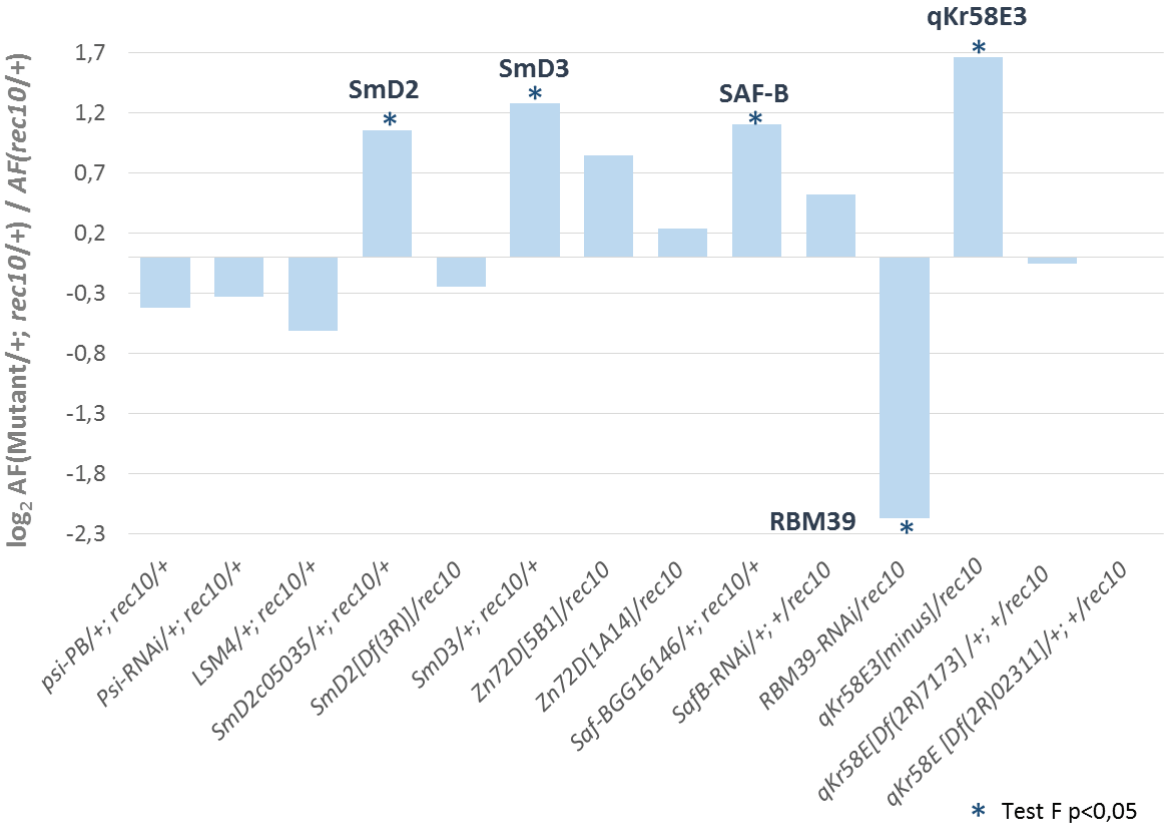

Figure 45 : Interactions génétiques entre *CycG* et des gènes impliqués dans les processus d'épissage *psi, LSM4, SmD2, SmD3, Zn72D, Saf-B, RBM39, qKr58E3.* Le diagramme représente le $\log_2$ du rapport de l'AF du mutant combiné à la surexpression de *CycG (rec10)* sur l'AF liée à la surexpression de *CycG*. L'étoile indique une modification significative de l'AF (Test F, p<0,05). L'AF a été mesurée sur des populations de 30 individus.

Tableau 10 : Interactions génétiques entre CycG et des gènes impliqués dans les processus d'épissage

Série	Gène testé	Génotype	FA	degrés de liberté	F	P-value
1	**T négatif**	**w[NV]/+**	**49,87500**	**27,20423**		
	T positif	**+/rec10**	**912,20000**	**28,89088**		
	Psi	Psi/+; rec10/+	683,24790	28,81436	0,749011072	0,775334361
	Psi	Psi/+	20,23477	24,62313	45,08081881	1,44991E-16
	LSM4	CG17768/+; rec10/+	596,00190	28,83984	1,530532034	0,133083384
	LSM4	CG17768/+	29,08690	17,83606	31,36119696	5,9896E-10
2	**T négatif**	**w[NV]/+**	**25,52886**	**26,06862**		
	T positif	**+/rec10**	**838,62380**	**28,91679**		
	T négatif	**daGal4/+**	**17,55**	**25,30**		
	SmD3	SmD3[k09029]/+; rec10/+	2029,70900	28,96708	2,420285472	0,011246602
	SmD2	SmD2[c05035]/+; rec10/+	1740,96300	28,94619	2,075976141	0,029054194
	SmD2	SmD2[c05035]/+; da/+	12,09004	23,10231	69,36484908	1,92114E-16
	Saf-B	Saf-B[G16146]/+; rec10/+	1799,64600	28,95607	2,145951498	0,023910538
	Saf-B	Saf-B[G16146]/daGal4	31,38	26,72466	27,0322558	6,90202E-13
	Zn72D	Zn72D[1A14]/+; rec10/+	954,06350	28,94548	1,137653737	0,367655632
	Zn72D	Zn72D[1A14]/+; da/+	24,71471	26,32838	33,93217238	2,55267E-14
	Zn72D	Zn72D[5B1]/+; rec10/+	1415,29700	28,9491	1,687642302	0,086179828
	Zn72D	Zn72D[5B1]/+; da/+	70,40556	27,42498	11,91132916	3,62513E-09
	Psi	Psi/+; rec10/+	668,88250	28,85711	1,253768487	0,276789746
	Psi	Psi/+; da/+	26,28540	25,65622	31,90454777	1,45011E-13
3	**T négatif**	**w[NV]/+**	**33,76458**	**26,65621**		
	T négatif	**daGal4/+**	**41,29308**	**28,07544**		
	T positif	**+/rec10 (2)**	**945,02870**	**28,94722**		
	RBM39	CG11266/rec10	210,67750	28,62868	4,485665057	8,0732E-05
	RBM39	CG11266/daGal4	29,18	26,10631	32,38676713	4,53274E-14
	SmD2	SmD2[Df(3R)BSC744]/rec10	796,27540	28,89787	1,186811372	0,326773614
	SmD2	SmD2[Df(3R)BSC744]/daGal4	69,37	27,88324	13,62262637	7,53168E-10
	Zn72D	Zn72D[1A14]/rec10	1114,24200	27,95816	1,179056255	0,33537076
	Zn72D	Zn72D[1A14]/daGal4	15,06	24,20869	62,74815978	1,58529E-16
	Zn72D	Zn72D[5B1]/rec10	1695,66100	28,95709	1,794295771	0,063956874
	Zn72D	Zn72D[5B1]/daGal4	18,78	24,44545	50,31222981	2,07308E-15
	Saf-B	Saf-B^{RNAi}/+; +/rec10	1355,11000	29,94968	1,433935287	0,169998128
	Saf-B	Saf-B^{RNAi}/daGal4	170,24	28,11069	5,551253253	1,02442E-05
	qKr58E-3	qKr58E3[minus]/rec10	2987,76600	28,97577	3,161561125	0,001633427
	qKr58E	qKr58E3[minus]/daGal4	36,58	26,73545	25,83431223	7,17849E-13
	qKr58E	qKr58E[Df(2R)Exel7173] /+; +/rec10	912,42780	24,93437	1,035729841	0,468835159
	qKr58E	qKr58E[Df(2R)Exel7173] /daGal4	23,69	24,90030	39,89329606	3,02317E-14
	qKr58E	qKr58E [Df(2R)02311]/daGal4	29,18	26,53622	32,38310483	4,53905E-14
	qKr58E	qKr58E[Df(2R)02311]/+; +/rec10	950,60970	29,93016	1,005905641	0,492907104

3.2 Effet de la surexpression de gènes d'épissage sur l'AF de taille des ailes.

Des lignées permettant de surexprimer les gènes *SmD2, SmD3, LSM12, Saf-B, CG3224, SC35, CG3689, eiF4AIII, Upf1, CG7878, bsF, Cpb80, CG11505, Coilin* et *MAP205* ont été utilisées pour ces premières analyses. Les différentes lignées testées, les valeurs d'AF et les valeurs statistiques sont indiqués dans le tableau 11. Nos résultats montrent que la surexpression de chaque gène étudié, non associée à la surexpression de *CycG,* ne modifie pas l'AF de taille des ailes (tableau 11). En revanche une augmentation significative de l'AF due à la surexpression de *CycG* par la surexpression des gènes *SmD2, SmD3, LSM12, CG3689, CG11505, Coilin,* impliqués dans l'épissage, et par la surexpression du gène *MAP205*, lié à l'organisation des microtubules, est observée (figure 46). A l'inverse, la surexpression du gène *SC35* supprime significativement l'AF induit par *CycG* (figure 46). L'interaction entre Cycline G et ces 7 facteurs d'épissage (SmD2, SmD3, LSM12, CG3689, CG11505, Coilin et SC25) ou la protéine Map205 pourraient participer à la stabilité du développement.

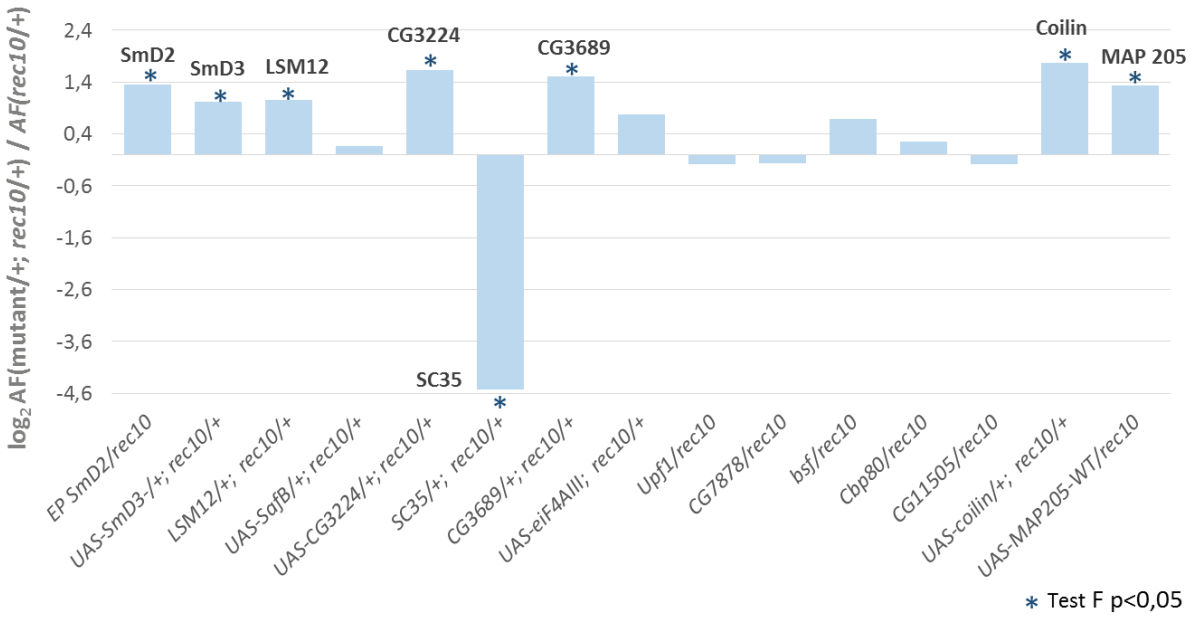

Figure 46 : Interactions génétiques entre *CycG* et des gènes codant des facteurs d'épissage (*SmD2, SmD3, LSM12, Saf-B, CG3224, SC35, CG3689, eiF4AIII, Upf1, CG7878, bsF, Cpb80, CG11505, Coilin) et* le gène *MAP205* impliqué dans l'organisation des microtubules. Le diagramme représente le $\log_2$ du rapport de l'AF du mutant combiné à la surexpression de *CycG (rec10)* sur l'AF liée à l'expression de *CycG*. L'étoile indique une modification significative de l'AF (F test, p<0,05). L'AF a été mesurée sur des populations de 30 individus.

Tableau 11 : Interactions génétiques entre CycG et des gènes impliqués dans les processus d'épissage

Série	Gène testé	Génotype	FA	degrés de liberté	F	P-value
1	**T négatif**	***w; daGal4/+***	**25,11**	**27,27**		
	T négatif	***w[NV]/+***	**34,46**	**27,82**		
	T négatif	***yw; daGal4/+***	**23,19**	**27,27**		
	T négatif	***yw/+***	**14,90**	**23,38**		
	T positif	***w[NV]/+; +/rec10***	**741,50**	**28,92**		
	T positif	***yw/+; +/rec10***	**645,57**	**28,94**		
	CG7878	*yw; EP CG7878/rec10*	576,47	28,93	1,119865097	0,383317044
	CG7878	*yw; EP CG7878/+*	26,05	27,27	24,78533642	5,04391E-13
	Zn72D	*w; EP Zn72D/+*	12,00	26,43	53,79775	8,17503E-17
	ATX2	*yw; UAS-Atx2/+*	14,53	26,91	44,43441829	8,97955E-16
	bsf	*yw; EP bsf/rec10*	1036,99	28,97	0,622546259	0,891972361
	bsf	*yw; EP bsf/+*	419,33	28,91	1,539541471	0,129839146
	cbp80	*yw; EP Cbp80/rec10*	764,23	28,96	1,183795326	0,329179723
	cbp80	*yw; EP Cbp80/+*	12,88	26,34	50,10333858	1,99782E-16
	CG11505	*yw; EP CG11505/rec10*	564,89	28,89	1,142831601	0,363182904
	CG11505	*yw; EP CG11505/+*	12,59	25,10	51,28011025	4,95685E-16
	MAP205	*w; UAS-MAP205-49/rec10*	1715,69	28,97	2,313807338	0,015040285
	MAP205	*w; UAS-MAP205-49/+*	24,46	26,84	30,3162241	1,02022E-13
	MAP205	*w; UAS-MAP205-WT/rec10*	1872,24	28,95	2,524931487	0,008477119
	MAP205	*w; UAS-MAP205-WT/+*	8,63	24,02	85,94088721	3,97068E-18
	SmD2	*w; EP SmD2/rec10*	1891,40	28,98	2,550765534	0,007909487
	SmD2	*w; EP SmD2/+*	31,36	28,09	23,64770285	3,97849E-13
	Upf1	*w; EP Upf1/rec10*	652,07	28,92	1,1371434	0,368098577
	Upf1	*w; EP Upf1/+*	17,37	26,46	42,69151538	1,4794E-15
2	**T positif**	***w[NV]/+; +/rec10***	**429,05**	**28,85**		
	T négatif	***w[NV]/+; +/da::Gal4***	**14,06**	**26,20**		
	T négatif	***yw/w[NV]/+; +/da::Gal4***	**24,28**	**27,36**		
	T négatif	***yw/w[NV]/+; +/rec10***	**633,98**	**28,85**		
	Saf-B	*yw/w; UAS-SafB-GFP/+; rec10/+*	706,81	28,92	1,114867131	0,387799018
	Saf-B	*yw/yw; UAS-SafB-GFP/+; daGal4/+*	52,50	27,66	12,07620854	3,0906E-09
	LSM12	*yw/w; EPgy2}CG15735$^{[EY01098]}$/+; rec10/+*	1311,98	28,96	2,069415654	0,029590953
	LSM12	*yw/yw; EPgy2}CG15735$^{[EY01098]}$; da::Gal4/+*	55,32	28,56	11,46008463	3,36079E-09
	eiF4AIII	*yw/w; UAS-eiF4AIII; rec10/+*	1083,82	28,97	1,709532641	0,081074142
	eiF4AIII	*yw/yw; UAS-eiF4AIII; da::Gal4/+*	52,55	28,45	12,06351049	1,81917E-09
	CG3224	*w/w; UAS-CG3224/+; rec10/+*	1328,83	28,98	3,097131531	0,00191805
	CG3224	*w/w; UAS-CG3224/+; da::Gal4/+*	18,45	27,92	23,25773214	1,11811E-12
	CG3689	*yw/w; P{EP}CG3689^{G19200}/+; rec10/+*	1803,67	28,97	2,844973326	0,003644403
	CG3689	*yw/yw; P{EP}CG3689^{G19200}/+; da::Gal4/+*	25,98	27,59	24,40494301	6,12313E-13
	coilin	*w/w; UAS-coilin[vw12]/+; rec10/+*	1454,73	25,98	3,390569704	0,001436142
	coilin	*w/w; UAS-coilin[vw12]/+; da::Gal4/+*	29,68	27,75	14,4537797	3,73111E-10
	SC35	*yw/w; P{EPgy2}SC35/+; rec10/+*	27,44	27,53	23,10067012	1,21678E-12
	SC35	*yw/yw; P{EPgy2}SC35/+; da::Gal4/+*	17,23	23,54	36,7849055	2,22092E-13
	SmD3	*yw/w; UAS-SmD3-3HA/+; rec10/+*	1285,55	28,95	2,027731623	0,033245266
	SmD3	*yw/w; UAS-SmD3-3HA/+; da::Gal4/+*	20,54	25,53	30,86468605	2,14553E-13

3.3 Influence de mutants des sous-unités du complexe SWI/SNF sur l'AF induite par *CycG*.

Les mesures d'AF ont été réalisées d'une part en contexte mutant pour les gènes *brm, mor, Bap55*. Chez la drosophile, ces 3 gènes codent pour les sous-unités communes aux complexes BAP et PBAP homologues du complexe SWI/SNF. D'autre part, nous avons mesuré l'AF en contexte mutant pour les gènes codant des sous-unités spécifiques, le gène *osa* codant une des sous-unités du complexe BAP et les gènes *polybromo* (*pb)* et *Bap170* codant deux sous-unités du complexe PBAP. Les différentes lignées testées, les valeurs d'AF et les valeurs statistiques sont indiqués dans le tableau 12. A l'état hétérozygote chacun de ces mutants présente une AF comparable à l'AF mesurée chez le contrôle négatif. De façon intéressante, nous observons une augmentation significative de l'AF due à la surexpression de *CycG* par allèle *brm*^{2}. Ces résultats ont été reproduits dans trois séries experimentales indépendantes (figure 47). Nous observons également une augmentation de l'AF liée à la surexpression de *CycG* lorsque le gène *brm* est inactivé par ARNi. Enfin, nous ne pouvons pas conclure concernant les mutations du gène *mor* (figure 47) et du gène *polybromo* (figure 48), nos analyses n'étant pas reproductibles. Toutefois, ces analyses devront être réalisées une troisième fois. Les mutants des gènes *Bap55* (figure 52), *Osa, Bap170* et *kis* (figure 48) ne montrent pas de modification de l'AF.
Nos résultats montrent que l'interaction entre *CycG* et *brm* pourrait être importante pour le maintien de la stabilité du développement

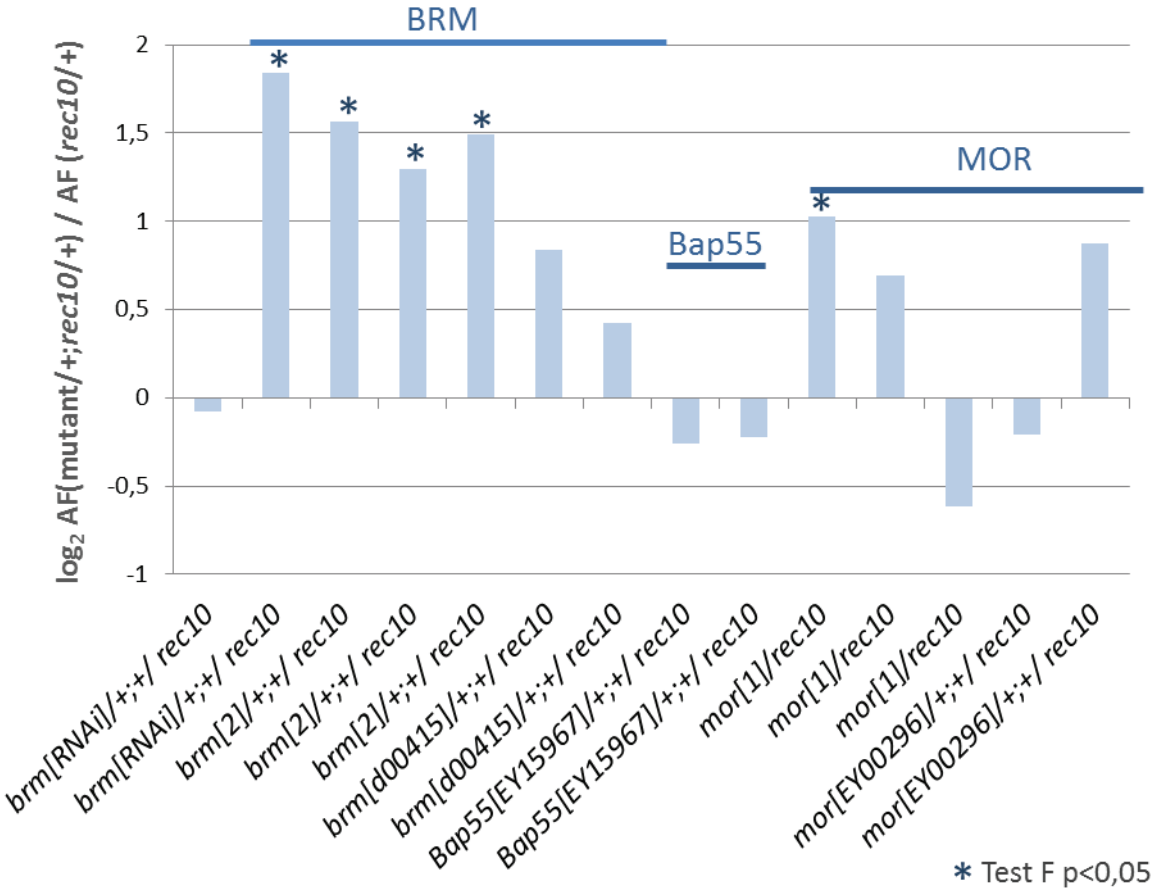

Figure 47 : Interactions génétiques entre *CycG* et les gènes codant les sous-unités communes des complexes BAP et PBAP *(brm, Bap55, mor).* Le diagramme représente le $\log_2$ du rapport de l'AF du mutant combiné à la surexpression de *CycG (rec10)* sur l'AF liée à l'expression de *CycG*. L'étoile indique une modification significative de l'AF (F test, p<0,05). L'AF a été mesurée sur des populations de 30 individus.

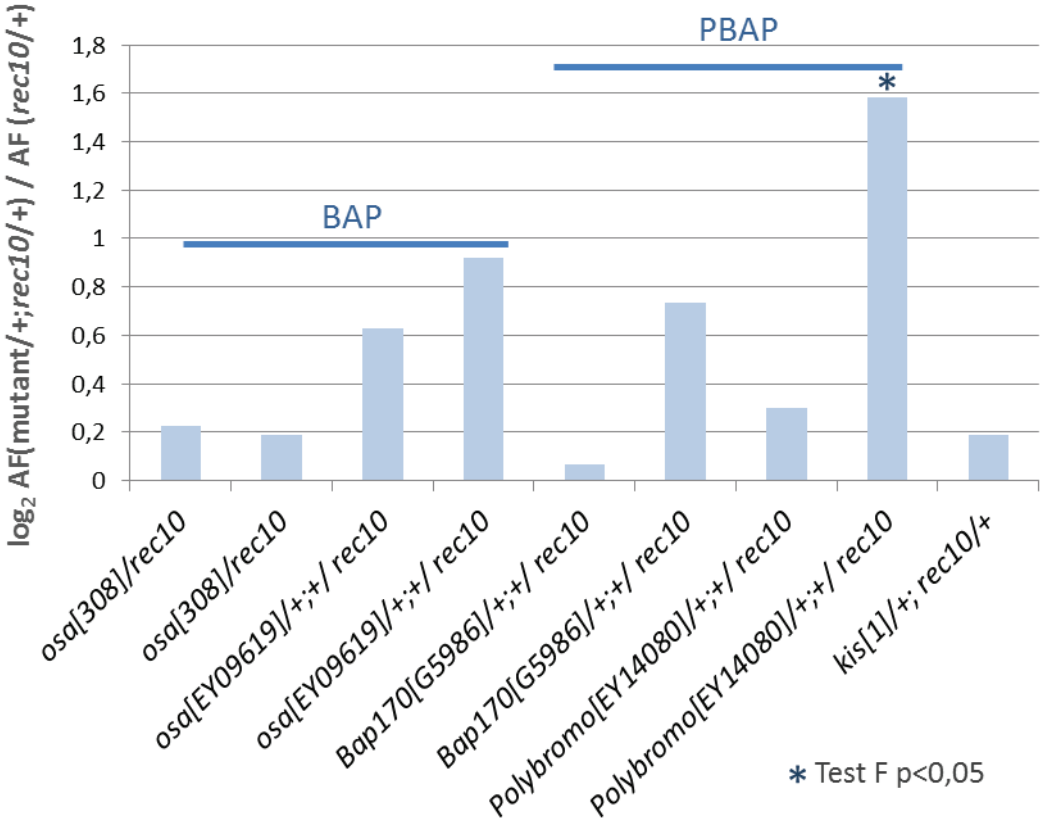

Figure 48 : Interactions génétiques entre *CycG* et les gènes codant des sous-unités spécifiques des complexes BAP ou PBAP *(Osa, Bap170, Polybromo)* et du gène trxG *kis.* Le diagramme représente le $\log_2$ du rapport de l'AF du mutant combiné à la surexpression de *CycG (rec10)* sur l'AF liée à l'expression de *CycG*. L'étoile indique une modification significative de l'AF (F test, p<0,05). L'AF a été mesurée sur des populations de 30 individus.

Tableau 12 : Interactions génétiques entre *CycG* et des gènes codant des sous-unités des complexes BAP et PBAP

Série	Gène testé	Génotype	FA	degrés de liberté	F	P-value
1	T positif	***w[NV]/+; +/rec10***	791,10	28,90		
	T positif	***yw/+; +/rec10***	760,25	28,89		
	T négatif	***w[NV]/+***	28,17	24,46		
	T négatif	***yw/yw***	24,07	20,13		
	T négatif	***w; +/da::gal4***	28,94	25,47		
	T négatif	***yw; +/da::gal4***	94,85	26,61		
	brm	*y/+; brm[RNAi]/+;+/ rec10*	720,66	28,76	1,054948716	0,444226923
	brm	*y/+; brm[RNAi]/+;+/ da::Gal4*	7,96	20,57	11,92179353	1,9233E-07
	brm	*w; brm[2]/+;+/ rec10*	2334,51	28,98	2,950977101	0,002775405
	brm	*w; brm[2]/+*	25,93	23,55	1,086327085	0,423622034
	brm	*w; brm[d00415]/+;+/ rec10*	1416,99	28,94	1,791176692	0,064518342
	brm	*w; brm[d00415]/+*	25,87	25,33	0,91832912	0,588780428
	mor	*w; mor[1]/+;+/ rec10*	1276,02	28,88	1,612980783	0,106050418
	mor	*w; mor[1]/+*	11,44	16,98	2,461930904	0,031143765
	mor	*yw; mor[EY00296]/+;+/ rec10*	656,88	28,74	1,157381085	0,350823934
	mor	*yw; mor[EY00296]/+*	3,65	7,22	6,599476623	0,007579819
	osa	*w; osa[308]/+;+/ rec10*	925,56	8,97	1,169970229	0,435493994
	osa	*w; osa[308]/+*	25,25	9,20	1,115645768	0,458832871
	osa	*yw; osa[EY09619]/+;+/ rec10*	1173,76	28,91	1,543899696	0,128296633
	osa	*yw; osa[EY09619]/+*	15,91	22,27	1,513337617	0,161070611
	bap55	*yw; Bap55[EY15967]/+;+/ rec10*	633,87	28,83	1,199384322	0,316887526
	bap55	*yw; Bap55[EY15967]/+*	17,20	19,89	1,399301609	0,225530671
	bap170	*yw; Bap170[G5986]/+;+/ rec10*	796,82	28,89	1,048100327	0,450980159
	bap170	*yw; Bap170[G5986]/+*	14,37	16,76	1,675135353	0,140435695
	polybromo	*yw; Polybromo[EY14080]/+;+/ rec10*	936,73	28,86	1,232121025	0,292234939
	polybromo	*yw; Polybromo[EY14080]/+*	5,51	11,61	4,367833153	0,006709301
2	T positif	***w[NV]/+; rec10/+***	**612,89**	**28,88**		
	T negatif	***w[NV]/+***	**33,87**	**26,31**		
	kis	*kis[1]/+; rec10/+*	699,29	28,86	1,14096851	0,364787788
	kis	*kis[1]/+*	25,96	26,43	1,304604341	0,249169424
3	T positif	***w[NV]/+; rec10/+***	**883,99**	**28,96232**		
	T negatif	***w[NV]/+***	**23,43**	**27,40289**		
	mor	*w; mor[1]/rec10*	1799,04	24,99	2,035138065	0,040469968
	mor	*w; mor[1]/+*	20,65	26,32	1,134292154	0,374862271
	osa	*osa[308]/rec10*	1007,31	21,97	1,13950745	0,383623209
	osa	*osa[308]/+*	94,48	21,79	4,032866503	0,000826743
	brm	*w; brm[2]/rec10*	2167,51	28,97	2,451966499	0,010320773
	brm	*w; brm[2]/+*	191,24	28,62	8,163175755	1,69503E-07
4	T positif	**w[NV]/+; +/rec10**	**790,9**	28,89		
	T positif	**yw/+; +/rec10**	**447,8**	28,72		
	T negatif	**w[NV]/+**	**21,83**	26,58		
	T negatif	**yw/yw**	**29,21**	24,82		
	T negatif	**w; +/da::gal4**	**13,74**	20,94		
	T negatif	**yw; +/da::gal4**	**40,63**	26,09		
	brm	*w; brm[2]/+;+/ rec10*	2221,2	28,97	241,9607843	5,74205E-26
	brm	*w; brm[2]/+*	28,25	26,24	0,324955752	0,991774554
	brm	*w; brm[d00415]/+;+/ rec10*	1063,14	28,92	115,8104575	1,49418E-21
	brm	*w; brm[d00415]/+*	26,17	23,72	0,35078334	0,986572236
	brm	*y/+; brm[RNAi]/+;+/ rec10*	1605,69	27,96	3,585730237	0,000684005
	brm	*y/+; brm[RNAi]/+;+/ da::Gal4*	17,48	24,04	25,61784897	4,65085E-12
	bap55	*yw; Bap55[EY15967]/+;+/ rec10*	383,44	28,7	0,020629042	0,999999999
	bap55	*yw; Bap55[EY15967]/+*	26,78	24,66	0,295369679	0,989414154
	bap170	*yw; Bap170[G5986]/+;+/ rec10*	743,78	28,8	94,03034134	9,95282E-20
	bap170	*yw; Bap170[G5986]/+*	17,19	22,93	0,460151251	0,931430623
	mor	*w; mor[1]/rec10*	516,58	9,89	1,531031012	0,257379894
	mor	*w; mor[1]/+*	37,37	17,19	21,16403532	1,41176E-08
	mor	*yw; mor[EY00296]/+;+/ rec10*	819,91	28,82	1,830973649	0,057707087
	mor	*yw; mor[EY00296]/+*	7,91	14,79	56,61188369	2,76525E-10
	osa	*yw; osa[EY09619]/+;+/ rec10*	847,32	28,94	1,071336452	0,428312282
	osa	*yw; osa[EY09619]/+*	16,9	22,99	26,49704142	1,99315E-11
	polybromo	*yw; Polybromo[EY14080]/+;+/ rec10*	1340,88	28,93	4,724399494	0,001616487
	polybromo	*yw; Polybromo[EY14080]/+*	9,18	18,72	0,015312246	0,999999999

4.

4. Discussion et perspectives

Nos résultats mettent en évidence que l'interaction génétique entre *CycG* et 10 gènes codant des facteurs d'épissage (*SmD2, SmD3, LSM12, SAF-B*, *qKr58E, RBM39, CG3689, CG11505, Coilin* et *SC35*) serait importante pour la stabilité du développement. De plus, les interactions entre *CycG* et *MAP205* ou *brm* seraient importantes pour la stabilité du développement. Il est essentiel de répéter ces analyses pour les gènes codant des facteurs d'épissage. Notre étude pourrait être approfondie en utilisant les 15 « landmarks » pour l'analyse de l'AF de taille centroïde.

Nos résultats et les données du consortium DPiM suggèrent que Cycline G pourrait jouer un rôle sur l'épissage des ARN pré-messagers. Il serait intéressant d'une part de confirmer par des expériences de co-immunoprécipitation, les interactions entre Cycline G et ses partenaires identifiés par DPiM. Pour cela, j'ai entrepris la construction de lignées permettant d'exprimer à la fois une forme étiquetée de Cycline G et de la protéine SmD3 ou Eif4IIIA. J'envisage maintenant de construire des lignées transgéniques nous permettant de vérifier les interactions entre Cycline G et MAP205 d'une part et entre Cycline G et les facteurs d'épissage qui semblent impliqués dans la stabilité du développement (SmD2, LSM12, SAF-B, qKr58E, RBM39, CG3689, CG11505, Coilin, SC35). Ces constructions pourraient nous permettre également, par des immunomarquages sur les chromosomes polytènes, d'étudier la co-localisation de ces protéines avec Cycline G.

D'autre part, comme je l'ai décrit dans l'introduction, l'épissage des ARN pré-messagers nécessite un enchaînement d'étapes faisant intervenir de nombreuses protéines, qui pour certaines se lient directement sur l'ARN. Afin d'approfondir le rôle que jouerait Cycline G dans l'épissage, il serait intéressant de savoir si Cycline G se fixe à l'ARN. Pour cela nous pourrions utiliser la méthode de REMSA « RNA electromobility shift assay » en utilisant une construction de Cycline G étiquetée GST.

Les protéines impliquées dans l'épissage des ARN pré-messagers sont très conservées (Mount et Salz, 2000). Les protéines SmD2 et SmD3 sont communes à 4 des snRNP (U1, U2, U4, U5) (Burge *et al,.* 1999, Mount et Salz, 2000). Nos résultats

montrent que *CycG* interagit avec les gènes *SmD2* et *SmD3*. Ces protéines ont une position centrale dans la machinerie de l'épissage (Matera et Wang, 2014). L'augmentation significative de l'AF due à la surexpression de *CycG* par les mutations de ces deux gènes ou leur surexpression pourrait refléter un déséquilibre global de la machinerie d'épissage. Cyclin G pourrait titrer SmD2 et SmD3, entraînant la formation d'un spliceosome instable à l'efficacité réduite modifiant l'épissage de certains transcrits.

Nos résultats montrent que *CycG* interagit génétiquement avec plusieurs gènes impliqués dans la régulation de l'épissage alternatif. Cycline G pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'épissage alternatif. Ces différents gènes codent pour des protéines possédant un domaine d'interaction à l'ARN et certains (*RBM39, SC35, Saf-B et qKr583E*) ont été identifiés comme régulateurs de l'épissage alternatif (Park, Parisky *et al,.* 2004 ; Olson, Blanchette *et al,.* 2007 ; Patel *et al,.* 2007). Comme je l'ai précisé précédemment, l'épissage alternatif permet de générer de multiples ARNm à partir d'un seul gène, augmentant ainsi la diversité du protéome (Grawveley, 2001). L'épissage alternatif joue également un rôle clef dans la régulation de l'expression génique dans de nombreux processus de développement. Chez la drosophile, par exemple, il est impliqué dans la détermination du sexe, de l'apoptose et du développement du système nerveux (Black, 2003). Cycline G pourrait en collaboration avec ses partenaires, influencer la régulation de l'épissage alternatif de certaines cibles, ce qui aurait des répercussions sur la stabilité du développement.

Des études réalisées en cellules humaines montrent un rôle possible du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF, avec la protéine SAM68, protéines de la famille « Signal Transduction and Activation of RNA » (STAR), dans la régulation de l'épissage alternatif (Batché *et al,.* 2006).

Nous avons montré que l'interaction entre *CycG* et le gène *brm* est importante pour la stabilité de développement. En outre, Cycline G interagit avec *qKr58E3* (*Kep1*), qui code une protéine d'interaction à l'ARN possédant un domaine KH. La protéine Kep1 appartient à la famille des protéines « STAR ». Cette famille de protéines, très conservée, est impliquée dans une grande variété de processus développementaux et dans la régulation de l'épissage alternatif.

Kep1 serait impliquée dans la régulation de l'apoptose en influençant l'épissage alternatif du transcrit *dredd* (Di Fruscio *et al,.* 2003). Au cours du développement, le niveau de transcription de *dredd* est étroitement lié au programme de mort cellulaire contrôlé par les gènes *reaper, grim* et *hid* (Chen *et al,.1998).* La plupart des protéines impliquées dans la régulation de l'épissage sont des phosphoprotéines. Leur niveau de phosphorylation module les interactions qu'elles ont avec d'autres protéines ou avec l'ARN (Matter *et al,.* 2002). Cycline G interagit génétiquement et physiquement avec Kep1, il serait donc intéressant d'étudier les phosphorylations de Kep1 et de voir si Cycline G influence ou non cette phosphorylation. La phosphorylation de Kep1 pourrait influencer le choix de sites d'épissage alternatif en favorisant des interactions entre des facteurs d'épissage comme SC35, Saf-B ou d BRM.

Pour approfondir l'analyse du rôle de Cycline G dans le contrôle de l'épissage, nous avons entrepris une analyse globale par ChIP-seq de ses sites de fixation dans le disque imaginal d'aile. La corrélation de ces résultats avec nos données de RNA-seq nous permettra d'identifier les cibles transcriptionnelles directes de Cycline G. Nous pourrons alors étudier l'épissage de ces gènes. L'AF induite par *CycG* pourrait être le résultat d'une augmentation du bruit d'épissage (Arbel-Gorenet al., 2014 ; Melamud et Moult, 2009).

DISCUSSION

Les résultats obtenus au cours de ma thèse ont mis en évidence que *CycG* interagit génétiquement avec l'ETP *ASX* et des gènes *PcG* et *trxG* impliqués dans le maintien de l'expression des gènes *Hox*. Ces interactions génétiques montrent que *CycG* se comporte comme un « Enhancer » des gènes *Polycomb*. Par ailleurs, nous avons montré que Cyline G interagit physiquement avec ASX. Ainsi, Cycline G pourrait jouer un rôle dans le maintien de l'information épigénétique, essentiel à la transmission des profils d'expression des gènes lors des divisions cellulaires.

Nous avons également mis en évidence l'importance du domaine d'interaction avec les ETP de Cycline G dans la stabilité du développement. Nos résultats indiquent qu'une interaction fonctionnelle entre les complexes Polycomb PR-DUB ou PRC1 et Cycline G pourrait contrôler l'expression de gènes importants pour la stabilité du développement. De plus, nous avons mis en évidence l'interaction génétique entre *CycG* et 10 gènes codant des facteurs d'épissage. La participation éventuelle de Cycline G à la régulation de l'épissage serait également importante pour la stabilité du développement. L'étude du transcriptome des disques imaginaux d'ailes de larves de drosophile en contexte de surexpression de *CycG* montre une dérégulation de nombreux gènes impliqués dans la croissance et le métabolisme. Ces données nous ont amené à poser l'hypothèse selon laquelle l'AF induite par la surexpression de *CycG* pourrait être le résultat d'une augmentation du bruit transcriptionnel de ces gènes.

1. Cycline G et le maintien de la mémoire épigénétique

Nos résultats montrent que Cycline G participe au maintien de l'expression des gènes au cours du développement, en collaboration avec les gènes *PcG* et *trxG*. En effet, nous avons montré l'existence d'interactions génétiques entre *CycG* et plusieurs gènes *PcG* (*crm, mxc, Pc* et *ph)* et *trxG (ash1, trx et brm)*. Ces interactions sont associées à une modification de l'expression ectopique des protéines HOX induite par des mutations *PcG*. Ainsi, Cycline G faciliterait le maintien de la répression des gènes *Scr* et *Ubx* par les complexes PcG (Dupont *et al.,* 2015).

Par ailleurs, sur les chromosomes polytènes, Cycline G se lie préférentiellement sur les inter-bandes de DAPI qui correspondent à de la chromatine ouverte. Elle co-

localise largement avec l'ARN Polymérase II phosphorylée sur la sérine 2, et co-localise très peu avec la marque répressive H3K27me3. Cycline G est donc présente sur des gènes activement transcrits. En outre, la dérégulation de *CycG* n'induit pas de transformations homéotiques, mais module celle liée aux mutations *PcG* ou *trxG*. Nos données suggèrent que Cycline G se comporterait comme un activateur des *PcG*. Son rôle pourrait être de modérer l'expression de gènes actifs (Dupont *et al.,* 2015). Notre analyse du transcriptome de disques imaginaux d'ailes de larves de drosophile surexprimant *CycG* a permis d'identifier les gènes dérégulés dans le contexte où l'AF est fortement augmentée. De façon intéressante, l'ontologie de ces cibles montre un enrichissement des termes *composants des ribosomes*, *catabolisme*, *processus d'oxydoreduction*, *mécanisme de phosphorylation*. Cela suggère que Cycline G pourrait réguler l'expression de gènes impliqués dans la production d'énergie, le contrôle de la croissance et le métabolisme cellulaire.

Nous avons entrepris une analyse globale par ChIP-seq des sites de fixation de Cycline G sur la chromatine dans les disques imaginaux d'aile afin d'identifier ses cibles transcriptionnelles directes par corrélation avec nos données de RNA-seq.

Nos travaux mettent également en évidence un lien direct entre Cycline G et l'ETP ASX (Dupont *et al.,* 2015). Nous avons montré que Cycline G et ASX co-localisent en de nombreux sites sur la chromatine et que *CycG* et *Asx* interagissent génétiquement. Des données antérieures indiquent également un lien direct entre Cycline G et l'ETP Corto. La comparaison des profils de fixation de Cycline G et des ETP, ASX et Corto, à l'échelle du génome (ChIP-seq), nous permettra d'identifier leurs cibles communes. Nous comparerons également les sites de fixation de Cycline G au profil des différentes marques épigénétiques représentatives de l'activation (ARN pol II S2p, H3K36me3), de la répression (H3K27me3,) ou de la pause transcriptionnelle (ARN polII S5p).

2. Cycline G modulateur de l'activité des ETP et des facteurs d'épissage ?

Cycline G interagit avec les ETP Corto et ASX (Salvaing *et al.,* 2008 ; Dupont *et al.,* 2015). De façon intéressante, ces protéines présentent des motifs pouvant être phosphorylés (Fisher el al., 2006 ; Mouchel-Vielh et al., 2011 ; Salvaing et al., 2008). Or, toutes les cyclines connues fonctionnent en interactions avec des CDK qui sont des protéines kinases. Cela laisse penser que Cycline G pourrait être impliquée dans la phosphorylation de certaines protéines.

La plupart des protéines impliquées dans la régulation de l'épissage sont également phosphorylées. Leur niveau de phosphorylation module les interactions qu'elles ont avec d'autres protéines ou avec l'ARN ce qui influence leur rôle dans l'épissage (Matter *et al,.* 2002).

Ces données suggèrent qu'un complexe Cycline G/CDK phosphorylerait les ETP ASX et Corto, ou les facteurs d'épissage importants pour la stabilité du développement. Il serait par conséquent intéressant d'identifier la ou les protéines kinases qui interagissent avec Cycline G. Cycline G interagit avec les CDK2 et CDK4 (Faradji *et al.,* 2011). Il serait interressant, dans un premier temps, de tester si les complexes Cycline G/CKD2 et Cycline G/CDK4 sont impliqués dans la phosphorylation des ETP Corto et ASX. Par ailleurs, une analyse protéomique à haut débit des interacteurs de Cycline G par spectrométrie de masse nous permettrait d'indentifier les partenaires de Cycline G. Nous rechercherons parmi ceux-ci de potentielles CDK. En outre nous pourrions également déterminer quelles protéines sont phosphorylées par le complexe Cycline G/CDK : une analyse en gel bidimensionnel nous permettrait de comparer les profils de phosphorylation des protéines totales en contexte sauvage, de surexpression ou d'inactivation de Cycline G. Si l'on observe un effet de la dérégulation de *CycG* sur ce profil, une analyse par spectrométrie de masse permettra d'identifier des protéines candidates dont la phosphorylation dépend de Cycline G.

3. Cycline G et la stabilité du développement

Cycline G est un régulateur transcriptionnel. Cycline G possède trois domaines remarquables : un domaine PEST C-terminal, un domaine d'interaction avec les ETP (Corto et ASX) N-terminal et un domaine cycline central. Chez la drosophile, la surexpression ubiquitaire de *CycG*$^{\Delta Pest}$ induit une augmentation très forte de l'AF de taille et de forme des ailes. Cycline G jouerait donc un rôle dans la stabilité du développement (Debat *et al.,* 2011 ; Debat et Peronnet, 2013). Les données obtenues au cours de ma thèse montrent que la surexpression de *CycG* délétée de son domaine d'interaction avec les ETP et/ou de son domaine PEST induit une AF significativement plus élevée que la surexpression de la forme entière de Cycline G. Ceci suggère que l'AF élevée induite par *CycG* pourrait être liée à une dérégulation des cibles transcriptionnelles de Cycline G. Nous avons également montré que des mutations pour des gènes codant des sous-unités du complexe PRC1 (P*c, Ph, Sce* et *Scm*) et du complexe PR-DUB (*Asx* et *caly*) induisent une forte augmentation de l'AF due à *CycG*. Le complexe PR-DUB est formée de l'histone déubiquitinase Calypso, qui enlève le résidu ubiquitine de l'histone H2AK118, et de la protéine ASX. De façon intéressante, ce complexe a un effet antagoniste à celui du complexe PRC1 qui contient l'ubiquitinase SCE/dRing qui ajoute un résidu ubiquitine sur la lysine 118 de l'histone H2A (Scheuermann *et al.,* 2010 ; Scheuttengruber *et al.,* 2010). Cycline G interagit physiquement avec ASX (Dupont *et al.,* 2015). Scheuermann et ses collaborateurs ont montré, *in vitro,* que l'absence de la sous-unité ASX empêche la déubiquitination de H2AK118 (Scheuermann *et al.,* 2010). Ces résultats suggèrent que la présence d'ASX est donc essentielle pour l'activité enzymatique du complexe PR-DUB. Ainsi, Cycline G pourrait contrôler l'expression de gènes impliqués dans la stabilité du développement en influençant l'équilibre H2AK118/H2AK118ub.

De plus, nos résultats montrent que Cycline G co-localise en de nombreux sites avec la marque H2AK118ub sur les chromosomes polytènes. Il serait intéressant d'analyser le profil H2AK118ub par ChIP-seq pour le comparer à celui de Cycline G. L'analyse pourrait être complétée par la comparaison de nos données de Chip-seq concernant Cycline G et celle des protéines Calypso, SCE/dRing. Il serait également intéressant de savoir si Cycline G interagit physiquement avec Calypso et/ou SCE/dRing.

Par ailleurs, une grande majorité de partenaires de Cycline G est impliquée dans l'épissage des ARN pré-messagers, ce qui suggère que Cycline G pourrait jouer un rôle dans ce mécanisme. Nous avons montré que la mutation et/ou la surexpression de gènes codant des facteurs d'épissage modifient l'AF induite par *CycG.* Nos résultats montrent que l'interaction génétique entre *CycG* et ces gènes codant des facteurs d'épissage pourrait être importante pour la stabilité du développement. Il est important de confirmer les interactions physiques entre Cycline G et ces facteurs d'épissage par co-immunoprécipitation. Pour cela, j'ai construit des lignées transgéniques permettant la co-expression de formes étiquetées de Cycline G et de chacun de ces facteurs d'épissage.

Les résultats obtenus au cours de ma thèse nous permettent de poser l'hypothèse selon laquelle l'AF induite par Cycline G pourrait être le résultat d'une augmentation du bruit transcriptionnel. L'origine de ce bruit pourrait se situer au niveau du taux de transcription ou au niveau de l'épissage alternatif d'ARNm des cibles de Cycline G. Pour tester cette hypothèse, nous pourrons, à partir de gènes cibles de Cycline G impliqués dans la stabilité du développement, étudier les variations de leur niveau de transcription en cellule unique en comparant différents contextes (sauvage, surexpression et inactivation de *CycG)*. L'analyse de la variance du taux de transcription nous donnera une estimation du bruit de transcription. L'analyse du bruit d'épissage pourrait être réalisée de la même manière.

Pour tester le bruit au niveau des promoteurs, nous pourrions construire des transgènes permettant d'exprimer des molécules fluorescentes (EGFP pour l'un, Cherry pour l'autre) sous leur contrôle. Les transgènes seraient introduits au même site dans le génome grâce à l'integrase phiC31. En croisant les lignées EGFP et Cherry, nous pourrions suivre dans la descendance hétérozygote l'expression des marqueurs fluorescents dans chaque cellule. L'exsistence de bruit transcriptionnel serait mise en évidence par l'expression des différentes fluorescences (vert, rouge, jaune). Nous pourrions également tester l'épissage alternatif en introduisant par la technique CRISR/Cas9 un intron EGFP et un intron Cherry dans le corps du gène. Le niveau d'expression des différentes fluorescences dans les cellules refléterait le bruit d'épissage.

BIBLIOGRAPHIE

Adamczewski, J.P., Rossignol, M., Tassan, J.P., Nigg, E.A., Moncollin, V., and Egly, J.M. (1996). MAT1, cdk7 and cyclin H form a kinase complex which is UV light-sensitive upon association with TFIIH. EMBO J. *15*, 1877–1884.

Adelman, K., and Lis, J.T. (2012). Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: emerging roles in metazoans. Nat. Rev. Genet. *13*, 720–731.

Akam, M. (1987). The molecular basis for metameric pattern in the Drosophila embryo. Development *101*, 1–22.

Alló, M., Buggiano, V., Fededa, J.P., Petrillo, E., Schor, I., de la Mata, M., Agirre, E., Plass, M., Eyras, E., Elela, S.A., et al. (2009). Control of alternative splicing through siRNA-mediated transcriptional gene silencing. Nat. Struct. Mol. Biol. *16*, 717–724.

De Almeida, S.F., and Carmo-Fonseca, M. (2014). Reciprocal regulatory links between cotranscriptional splicing and chromatin. Semin. Cell Dev. Biol. *32*, 2–10.

Anderson, A.E., Karandikar, U.C., Pepple, K.L., Chen, Z., Bergmann, A., and Mardon, G. (2011a). The enhancer of trithorax and polycomb gene Caf1/p55 is essential for cell survival and patterning in Drosophila development. Development *138*, 1957–1966.

Andersson, R., Enroth, S., Rada-Iglesias, A., Wadelius, C., and Komorowski, J. (2009). Nucleosomes are well positioned in exons and carry characteristic histone modifications. Genome Res. *19*, 1732–1741.

Änkö, M.-L. (2014). Regulation of gene expression programmes by serine–arginine rich splicing factors. Seminars in Cell & Developmental Biology *32*, 11–21.

Ansari, A.Z., Koh, S.S., Zaman, Z., Bongards, C., Lehming, N., Young, R.A., and Ptashne, M. (2002). Transcriptional activating regions target a cyclin-dependent kinase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *99*, 14706–14709.

Arachchige Don, A.S., Dallapiazza, R.F., Bennin, D.A., Brake, T., Cowan, C.E., and Horne, M.C. (2006). Cyclin G2 is a centrosome-associated nucleocytoplasmic shuttling protein that influences microtubule stability and induces a p53-dependent cell cycle arrest. Exp. Cell Res. *312*, 4181–4204.

Arbel-Goren, R., Tal, A., and Stavans, J. (2014). Phenotypic noise: effects of post-transcriptional regulatory processes affecting mRNA. Wiley Interdiscip Rev RNA *5*, 197–207.

Armstrong, J.A., Papoulas, O., Daubresse, G., Sperling, A.S., Lis, J.T., Scott, M.P., and Tamkun, J.W. (2002). The Drosophila BRM complex facilitates global transcription by RNA polymerase II. EMBO J. *21*, 5245–5254.

Badenhorst, P., Voas, M., Rebay, I., and Wu, C. (2002). Biological functions of the ISWI chromatin remodeling complex NURF. Genes Dev. *16*, 3186–3198.

Banaszynski, L.A., Allis, C.D., and Lewis, P.W. (2010). Histone variants in metazoan development. Dev. Cell *19*, 662–674.

Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C., and Kouzarides, T. (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. Nature *410*, 120–124.

Bartkowiak, B., Liu, P., Phatnani, H.P., Fuda, N.J., Cooper, J.J., Price, D.H., Adelman, K., Lis, J.T., and Greenleaf, A.L. (2010). CDK12 is a transcription elongation-associated CTD kinase, the metazoan ortholog of yeast Ctk1. Genes Dev. *24*, 2303–2316.

Baskind, H.A., Na, L., Ma, Q., Patel, M.P., Geenen, D.L., and Wang, Q.T. (2009). Functional Conservation of Asxl2, a Murine Homolog for the Drosophila Enhancer of Trithorax and Polycomb Group Gene Asx. PLoS ONE *4*, e4750.

Batsché, E., Yaniv, M., and Muchardt, C. (2006). The human SWI/SNF subunit Brm is a regulator of alternative splicing. Nat. Struct. Mol. Biol. *13*, 22–29.

Batterham, P., Davies, A.G., Game, A.Y., and McKenzie, J.A. (1996). Asymmetry--where evolutionary and developmental genetics meet. Bioessays *18*, 841–845.

Beck, S., Faradji, F., Brock, H., and Peronnet, F. (2010). Maintenance of Hox gene expression patterns. Adv. Exp. Med. Biol. *689*, 41–62.

Beckmann, J.S., and Trifonov, E.N. (1991). Splice junctions follow a 205-base ladder. PNAS *88*, 2380–2383.

Beisel, C., Imhof, A., Greene, J., Kremmer, E., and Sauer, F. (2002). Histone methylation by the Drosophila epigenetic transcriptional regulator Ash1. Nature *419*, 857–862.

Bennin, D.A., Don, A.S.A., Brake, T., McKenzie, J.L., Rosenbaum, H., Ortiz, L., DePaoli-Roach, A.A., and Horne, M.C. (2002). Cyclin G2 associates with protein phosphatase 2A catalytic and regulatory B' subunits in active complexes and induces nuclear aberrations and a G1/S phase cell cycle arrest. J. Biol. Chem. *277*, 27449–27467.

Bergman, A., and Siegal, M.L. (2003). Evolutionary capacitance as a general feature of complex gene networks. Nature *424*, 549–552.

Berke, J.D., Sgambato, V., Zhu, P.P., Lavoie, B., Vincent, M., Krause, M., and Hyman, S.E. (2001). Dopamine and glutamate induce distinct striatal splice forms of Ania-6, an RNA polymerase II-associated cyclin. Neuron *32*, 277–287.

Bernstein, E., and Allis, C.D. (2005). RNA meets chromatin. Genes Dev. *19*, 1635–1655.

Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., et al. (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. Cell *125*, 315–326.

Bierne, H., Hamon, M., and Cossart, P. (2012). Epigenetics and bacterial infections. Cold Spring Harb Perspect Med *2*, a010272.

Black, D.L. (2003). Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. Annu. Rev. Biochem. *72*, 291–336.

Blazek, D., Kohoutek, J., Bartholomeeusen, K., Johansen, E., Hulinkova, P., Luo, Z., Cimermancic, P., Ule, J., and Peterlin, B.M. (2011). The Cyclin K/Cdk12 complex maintains genomic stability via regulation of expression of DNA damage response genes. Genes Dev. *25*, 2158–2172.

Bondos, S.E., Tan, X.-X., and Matthews, K.S. (2006). Physical and genetic interactions link hox function with diverse transcription factors and cell signaling proteins. Mol. Cell Proteomics *5*, 824–834.

Boucher, L., Ouzounis, C.A., Enright, A.J., and Blencowe, B.J. (2001). A genome-wide survey of RS domain proteins. RNA *7*, 1693–1701.

Braunschweig, U., Gueroussov, S., Plocik, A.M., Graveley, B.R., and Blencowe, B.J. (2013). Dynamic Integration of Splicing within Gene Regulatory Pathways. Cell *152*, 1252–1269.

Bregman, D.B., Pestell, R.G., and Kidd, V.J. (2000). Cell cycle regulation and RNA polymerase II. Front. Biosci. *5*, D244–D257.

Brès, V., Yoh, S.M., and Jones, K.A. (2008). The multi-tasking P-TEFb complex. Curr. Opin. Cell Biol. *20*, 334–340.

Breuker, C.J., Patterson, J.S., and Klingenberg, C.P. (2006). A single basis for developmental buffering of Drosophila wing shape. PLoS ONE *1*, e7.

Brock, H.W., and Fisher, C.L. (2005). Maintenance of gene expression patterns. Dev. Dyn. *232*, 633–655.

Brock, H.W., and van Lohuizen, M. (2001). The Polycomb group--no longer an exclusive club? Curr. Opin. Genet. Dev. *11*, 175–181.

Brow, D.A. (2002). Allosteric Cascade of Spliceosome Activation. Annual Review of Genetics *36*, 333–360.

Burge, C.B., Tuschl, T., and Sharp, P.A. (1999). 20 Splicing of Precursors to mRNAs by the Spliceosomes. Cold Spring Harbor Monograph Archive *37*, 525–560.

Burgio, G., Baylac, M., Heyer, E., and Montagutelli, X. (2009). Genetic analysis of skull shape variation and morphological integration in the mouse using interspecific recombinant congenic strains between C57BL/6 and mice of the mus spretus species. Evolution *63*, 2668–2686.

Butler, M.J., Jacobsen, T.L., Cain, D.M., Jarman, M.G., Hubank, M., Whittle, J.R.S., Phillips, R., and Simcox, A. (2003). Discovery of genes with highly restricted expression patterns in the Drosophila wing disc using DNA oligonucleotide microarrays. Development *130*, 659–670.

Cáceres, J.F., and Kornblihtt, A.R. (2002). Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. Trends Genet. *18*, 186–193.

Campos, E.I., and Reinberg, D. (2009). Histones: annotating chromatin. Annu. Rev. Genet. *43*, 559–599.

Cao, L., Chen, F., Yang, X., Xu, W., Xie, J., and Yu, L. (2014). Phylogenetic analysis of CDK and cyclin proteins in premetazoan lineages. BMC Evol. Biol. *14*, 10.

Carlsten, J.O.P., Zhu, X., and Gustafsson, C.M. (2013). The multitalented Mediator complex. Trends Biochem. Sci. *38*, 531–537.

Carreira, V.P., Mensch, J., and Fanara, J.J. (2009). Body size in Drosophila: genetic architecture, allometries and sexual dimorphism. Heredity (Edinb) *102*, 246–256.

Carstens, R.P., Wagner, E.J., and Garcia-Blanco, M.A. (2000). An intronic splicing silencer causes skipping of the IIIb exon of fibroblast growth factor receptor 2 through involvement of polypyrimidine tract binding protein. Mol. Cell. Biol. *20*, 7388–7400.

Cartegni, L., Chew, S.L., and Krainer, A.R. (2002). Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. Nat Rev Genet *3*, 285–298.

Cavalli, G. (2014). A RING to rule them all: RING1 as silencer and activator. Dev. Cell *28*, 1–2.

Cavalli, G., and Paro, R. (1998). The Drosophila Fab-7 Chromosomal Element Conveys Epigenetic Inheritance during Mitosis and Meiosis. Cell *93*, 505–518.

Chalkley, G.E., Moshkin, Y.M., Langenberg, K., Bezstarosti, K., Blastyak, A., Gyurkovics, H., Demmers, J.A.A., and Verrijzer, C.P. (2008). The transcriptional coactivator SAYP is a trithorax group signature subunit of the PBAP chromatin remodeling complex. Mol. Cell. Biol. *28*, 2920–2929.

Champ, P.C., Maurice, S., Vargason, J.M., Camp, T., and Ho, P.S. (2004). Distributions of Z-DNA and nuclear factor I in human chromosome 22: a model for coupled transcriptional regulation. Nucleic Acids Res. *32*, 6501–6510.

Chatr-aryamontri, A., Breitkreutz, B.-J., Heinicke, S., Boucher, L., Winter, A., Stark, C., Nixon, J., Ramage, L., Kolas, N., O'Donnell, L., et al. (2013). The BioGRID interaction database: 2013 update. Nucl. Acids Res. *41*, D816–D823.

Chen, H.-C., and Cheng, S.-C. (2012). Functional roles of protein splicing factors. Biosci. Rep. *32*, 345–359.

Chen, W., and Moore, M.J. (2015). Spliceosomes. Current Biology *25*, R181–R183.

Chen, H.-H., Wang, Y.-C., and Fann, M.-J. (2006). Identification and characterization of the CDK12/cyclin L1 complex involved in alternative splicing regulation. Mol. Cell. Biol. *26*, 2736–2745.

Chen, H.-H., Wong, Y.-H., Geneviere, A.-M., and Fann, M.-J. (2007). CDK13/CDC2L5 interacts with L-type cyclins and regulates alternative splicing. Biochem. Biophys. Res. Commun. *354*, 735–740.

Chen, P., Rodriguez, A., Erskine, R., Thach, T., and Abrams, J.M. (1998). Dredd, a novel effector of the apoptosis activators reaper, grim, and hid in Drosophila. Dev. Biol. *201*, 202–216.

Cherbas, L., Willingham, A., Zhang, D., Yang, L., Zou, Y., Eads, B.D., Carlson, J.W., Landolin, J.M., Kapranov, P., Dumais, J., et al. (2011). The transcriptional diversity of 25 Drosophila cell lines. Genome Res. *21*, 301–314.

Cheutin, T., and Cavalli, G. (2014). Polycomb silencing: from linear chromatin domains to 3D chromosome folding. Curr. Opin. Genet. Dev. *25*, 30–37.

Cho, S., Schroeder, S., Kaehlcke, K., Kwon, H.-S., Pedal, A., Herker, E., Schnoelzer, M., and Ott, M. (2009). Acetylation of cyclin T1 regulates the equilibrium between active and inactive P-TEFb in cells. EMBO J. *28*, 1407–1417.

Clague, M.J., Heride, C., and Urbé, S. (2015). The demographics of the ubiquitin system. Trends Cell Biol.

Clapier, C.R., and Cairns, B.R. (2009). The biology of chromatin remodeling complexes. Annu. Rev. Biochem. *78*, 273–304.

Claudius, A.-K., Romani, P., Lamkemeyer, T., Jindra, M., and Uhlirova, M. (2014). Unexpected role of the steroid-deficiency protein ecdysoneless in pre-mRNA splicing. PLoS Genet. *10*, e1004287.

Coléno-Costes, A., Jang, S.M., de Vanssay, A., Rougeot, J., Bouceba, T., Randsholt, N.B., Gibert, J.-M., Le Crom, S., Mouchel-Vielh, E., Bloyer, S., et al. (2012). New partners in regulation of gene expression: the enhancer of Trithorax and Polycomb Corto interacts with methylated ribosomal protein l12 via its chromodomain. PLoS Genet. *8*, e1003006.

Collins, R.T., Furukawa, T., Tanese, N., and Treisman, J.E. (1999). Osa associates with the Brahma chromatin remodeling complex and promotes the activation of some target genes. EMBO J. *18*, 7029–7040.

Colombani, J., Andersen, D.S., and Léopold, P. (2012). Secreted peptide Dilp8 coordinates Drosophila tissue growth with developmental timing. Science *336*, 582–585.

Coqueret, O. (2002). Linking cyclins to transcriptional control. Gene *299*, 35–55.

Corona, D.F.V., and Tamkun, J.W. (2004). Multiple roles for ISWI in transcription, chromosome organization and DNA replication. Biochim. Biophys. Acta *1677*, 113–119.

De la Cova, C., Abril, M., Bellosta, P., Gallant, P., and Johnston, L.A. (2004). Drosophila myc regulates organ size by inducing cell competition. Cell *117*, 107–116.

Cugusi, S., Kallappagoudar, S., Ling, H., and Lucchesi, J.C. (2015). The Drosophila Helicase Maleless (MLE) is Implicated in Functions Distinct From its Role in Dosage Compensation. Mol. Cell Proteomics *14*, 1478–1488.

Curtis, B.J., Zraly, C.B., Marenda, D.R., and Dingwall, A.K. (2011). Histone lysine demethylases function as co-repressors of SWI/SNF remodeling activities during Drosophila wing development. Developmental Biology *350*, 534–547.

Darnell, R.B. (2013). RNA Protein Interaction in Neurons. Annu Rev Neurosci *36*, 243–270.

Das, R., Yu, J., Zhang, Z., Gygi, M.P., Krainer, A.R., Gygi, S.P., and Reed, R. (2007). SR Proteins Function in Coupling RNAP II Transcription to Pre-mRNA Splicing. Molecular Cell *26*, 867–881.

Debat, V., and Peronnet, F. (2013). Asymmetric flies: the control of developmental noise in Drosophila. Fly (Austin) *7*, 70–77.

Debat, V., Alibert, P., David, P., Paradis, E., and Auffray, J.C. (2000). Independence between developmental stability and canalization in the skull of the house mouse. Proc. Biol. Sci. *267*, 423–430.

Debat, V., Milton, C.C., Rutherford, S., Klingenberg, C.P., and Hoffmann, A.A. (2006). Hsp90 and the quantitative variation of wing shape in Drosophila melanogaster. Evolution *60*, 2529–2538.

Debat, V., Bloyer, S., Faradji, F., Gidaszewski, N., Navarro, N., Orozco-Terwengel, P., Ribeiro, V., Schlötterer, C., Deutsch, J.S., and Peronnet, F. (2011). Developmental stability: a major role for cyclin G in drosophila melanogaster. PLoS Genet. *7*, e1002314.

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

Dellino, G.I., Schwartz, Y.B., Farkas, G., McCabe, D., Elgin, S.C.R., and Pirrotta, V. (2004). Polycomb silencing blocks transcription initiation. Mol. Cell *13*, 887–893.

Denslow, S.A., and Wade, P.A. (2007). The human Mi-2/NuRD complex and gene regulation. Oncogene *26*, 5433–5438.

Dhami, P., Saffrey, P., Bruce, A.W., Dillon, S.C., Chiang, K., Bonhoure, N., Koch, C.M., Bye, J., James, K., Foad, N.S., et al. (2010). Complex exon-intron marking by histone modifications is not determined solely by nucleosome distribution. PLoS ONE *5*, e12339.

Dickinson, L.A., Edgar, A.J., Ehley, J., and Gottesfeld, J.M. (2002). Cyclin L is an RS domain protein involved in pre-mRNA splicing. J. Biol. Chem. *277*, 25465–25473.

Dower, K., Kuperwasser, N., Merrikh, H., and Rosbash, M. (2004). A synthetic A tail rescues yeast nuclear accumulation of a ribozyme-terminated transcript. RNA *10*, 1888–1899.

Dupont, C.A., Dardalhon-Cuménal, D., Kyba, M., Brock, H.W., Randsholt, N.B., and Peronnet, F. (2015). Drosophila Cyclin G and epigenetic maintenance of gene expression during development. Epigenetics Chromatin *8*, 18.

Edwards, M.C., Wong, C., and Elledge, S.J. (1998). Human cyclin K, a novel RNA polymerase II-associated cyclin possessing both carboxy-terminal domain kinase and Cdk-activating kinase activity. Mol. Cell. Biol. *18*, 4291–4300.

Egloff, S., Dienstbier, M., and Murphy, S. (2012). Updating the RNA polymerase CTD code: adding gene-specific layers. Trends Genet. *28*, 333–341.

Egly, J.-M., and Coin, F. (2011). A history of TFIIH: two decades of molecular biology on a pivotal transcription/repair factor. DNA Repair (Amst.) *10*, 714–721.

Endoh, M., Endo, T.A., Endoh, T., Isono, K., Sharif, J., Ohara, O., Toyoda, T., Ito, T., Eskeland, R., Bickmore, W.A., et al. (2012). Histone H2A mono-ubiquitination is a crucial step to mediate PRC1-dependent repression of developmental genes to maintain ES cell identity. PLoS Genet. *8*, e1002774.

Errico, A., Deshmukh, K., Tanaka, Y., Pozniakovsky, A., and Hunt, T. (2010). Identification of substrates for cyclin dependent kinases. Adv. Enzyme Regul. *50*, 375–399.

Bar-Even, A., Paulsson, J., Maheshri, N., Carmi, M., O'Shea, E., Pilpel, Y., and Barkai, N. (2006). Noise in protein expression scales with natural protein abundance. Nat. Genet. *38*, 636–643.

Faradji, F., Bloyer, S., Dardalhon-Cuménal, D., Randsholt, N.B., and Peronnet, F. (2011). Drosophila melanogaster Cyclin G coordinates cell growth and cell proliferation. Cell Cycle *10*, 805–818.

Fauvarque, M.O., Laurenti, P., Boivin, A., Bloyer, S., Griffin-Shea, R., Bourbon, H.M., and Dura, J.M. (2001). Dominant modifiers of the polyhomeotic extra-sex-combs phenotype induced by marked P element insertional mutagenesis in Drosophila. Genet. Res. *78*, 137–148.

Fenley, A.T., Adams, D.A., and Onufriev, A.V. (2010). Charge state of the globular histone core controls stability of the nucleosome. Biophys. J. *99*, 1577–1585.

Finch, J.T., and Klug, A. (1976). Solenoidal model for superstructure in chromatin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *73*, 1897–1901.

Fisher, R.P. (2005). Secrets of a double agent: CDK7 in cell-cycle control and transcription. J. Cell. Sci. *118*, 5171–5180.

Fisher, C.L., Randazzo, F., Humphries, R.K., and Brock, H.W. (2006). Characterization of Asxl1, a murine homolog of Additional sex combs, and analysis of the Asx-like gene family. Gene *369*, 109–118.

Fisher, C.L., Lee, I., Bloyer, S., Bozza, S., Chevalier, J., Dahl, A., Bodner, C., Helgason, C.D., Hess, J.L., Humphries, R.K., et al. (2010). Additional sex combs-like 1 belongs to the enhancer of trithorax and polycomb group and genetically interacts with Cbx2 in mice. Developmental Biology *337*, 9–15.

Di Fruscio, M., Chen, T., Bonyadi, S., Lasko, P., and Richard, S. (1998). The identification of two Drosophila K homology domain proteins. Kep1 and SAM are members of the Sam68 family of GSG domain proteins. J. Biol. Chem. *273*, 30122–30130.

Di Fruscio, M., Styhler, S., Wikholm, E., Boulanger, M.-C., Lasko, P., and Richard, S. (2003). Kep1 interacts genetically with dredd/caspase-8, and kep1 mutants alter the balance of dredd isoforms. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *100*, 1814–1819.

Fyodorov, D.V., Blower, M.D., Karpen, G.H., and Kadonaga, J.T. (2004). Acf1 confers unique activities to ACF/CHRAC and promotes the formation rather than disruption of chromatin in vivo. Genes Dev. *18*, 170–183.

Galbraith, M.D., Donner, A.J., and Espinosa, J.M. (2010). CDK8: a positive regulator of transcription. Transcription *1*, 4–12.

Garelli, A., Gontijo, A.M., Miguela, V., Caparros, E., and Dominguez, M. (2012). Imaginal discs secrete insulin-like peptide 8 to mediate plasticity of growth and maturation. Science *336*, 579–582.

Garriga, J., and Graña, X. (2004). Cellular control of gene expression by T-type cyclin/CDK9 complexes. Gene *337*, 15–23.

Garriga, J., Peng, J., Parreño, M., Price, D.H., Henderson, E.E., and Graña, X. (1998). Upregulation of cyclin T1/CDK9 complexes during T cell activation. Oncogene *17*, 3093–3102.

Gaspar-Maia, A., Alajem, A., Meshorer, E., and Ramalho-Santos, M. (2011). Open chromatin in pluripotency and reprogramming. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *12*, 36–47.

Gildea, J.J., Lopez, R., and 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.

Gilmour, D.S. (2009). Promoter proximal pausing on genes in metazoans. Chromosoma *118*, 1–10.

Goll, M.G., and Bestor, T.H. (2005). Eukaryotic cytosine methyltransferases. Annu. Rev. Biochem. *74*, 481–514.

Gopinathan, L., Ratnacaram, C.K., and Kaldis, P. (2011). Established and novel Cdk/cyclin complexes regulating the cell cycle and development. Results Probl Cell Differ *53*, 365–389.

Gowher, H., Leismann, O., and Jeltsch, A. (2000). DNA of Drosophila melanogaster contains 5-methylcytosine. EMBO J. *19*, 6918–6923.

Gräff, J., and Mansuy, I.M. (2008). Epigenetic codes in cognition and behaviour. Behav. Brain Res. *192*, 70–87.

Graveley, B.R. (2001). Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. Trends Genet. *17*, 100–107.

Green, M.R. (2005). Eukaryotic transcription activation: right on target. Mol. Cell *18*, 399–402.

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

Grossniklaus, U., and Paro, R. (2014). Transcriptional silencing by polycomb-group proteins. Cold Spring Harb Perspect Biol *6*, a019331.

Gunderson, F.Q., and Johnson, T.L. (2009). Acetylation by the transcriptional coactivator Gcn5 plays a novel role in co-transcriptional spliceosome assembly. PLoS Genet. *5*, e1000682.

Guruharsha, K.G., Rual, J.-F., Zhai, B., Mintseris, J., Vaidya, P., Vaidya, N., Beekman, C., Wong, C., Rhee, D.Y., Cenaj, O., et al. (2011). A protein complex network of Drosophila melanogaster. Cell *147*, 690–703.

Gutiérrez, L., Oktaba, K., Scheuermann, J.C., Gambetta, M.C., Ly-Hartig, N., and Müller, J. (2012). The role of the histone H2A ubiquitinase Sce in Polycomb repression. Development *139*, 117–127.

Ha, S.C., Lowenhaupt, K., Rich, A., Kim, Y.-G., and Kim, K.K. (2005). Crystal structure of a junction between B-DNA and Z-DNA reveals two extruded bases. Nature *437*, 1183–1186.

Hahn, S. (2004). Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. Nat. Struct. Mol. Biol. *11*, 394–403.

Hallberg, M., Polozkov, G.V., Hu, G.-Z., Beve, J., Gustafsson, C.M., Ronne, H., and Björklund, S. (2004). Site-specific Srb10-dependent phosphorylation of the yeast Mediator subunit Med2 regulates gene expression from the 2-microm plasmid. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *101*, 3370–3375.

Hampsey, M., and Reinberg, D. (2003). Tails of intrigue: phosphorylation of RNA polymerase II mediates histone methylation. Cell *113*, 429–432.

Hargreaves, D.C., and Crabtree, G.R. (2011). ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms. Cell Res. *21*, 396–420.

Hassan, A.H., Neely, K.E., Vignali, M., Reese, J.C., and Workman, J.L. (2001). Promoter targeting of chromatin-modifying complexes. Front. Biosci. *6*, D1054–D1064.

Hayashi-Takanaka, Y., Yamagata, K., Nozaki, N., and Kimura, H. (2009). Visualizing histone modifications in living cells: spatiotemporal dynamics of H3 phosphorylation during interphase. J. Cell Biol. *187*, 781–790.

Heidemann, M., Hintermair, C., Voß, K., and Eick, D. (2013). Dynamic phosphorylation patterns of RNA polymerase II CTD during transcription. Biochim. Biophys. Acta *1829*, 55–62.

Hengartner, C.J., Myer, V.E., Liao, S.M., Wilson, C.J., Koh, S.S., and Young, R.A. (1998). Temporal regulation of RNA polymerase II by Srb10 and Kin28 cyclin-dependent kinases. Mol. Cell *2*, 43–53.

Hilleren, P., McCarthy, T., Rosbash, M., Parker, R., and Jensen, T.H. (2001). Quality control of mRNA 3'-end processing is linked to the nuclear exosome. Nature *413*, 538–542.

Hodges, C., Bintu, L., Lubkowska, L., Kashlev, M., and Bustamante, C. (2009). Nucleosomal fluctuations govern the transcription dynamics of RNA polymerase II. Science *325*, 626–628.

Horard, B., Tatout, C., Poux, S., and 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.

Horne, M.C., Goolsby, G.L., Donaldson, K.L., Tran, D., Neubauer, M., and Wahl, A.F. (1996). Cyclin G1 and cyclin G2 comprise a new family of cyclins with contrasting tissue-specific and cell cycle-regulated expression. J. Biol. Chem. *271*, 6050–6061.

Horne, M.C., Donaldson, K.L., Goolsby, G.L., Tran, D., Mulheisen, M., Hell, J.W., and Wahl, A.F. (1997). Cyclin G2 is up-regulated during growth inhibition and B cell antigen receptor-mediated cell cycle arrest. J. Biol. Chem. *272*, 12650–12661.

Houchmandzadeh, B., Wieschaus, E., and Leibler, S. (2002). Establishment of developmental precision and proportions in the early Drosophila embryo. Nature *415*, 798–802.

Howe, K.J., Kane, C.M., and Ares, M. (2003). Perturbation of transcription elongation influences the fidelity of internal exon inclusion in Saccharomyces cerevisiae. RNA *9*, 993–1006.

Hsin, J.-P., and Manley, J.L. (2012). The RNA polymerase II CTD coordinates transcription and RNA processing. Genes Dev. *26*, 2119–2137.

Hu, D., Mayeda, A., Trembley, J.H., Lahti, J.M., and Kidd, V.J. (2003). CDK11 complexes promote pre-mRNA splicing. J. Biol. Chem. *278*, 8623–8629.

Huang, L., and Wilkinson, M.F. (2012). Regulation of nonsense-mediated mRNA decay. WIREs RNA *3*, 807–828.

Huelga, S.C., Vu, A.Q., Arnold, J.D., Liang, T.Y., Liu, P.P., Yan, B.Y., Donohue, J.P., Shiue, L., Hoon, S., Brenner, S., et al. (2012). Integrative Genome-wide Analysis Reveals Cooperative Regulation of Alternative Splicing by hnRNP Proteins. Cell Reports *1*, 167–178.

Hung, L.-H., Heiner, M., Hui, J., Schreiner, S., Benes, V., and Bindereif, A. (2008). Diverse roles of hnRNP L in mammalian mRNA processing: A combined microarray and RNAi analysis. RNA *14*, 284–296.

Hung, M.S., Karthikeyan, N., Huang, B., Koo, H.C., Kiger, J., and Shen, C.J. (1999). Drosophila proteins related to vertebrate DNA (5-cytosine) methyltransferases. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *96*, 11940–11945.

Ito, T. (2007). Role of histone modification in chromatin dynamics. J. Biochem. *141*, 609–614.

Jack, A.P.M., Bussemer, S., Hahn, M., Pünzeler, S., Snyder, M., Wells, M., Csankovszki, G., Solovei, I., Schotta, G., and Hake, S.B. (2013). H3K56me3 is a novel, conserved heterochromatic mark that largely but not completely overlaps with H3K9me3 in both regulation and localization. PLoS ONE *8*, e51765.

Jaehning, J.A. (2010). The Paf1 complex: platform or player in RNA polymerase II transcription? Biochim. Biophys. Acta *1799*, 379–388.

James, T.C., and Elgin, S.C. (1986). Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in Drosophila melanogaster and its gene. Mol. Cell. Biol. *6*, 3862–3872.

Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. Science *293*, 1074–1080.

Jeong, H., Mason, S.P., Barabási, A.L., and Oltvai, Z.N. (2001). Lethality and centrality in protein networks. Nature *411*, 41–42.

Johnson, J.M., Castle, J., Garrett-Engele, P., Kan, Z., Loerch, P.M., Armour, C.D., Santos, R., Schadt, E.E., Stoughton, R., and Shoemaker, D.D. (2003). Genome-Wide Survey of Human Alternative Pre-mRNA Splicing with Exon Junction Microarrays. Science *302*, 2141–2144.

Kaikkonen, M.U., Lam, M.T.Y., and Glass, C.K. (2011). Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. Cardiovasc. Res. *90*, 430–440.

Kanaoka, Y., Kimura, S.H., Okazaki, I., Ikeda, M., and Nojima, H. (1997). GAK: a cyclin G associated kinase contains a tensin/auxilin-like domain. FEBS Lett. *402*, 73–80.

Karlić, R., Chung, H.-R., Lasserre, J., Vlahovicek, K., and Vingron, M. (2010). Histone modification levels are predictive for gene expression. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *107*, 2926–2931.

Kelemen, O., Convertini, P., Zhang, Z., Wen, Y., Shen, M., Falaleeva, M., and Stamm, S. (2013). Function of alternative splicing. Gene *514*, 1–30.

Keren, H., Lev-Maor, G., and Ast, G. (2010). Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function. Nat. Rev. Genet. *11*, 345–355.

Kerszberg, M. (2004). Noise, delays, robustness, canalization and all that. Curr. Opin. Genet. Dev. *14*, 440–445.

Kim, E., Magen, A., and Ast, G. (2007). Different levels of alternative splicing among eukaryotes. Nucl. Acids Res. *35*, 125–131.

Kim, Y., Shintani, S., Kohno, Y., Zhang, R., and Wong, D.T. (2004). Cyclin G2 dysregulation in human oral cancer. Cancer Res. *64*, 8980–8986.

Kimura, S.H., Ikawa, M., Ito, A., Okabe, M., and Nojima, H. (2001). Cyclin G1 is involved in G2/M arrest in response to DNA damage and in growth control after damage recovery. Oncogene *20*, 3290–3300.

Kingston, R.E., and Tamkun, J.W. (2014). Transcriptional regulation by trithorax-group proteins. Cold Spring Harb Perspect Biol *6*, a019349.

Klingenberg, C.P., and McIntyre, G.S. (1998). Geometric Morphometrics of Developmental Instability: Analyzing Patterns of Fluctuating Asymmetry with Procrustes Methods. Evolution *52*, 1363–1375.

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

Kolasinska-Zwierz, P., Down, T., Latorre, I., Liu, T., Liu, X.S., and Ahringer, J. (2009). Differential chromatin marking of introns and expressed exons by H3K36me3. Nat. Genet. *41*, 376–381.

Kooistra, S.M., and Helin, K. (2012). Molecular mechanisms and potential functions of histone demethylases. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *13*, 297–311.

Kornblihtt, A.R., Mata, M.D.L., Fededa, J.P., Muñoz, M.J., and Nogués, G. (2004). Multiple links between transcription and splicing. RNA *10*, 1489–1498.

Kotlikova, I.V., Demakova, O.V., Semeshin, V.F., Shloma, V.V., Boldyreva, L.V., Kuroda, M.I., and Zhimulev, I.F. (2006). The Drosophila dosage compensation complex binds to polytene chromosomes independently of developmental changes in transcription. Genetics *172*, 963–974.

Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. Cell *128*, 693–705.

Kuehner, J.N., Pearson, E.L., and Moore, C. (2011a). Unravelling the means to an end: RNA polymerase II transcription termination. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *12*, 283–294.

Kuehner, J.N., Pearson, E.L., and Moore, C. (2011b). Unravelling the means to an end: RNA polymerase II transcription termination. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *12*, 283–294.

Kunert, N., Marhold, J., Stanke, J., Stach, D., and Lyko, F. (2003). A Dnmt2-like protein mediates DNA methylation in Drosophila. Development *130*, 5083–5090.

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

Kwon, S.-H., Park, J.-C., Ramachandran, S., Cha, S.-D., Kwon, K.-Y., Park, J.-K., Park, J.-W., Bae, I., and Cho, C.-H. (2008). Loss of cyclin g1 expression in human uterine leiomyoma cells induces apoptosis. Reprod Sci *15*, 400–410.

Lachner, M., and Jenuwein, T. (2002). The many faces of histone lysine methylation. Curr. Opin. Cell Biol. *14*, 286–298.

Lagarou, A., Mohd-Sarip, A., Moshkin, Y.M., Chalkley, G.E., Bezstarosti, K., Demmers, J.A.A., and Verrijzer, C.P. (2008). dKDM2 couples histone H2A ubiquitylation to histone H3 demethylation during Polycomb group silencing. Genes Dev. *22*, 2799–2810.

Lania, L., Majello, B., and Napolitano, G. (1999). Transcriptional control by cell-cycle regulators: a review. J. Cell. Physiol. *179*, 134–141.

Lareau, L.F., and Brenner, S.E. (2015). Regulation of Splicing Factors by Alternative Splicing and NMD Is Conserved between Kingdoms Yet Evolutionarily Flexible. Mol Biol Evol *32*, 1072–1079.

Larochelle, S., Amat, R., Glover-Cutter, K., Sansó, M., Zhang, C., Allen, J.J., Shokat, K.M., Bentley, D.L., and Fisher, R.P. (2012). Cyclin-dependent kinase control of the initiation-to-elongation switch of RNA polymerase II. Nat. Struct. Mol. Biol. *19*, 1108–1115.

Latham, J.A., and Dent, S.Y.R. (2007). Cross-regulation of histone modifications. Nat. Struct. Mol. Biol. *14*, 1017–1024.

Leamy, L.J., and Klingenberg, C.P. (2005). The Genetics and Evolution of Fluctuating Asymmetry. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics *36*, 1–21.

Leamy, L.J., Routman, E.J., and Cheverud, J.M. (2002). An epistatic genetic basis for fluctuating asymmetry of mandible size in mice. Evolution *56*, 642–653.

Lecona, E., Rojas, L.A., Bonasio, R., Johnston, A., Fernández-Capetillo, O., and Reinberg, D. (2013). Polycomb protein SCML2 regulates the cell cycle by binding and modulating CDK/CYCLIN/p21 complexes. PLoS Biol. *11*, e1001737.

Lee, Y., and Rio, D.C. (2015). Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. Annual Review of Biochemistry *84*, 291–323.

Levine, M. (2011). Paused RNA polymerase II as a developmental checkpoint. Cell *145*, 502–511.

Levy, S.F., and Siegal, M.L. (2008). Network hubs buffer environmental variation in Saccharomyces cerevisiae. PLoS Biol. *6*, e264.

Li, S., and Shogren-Knaak, M.A. (2009). The Gcn5 bromodomain of the SAGA complex facilitates cooperative and cross-tail acetylation of nucleosomes. J. Biol. Chem. *284*, 9411–9417.

Li, B., Carey, M., and Workman, J.L. (2007). The role of chromatin during transcription. Cell *128*, 707–719.

Lim, S., and Kaldis, P. (2013). Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. Development *140*, 3079–3093.

Liu, Y., Kung, C., Fishburn, J., Ansari, A.Z., Shokat, K.M., and Hahn, S. (2004). Two cyclin-dependent kinases promote RNA polymerase II transcription and formation of the scaffold complex. Mol. Cell. Biol. *24*, 1721–1735.

Lo, S.M., Ahuja, N.K., and Francis, N.J. (2009). Polycomb group protein Suppressor 2 of zeste is a functional homolog of Posterior Sex Combs. Mol. Cell. Biol. *29*, 515–525.

Loomis, R.J., Naoe, Y., Parker, J.B., Savic, V., Bozovsky, M.R., Macfarlan, T., Manley, J.L., and Chakravarti, D. (2009). Chromatin binding of SRp20 and ASF/SF2 and dissociation from mitotic chromosomes is modulated by histone H3 serine 10 phosphorylation. Mol. Cell *33*, 450–461.

Loyer, P., Trembley, J.H., Grenet, J.A., Busson, A., Corlu, A., Zhao, W., Kocak, M., Kidd, V.J., and Lahti, J.M. (2008). Characterization of cyclin L1 and L2 interactions with CDK11 and splicing factors: influence of cyclin L isoforms on splice site selection. J. Biol. Chem. *283*, 7721–7732.

Luco, R.F., Pan, Q., Tominaga, K., Blencowe, B.J., Pereira-Smith, O.M., and Misteli, T. (2010). Regulation of alternative splicing by histone modifications. Science *327*, 996–1000.

Luco, R.F., Allo, M., Schor, I.E., Kornblihtt, A.R., and Misteli, T. (2011). Epigenetics in Alternative Pre-mRNA Splicing. Cell *144*, 16–26.

Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution. Nature *389*, 251–260.

Lunde, B.M., Reichow, S.L., Kim, M., Suh, H., Leeper, T.C., Yang, F., Mutschler, H., Buratowski, S., Meinhart, A., and Varani, G. (2010). Cooperative interaction of transcription termination factors with the RNA polymerase II C-terminal domain. Nat. Struct. Mol. Biol. *17*, 1195–1201.

Lynch, K.W. (2007). Regulation of alternative splicing by signal transduction pathways. Adv. Exp. Med. Biol. *623*, 161–174.

Ma, Z., Wu, Y., Jin, J., Yan, J., Kuang, S., Zhou, M., Zhang, Y., and Guo, A.-Y. (2013). Phylogenetic analysis reveals the evolution and diversification of cyclins in eukaryotes. Mol. Phylogenet. Evol. *66*, 1002–1010.

Maeda, R.K., and Karch, F. (2006). The ABC of the BX-C: the bithorax complex explained. Development *133*, 1413–1422.

Maeshima, K., Imai, R., Tamura, S., and Nozaki, T. (2014). Chromatin as dynamic 10-nm fibers. Chromosoma *123*, 225–237.

Maheshri, N., and O'Shea, E.K. (2007). Living with noisy genes: how cells function reliably with inherent variability in gene expression. Annu Rev Biophys Biomol Struct *36*, 413–434.

Makeyev, E.V., Zhang, J., Carrasco, M.A., and Maniatis, T. (2007). The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. Mol. Cell *27*, 435–448.

Malumbres, M. (2014). Cyclin-dependent kinases. Genome Biol. *15*, 122.

Maniatis, T., and Reed, R. (2002). An extensive network of coupling among gene expression machines. Nature *416*, 499–506.

Mapendano, C.K., Lykke-Andersen, S., Kjems, J., Bertrand, E., and Jensen, T.H. (2010). Crosstalk between mRNA 3' end processing and transcription initiation. Mol. Cell *40*, 410–422.

Marenda, D.R., Zraly, C.B., and Dingwall, A.K. (2004). The Drosophila Brahma (SWI/SNF) chromatin remodeling complex exhibits cell-type specific activation and repression functions. Dev. Biol. *267*, 279–293.

Marmorstein, R., and Zhou, M.-M. (2014). Writers and readers of histone acetylation: structure, mechanism, and inhibition. Cold Spring Harb Perspect Biol *6*, a018762.

Marshall, R.M., and Grana, X. (2006). Mechanisms controlling CDK9 activity. Front. Biosci. *11*, 2598–2613.

Marygold, S.J., Roote, J., Reuter, G., Lambertsson, A., Ashburner, M., Millburn, G.H., Harrison, P.M., Yu, Z., Kenmochi, N., Kaufman, T.C., et al. (2007). The ribosomal protein genes and Minute loci of Drosophila melanogaster. Genome Biology *8*, R216.

De la Mata, M., Alonso, C.R., Kadener, S., Fededa, J.P., Blaustein, M., Pelisch, F., Cramer, P., Bentley, D., and Kornblihtt, A.R. (2003). A slow RNA polymerase II affects alternative splicing in vivo. Mol. Cell *12*, 525–532.

Matera, A.G., and Wang, Z. (2014). A day in the life of the spliceosome. Nat Rev Mol Cell Biol *15*, 108–121.

Matlin, A.J., Clark, F., and Smith, C.W.J. (2005). Understanding alternative splicing: towards a cellular code. Nat Rev Mol Cell Biol *6*, 386–398.

Matter, N., Herrlich, P., and König, H. (2002). Signal-dependent regulation of splicing via phosphorylation of Sam68. Nature *420*, 691–695.

McElroy, K.A., Kang, H., and Kuroda, M.I. (2014). Are we there yet? Initial targeting of the Male-Specific Lethal and Polycomb group chromatin complexes in Drosophila. Open Biology *4*, 140006.

McGinnis, W., and Krumlauf, R. (1992). Homeobox genes and axial patterning. Cell *68*, 283–302.

Milne, T.A., Sinclair, D.A., and Brock, H.W. (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.

Misteli, T., and Spector, D.L. (1999). RNA Polymerase II Targets Pre-mRNA Splicing Factors to Transcription Sites In Vivo. Molecular Cell *3*, 697–705.

Mizuguchi, G., Shen, X., Landry, J., Wu, W.-H., Sen, S., and Wu, C. (2004). ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. Science *303*, 343–348.

Mohd-Sarip, A., Venturini, F., Chalkley, G.E., and Verrijzer, C.P. (2002). Pleiohomeotic can link polycomb to DNA and mediate transcriptional repression. Mol. Cell. Biol. *22*, 7473–7483.

Mohrmann, L., and Verrijzer, C.P. (2005). Composition and functional specificity of SWI2/SNF2 class chromatin remodeling complexes. Biochim. Biophys. Acta *1681*, 59–73.

Mohrmann, L., Langenberg, K., Krijgsveld, J., Kal, A.J., Heck, A.J.R., and Verrijzer, C.P. (2004). Differential Targeting of Two Distinct SWI/SNF-Related Drosophila Chromatin-Remodeling Complexes. Mol. Cell. Biol. *24*, 3077–3088.

Morrison, A.J., and Shen, X. (2009). Chromatin remodelling beyond transcription: the INO80 and SWR1 complexes. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *10*, 373–384.

Mouchel-Vielh, E., Rougeot, J., Decoville, M., and Peronnet, F. (2011). The MAP kinase ERK and its scaffold protein MP1 interact with the chromatin regulator Corto during Drosophila wing tissue development. BMC Developmental Biology *11*, 17.

Mount, S.M., and Salz, H.K. (2000). Pre-messenger RNA processing factors in the Drosophila genome. J. Cell Biol. *150*, F37–F44.

Murali, T., Pacifico, S., Yu, J., Guest, S., Roberts, G.G., and Finley, R.L. (2011). DroID 2011: a comprehensive, integrated resource for protein, transcription factor, RNA and gene interactions for Drosophila. Nucl. Acids Res. *39*, D736–D743.

Murawska, M., and Brehm, A. (2011). CHD chromatin remodelers and the transcription cycle. Transcription *2*, 244–253.

Murr, R. (2010). Interplay between different epigenetic modifications and mechanisms. Adv. Genet. *70*, 101–141.

Neely, K.E., and Workman, J.L. (2002). The complexity of chromatin remodeling and its links to cancer. Biochim. Biophys. Acta *1603*, 19–29.

Neely, K.E., Hassan, A.H., Brown, C.E., Howe, L., and Workman, J.L. (2002). Transcription activator interactions with multiple SWI/SNF subunits. Mol. Cell. Biol. *22*, 1615–1625.

Nekrasov, M., Klymenko, T., Fraterman, S., Papp, B., Oktaba, K., Köcher, T., Cohen, A., Stunnenberg, H.G., Wilm, M., and Müller, J. (2007). Pcl-PRC2 is needed to generate high levels of H3-K27 trimethylation at Polycomb target genes. EMBO J. *26*, 4078–4088.

Nemet, J., Jelicic, B., Rubelj, I., and Sopta, M. (2014). The two faces of Cdk8, a positive/negative regulator of transcription. Biochimie *97*, 22–27.

Neto-Silva, R.M., Wells, B.S., and Johnston, L.A. (2009). Mechanisms of growth and homeostasis in the Drosophila wing. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *25*, 197–220.

Neves, G., Zucker, J., Daly, M., and Chess, A. (2004). Stochastic yet biased expression of multiple Dscam splice variants by individual cells. Nat. Genet. *36*, 240–246.

Nielsen, A.L., Sanchez, C., Ichinose, H., Cerviño, M., Lerouge, T., Chambon, P., and Losson, R. (2002). Selective interaction between the chromatin-remodeling factor BRG1 and the heterochromatin-associated protein HP1alpha. EMBO J. *21*, 5797–5806.

Nigg, E.A. (1996). Cyclin-dependent kinase 7: at the cross-roads of transcription, DNA repair and cell cycle control? Curr. Opin. Cell Biol. *8*, 312–317.

Nishioka, K., Chuikov, S., Sarma, K., Erdjument-Bromage, H., Allis, C.D., Tempst, P., and Reinberg, D. (2002). Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. Genes Dev. *16*, 479–489.

Ohkura, N., Takahashi, M., Yaguchi, H., Nagamura, Y., and Tsukada, T. (2005). Coactivator-associated arginine methyltransferase 1, CARM1, affects pre-mRNA splicing in an isoform-specific manner. J. Biol. Chem. *280*, 28927–28935.

Okamoto, K., and Beach, D. (1994). Cyclin G is a transcriptional target of the p53 tumor suppressor protein. EMBO J. *13*, 4816–4822.

Okamoto, K., and Prives, C. (1999). A role of cyclin G in the process of apoptosis. Oncogene *18*, 4606–4615.

Olson, S., Blanchette, M., Park, J., Savva, Y., Yeo, G.W., Yeakley, J.M., Rio, D.C., and Graveley, B.R. (2007). A regulator of Dscam mutually exclusive splicing fidelity. Nat Struct Mol Biol *14*, 1134–1140.

Palmer, A.R., and Strobeck, C. (1986). Fluctuating Asymmetry: Measurement, Analysis, Patterns. Annual Review of Ecology and Systematics *17*, 391–421.

Pandit, S., Wang, D., and Fu, X.-D. (2008). Functional integration of transcriptional and RNA processing machineries. Curr. Opin. Cell Biol. *20*, 260–265.

Papoulas, O., Beek, S.J., Moseley, S.L., McCallum, C.M., Sarte, M., Shearn, A., and Tamkun, J.W. (1998). The Drosophila trithorax group proteins BRM, ASH1 and ASH2 are subunits of distinct protein complexes. Development *125*, 3955–3966.

Park, J.W., Parisky, K., Celotto, A.M., Reenan, R.A., and Graveley, B.R. (2004). Identification of alternative splicing regulators by RNA interference in Drosophila. PNAS *101*, 15974–15979.

Patel, S.B., Novikova, N., and Bellini, M. (2007). Splicing-independent recruitment of spliceosomal small nuclear RNPs to nascent RNA polymerase II transcripts. J Cell Biol *178*, 937–949.

Patrick, K.L., Ryan, C.J., Xu, J., Lipp, J.J., Nissen, K.E., Roguev, A., Shales, M., Krogan, N.J., and Guthrie, C. (2015). Genetic interaction mapping reveals a role for the SWI/SNF nucleosome remodeler in spliceosome activation in fission yeast. PLoS Genet. *11*, e1005074.

Pekowska, A., Benoukraf, T., Zacarias-Cabeza, J., Belhocine, M., Koch, F., Holota, H., Imbert, J., Andrau, J.-C., Ferrier, P., and Spicuglia, S. (2011). H3K4 tri-methylation provides an epigenetic signature of active enhancers. EMBO J. *30*, 4198–4210.

Peng, J., Marshall, N.F., and Price, D.H. (1998). Identification of a cyclin subunit required for the function of Drosophila P-TEFb. J. Biol. Chem. *273*, 13855–13860.

Perales, R., and Bentley, D. (2009). “Cotranscriptionality”: The Transcription Elongation Complex as a Nexus for Nuclear Transactions. Molecular Cell *36*, 178–191.

Peterlin, B.M., and Price, D.H. (2006). Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. Mol. Cell *23*, 297–305.

Petruk, S., Sedkov, Y., Smith, S., Tillib, S., Kraevski, V., Nakamura, T., Canaani, E., Croce, C.M., and 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., Riley, K.M., Hodgson, J., Schweisguth, F., Hirose, S., Jaynes, J.B., Brock, H.W., and Mazo, A. (2006). Transcription of bxd noncoding RNAs promoted by trithorax represses Ubx in cis by transcriptional interference. Cell *127*, 1209–1221.

Piacentini, L., Fanti, L., Negri, R., Del Vescovo, V., Fatica, A., Altieri, F., and Pimpinelli, S. (2009). Heterochromatin protein 1 (HP1a) positively regulates euchromatic gene expression through RNA transcript association and interaction with hnRNPs in Drosophila. PLoS Genet. *5*, e1000670.

Pozzoli, U., and Sironi, M. (2005). Silencers regulate both constitutive and alternative splicing events in mammals. CMLS, Cell. Mol. Life Sci. *62*, 1579–1604.

Price, D.H. (2000). P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. Mol. Cell. Biol. *20*, 2629–2634.

Queitsch, C., Sangster, T.A., and Lindquist, S. (2002). Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. Nature *417*, 618–624.

Reimer, C.L., Borras, A.M., Kurdistani, S.K., Garreau, J.R., Chung, M., Aaronson, S.A., and Lee, S.W. (1999). Altered regulation of cyclin G in human breast cancer and its specific localization at replication foci in response to DNA damage in p53+/+ cells. J. Biol. Chem. *274*, 11022–11029.

Ren, N., Zhu, C., Lee, H., and Adler, P.N. (2005). Gene expression during Drosophila wing morphogenesis and differentiation. Genetics *171*, 625–638.

Rickert, P., Seghezzi, W., Shanahan, F., Cho, H., and Lees, E. (1996). Cyclin C/CDK8 is a novel CTD kinase associated with RNA polymerase II. Oncogene *12*, 2631–2640.

Riggs, A.D., and Porter, T.N. (1996). Overview of Epigenetic Mechanisms. Cold Spring Harbor Monograph Archive *32*, 29–45.

Robson-Dixon, N.D., and Garcia-Blanco, M.A. (2004). MAZ Elements Alter Transcription Elongation and Silencing of the Fibroblast Growth Factor Receptor 2 Exon IIIb. J. Biol. Chem. *279*, 29075–29084.

Rodriguez-Jato, S., Busturia, A., and Herr, W. (2011). Drosophila melanogaster dHCF interacts with both PcG and TrxG epigenetic regulators. PLoS ONE *6*, e27479.

Ruden, D.M., Garfinkel, M.D., Sollars, V.E., and Lu, X. (2003). Waddington's widget: Hsp90 and the inheritance of acquired characters. Semin. Cell Dev. Biol. *14*, 301–310.

Rutherford, S.L., and Lindquist, S. (1998a). Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. Nature *396*, 336–342.

Rutherford, S., Hirate, Y., and Swalla, B.J. (2007a). The Hsp90 capacitor, developmental remodeling, and evolution: the robustness of gene networks and the curious evolvability of metamorphosis. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. *42*, 355–372.

Rutherford, S., Knapp, J.R., and Csermely, P. (2007b). Hsp90 and developmental networks. Adv. Exp. Med. Biol. *594*, 190–197.

Ryder, E., Blows, F., Ashburner, M., Bautista-Llacer, R., Coulson, D., Drummond, J., Webster, J., Gubb, D., Gunton, N., Johnson, G., et al. (2004). The DrosDel collection: a set of P-element insertions for generating custom chromosomal aberrations in Drosophila melanogaster. Genetics *167*, 797–813.

Sæbøe-Larssen, S., Lyamouri, M., Merriam, J., Oksvold, M.P., and Lambertsson, A. (1998). Ribosomal Protein Insufficiency and the Minute Syndrome in Drosophila: A Dose-Response Relationship. Genetics *148*, 1215–1224.

Saha, A., Wittmeyer, J., and Cairns, B.R. (2006). Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *7*, 437–447.

Saint-André, V., Batsché, E., Rachez, C., and Muchardt, C. (2011). Histone H3 lysine 9 trimethylation and HP1γ favor inclusion of alternative exons. Nat. Struct. Mol. Biol. *18*, 337–344.

Salvaing, J., Lopez, A., Boivin, A., Deutsch, J.S., and Peronnet, F. (2003). The Drosophila Corto protein interacts with Polycomb-group proteins and the GAGA factor. Nucleic Acids Res. *31*, 2873–2882.

Salvaing, J., Decoville, M., Mouchel-Vielh, E., Bussière, M., Daulny, A., Boldyreva, L., Zhimulev, I., Locker, D., and 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., Mouchel-Vielh, E., Bloyer, S., Preiss, A., and Peronnet, F. (2008a). Regulation of Abd-B expression by Cyclin G and Corto in the abdominal epithelium of Drosophila. Hereditas *145*, 138–146.

Salvaing, J., Nagel, A.C., Mouchel-Vielh, E., Bloyer, S., Maier, D., Preiss, A., and Peronnet, F. (2008b). The enhancer of trithorax and polycomb corto interacts with cyclin G in Drosophila. PLoS ONE *3*, e1658.

Sánchez-Jiménez, F., and Sánchez-Margalet, V. (2013). Role of Sam68 in post-transcriptional gene regulation. Int J Mol Sci *14*, 23402–23419.

Sankar, N., Baluchamy, S., Kadeppagari, R.-K., Singhal, G., Weitzman, S., and Thimmapaya, B. (2008). p300 provides a corepressor function by cooperating with YY1 and HDAC3 to repress c-Myc. Oncogene *27*, 5717–5728.

Sarma, K., and Reinberg, D. (2005). Histone variants meet their match. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *6*, 139–149.

Scheuermann, J.C., de Ayala Alonso, A.G., Oktaba, K., Ly-Hartig, N., McGinty, R.K., Fraterman, S., Wilm, M., Muir, T.W., and Müller, J. (2010). Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB. Nature *465*, 243–247.

Scheuermann, J.C., Gutiérrez, L., and Müller, J. (2012). Histone H2A monoubiquitination and Polycomb repression: the missing pieces of the puzzle. Fly (Austin) *6*, 162–168.

Schmitz, K.-M., Mayer, C., Postepska, A., and Grummt, I. (2010). Interaction of noncoding RNA with the rDNA promoter mediates recruitment of DNMT3b and silencing of rRNA genes. Genes Dev. *24*, 2264–2269.

Schmucker, D., Clemens, J.C., Shu, H., Worby, C.A., Xiao, J., Muda, M., Dixon, J.E., and Zipursky, S.L. (2000). Drosophila Dscam Is an Axon Guidance Receptor Exhibiting Extraordinary Molecular Diversity. Cell *101*, 671–684.

Schoeftner, S., Sengupta, A.K., Kubicek, S., Mechtler, K., Spahn, L., Koseki, H., Jenuwein, T., and Wutz, A. (2006). Recruitment of PRC1 function at the initiation of X inactivation independent of PRC2 and silencing. EMBO J. *25*, 3110–3122.

Schor, I.E., Rascovan, N., Pelisch, F., Alló, M., and Kornblihtt, A.R. (2009). Neuronal cell depolarization induces intragenic chromatin modifications affecting NCAM alternative splicing. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *106*, 4325–4330.

Schuettengruber, B., and Cavalli, G. (2010). The DUBle life of polycomb complexes. Dev. Cell *18*, 878–880.

Schuettengruber, B., Chourrout, D., Vervoort, M., Leblanc, B., and Cavalli, G. (2007). Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. Cell *128*, 735–745.

Schwartz, Y.B., and Pirrotta, V. (2008). Polycomb complexes and epigenetic states. Curr. Opin. Cell Biol. *20*, 266–273.

Schwartz, S., Meshorer, E., and Ast, G. (2009). Chromatin organization marks exon-intron structure. Nat. Struct. Mol. Biol. *16*, 990–995.

Seo, H.R., Lee, D.H., Lee, H.J., Baek, M., Bae, S., Soh, J.W., Lee, S.J., Kim, J., and Lee, Y.S. (2006). Cyclin G1 overcomes radiation-induced G2 arrest and increases cell death through transcriptional activation of cyclin B1. Cell Death Differ. *13*, 1475–1484.

Shandilya, J., and Roberts, S.G.E. (2012). The transcription cycle in eukaryotes: from productive initiation to RNA polymerase II recycling. Biochim. Biophys. Acta *1819*, 391–400.

Siegal, M.L., and Bergman, A. (2002). Waddington's canalization revisited: developmental stability and evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *99*, 10528–10532.

Simic, R., Lindstrom, D.L., Tran, H.G., Roinick, K.L., Costa, P.J., Johnson, A.D., Hartzog, G.A., and Arndt, K.M. (2003). Chromatin remodeling protein Chd1 interacts with transcription elongation factors and localizes to transcribed genes. EMBO J. *22*, 1846–1856.

Sims, R.J., Belotserkovskaya, R., and Reinberg, D. (2004). Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it. Genes Dev. *18*, 2437–2468.

Sims, R.J., Millhouse, S., Chen, C.-F., Lewis, B.A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Manley, J.L., and Reinberg, D. (2007). Recognition of trimethylated histone H3 lysine 4 facilitates the recruitment of transcription postinitiation factors and pre-mRNA splicing. Mol. Cell *28*, 665–676.

Sinclair, D.A., Campbell, R.B., Nicholls, F., Slade, E., and Brock, H.W. (1992). Genetic analysis of the additional sex combs locus of Drosophila melanogaster. Genetics *130*, 817–825.

Smith, C.W., and Valcárcel, J. (2000). Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. Trends Biochem. Sci. *25*, 381–388.

Smith, M.L., Kontny, H.U., Bortnick, R., and Fornace, A.J. (1997). The p53-regulated cyclin G gene promotes cell growth: p53 downstream effectors cyclin G and Gadd45 exert different effects on cisplatin chemosensitivity. Exp. Cell Res. *230*, 61–68.

Smith, S.T., Petruk, S., Sedkov, Y., Cho, E., Tillib, S., Canaani, E., and Mazo, A. (2004). Modulation of heat shock gene expression by the TAC1 chromatin-modifying complex. Nat. Cell Biol. *6*, 162–167.

Spies, N., Nielsen, C.B., Padgett, R.A., and Burge, C.B. (2009). Biased chromatin signatures around polyadenylation sites and exons. Mol. Cell *36*, 245–254.

Steffen, P.A., and Ringrose, L. (2014). What are memories made of? How Polycomb and Trithorax proteins mediate epigenetic memory. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *15*, 340–356.

Sterner, D.E., and Berger, S.L. (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. Microbiol. Mol. Biol. Rev. *64*, 435–459.

Stock, J.K., Giadrossi, S., Casanova, M., Brookes, E., Vidal, M., Koseki, H., Brockdorff, N., Fisher, A.G., and Pombo, A. (2007). Ring1-mediated ubiquitination of H2A restrains poised RNA polymerase II at bivalent genes in mouse ES cells. Nat. Cell Biol. *9*, 1428–1435.

Stoss, O., Novoyatleva, T., Gencheva, M., Olbrich, M., Benderska, N., and Stamm, S. (2004). p59(fyn)-mediated phosphorylation regulates the activity of the tissue-specific splicing factor rSLM-1. Mol. Cell. Neurosci. *27*, 8–21.

Stossi, F., Likhite, V.S., Katzenellenbogen, J.A., and Katzenellenbogen, B.S. (2006). Estrogen-occupied estrogen receptor represses cyclin G2 gene expression and recruits a repressor complex at the cyclin G2 promoter. J. Biol. Chem. *281*, 16272–16278.

Strahl, B.D., and Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. Nature *403*, 41–45.

Suganuma, T., and Workman, J.L. (2011). Signals and combinatorial functions of histone modifications. Annu. Rev. Biochem. *80*, 473–499.

Takahashi, K.H., Rako, L., Takano-Shimizu, T., Hoffmann, A.A., and Lee, S.F. (2010). Effects of small Hsp genes on developmental stability and microenvironmental canalization. BMC Evol. Biol. *10*, 284.

Takahashi, K.H., Okada, Y., Teramura, K., and Tsujino, M. (2011). Deficiency mapping of the genomic regions associated with effects on developmental stability in Drosophila melanogaster. Evolution *65*, 3565–3577.

Takeda, D.Y., Wohlschlegel, J.A., and Dutta, A. (2001). A Bipartite Substrate Recognition Motif for Cyclin-dependent Kinases. J. Biol. Chem. *276*, 1993–1997.

Tamura, K., Kanaoka, Y., Jinno, S., Nagata, A., Ogiso, Y., Shimizu, K., Hayakawa, T., Nojima, H., and Okayama, H. (1993). Cyclin G: a new mammalian cyclin with homology to fission yeast Cig1. Oncogene *8*, 2113–2118.

Tang, L., Nogales, E., and Ciferri, C. (2010). Structure and function of SWI/SNF chromatin remodeling complexes and mechanistic implications for transcription. Prog. Biophys. Mol. Biol. *102*, 122–128.

Taniguchi, Y., Choi, P.J., Li, G.-W., Chen, H., Babu, M., Hearn, J., Emili, A., and Xie, X.S. (2010). Quantifying E. coli proteome and transcriptome with single-molecule sensitivity in single cells. Science *329*, 533–538.

Tessarz, P., and Kouzarides, T. (2014). Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *15*, 703–708.

Thomas, M.C., and Chiang, C.-M. (2006). The general transcription machinery and general cofactors. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. *41*, 105–178.

Thomas, P.D., Campbell, M.J., Kejariwal, A., Mi, H., Karlak, B., Daverman, R., Diemer, K., Muruganujan, A., and Narechania, A. (2003). PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. Genome Res. *13*, 2129–2141.

Tie, F., Furuyama, T., Prasad-Sinha, J., Jane, E., and Harte, P.J. (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, C.A., Prasad-Sinha, J., Stepanik, V., Zlobin, A., Diaz, M.O., Scacheri, P.C., and Harte, P.J. (2009). CBP-mediated acetylation of histone H3 lysine 27 antagonizes Drosophila Polycomb silencing. Development *136*, 3131–3141.

Tilgner, H., Nikolaou, C., Althammer, S., Sammeth, M., Beato, M., Valcárcel, J., and Guigó, R. (2009). Nucleosome positioning as a determinant of exon recognition. Nat. Struct. Mol. Biol. *16*, 996–1001.

Tropberger, P., and Schneider, R. (2010). Going global: novel histone modifications in the globular domain of H3. Epigenetics *5*, 112–117.

Turner, B.M. (2014). Nucleosome signalling; an evolving concept. Biochim. Biophys. Acta *1839*, 623–626.

Tyagi, A., Ryme, J., Brodin, D., Ostlund Farrants, A.K., and Visa, N. (2009). SWI/SNF associates with nascent pre-mRNPs and regulates alternative pre-mRNA processing. PLoS Genet. *5*, e1000470.

Ucar, D., Hu, Q., and Tan, K. (2011). Combinatorial chromatin modification patterns in the human genome revealed by subspace clustering. Nucleic Acids Res. *39*, 4063–4075.

Varga-Weisz, P. (2001). ATP-dependent chromatin remodeling factors: nucleosome shufflers with many missions. Oncogene *20*, 3076–3085.

Vastenhouw, N.L., and Schier, A.F. (2012). Bivalent histone modifications in early embryogenesis. Curr. Opin. Cell Biol. *24*, 374–386.

Vincent, O., Kuchin, S., Hong, S.P., Townley, R., Vyas, V.K., and Carlson, M. (2001). Interaction of the Srb10 kinase with Sip4, a transcriptional activator of gluconeogenic genes in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell. Biol. *21*, 5790–5796.

Voncken, J.W., Schweizer, D., Aagaard, L., Sattler, L., Jantsch, M.F., and van Lohuizen, M. (1999). Chromatin-association of the Polycomb group protein BMI1 is cell cycle-regulated and correlates with its phosphorylation status. J. Cell. Sci. *112 (Pt 24)*, 4627–4639.

Wada, T., Takagi, T., Yamaguchi, Y., Ferdous, A., Imai, T., Hirose, S., Sugimoto, S., Yano, K., Hartzog, G.A., Winston, F., et al. (1998). DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs. Genes Dev. *12*, 343–356.

Waddington, C.H. (1942). Canalization of development and inheritances of acquired characters. *Nature 150*, 563-565.

Waddington, C.H. (1996). Adaptive Individuals in Evolving Populations. R.K. Belew, and M. Mitchell, eds. (Boston, MA, USA: Addison-Wesley Longman Publishing Co., Inc.), pp. 91–97.

Wagner, E.J., and Garcia-Blanco, M.A. (2002). RNAi-mediated PTB depletion leads to enhanced exon definition. Mol. Cell *10*, 943–949.

Wahl, M.C., Will, C.L., and Lührmann, R. (2009). The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine. Cell *136*, 701–718.

Wang, E.T., Sandberg, R., Luo, S., Khrebtukova, I., Zhang, L., Mayr, C., Kingsmore, S.F., Schroth, G.P., and Burge, C.B. (2008). Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. Nature *456*, 470–476.

Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R.S., and Zhang, Y. (2004). Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. Nature *431*, 873–878.

Wang, Z., Zang, C., Cui, K., Schones, D.E., Barski, A., Peng, W., and Zhao, K. (2009). Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes. Cell *138*, 1019–1031.

Weatheritt, R.J., Jehl, P., Dinkel, H., and Gibson, T.J. (2012). iELM--a web server to explore short linear motif-mediated interactions. Nucleic Acids Res. *40*, W364–W369.

Weiss, T., Hergeth, S., Zeissler, U., Izzo, A., Tropberger, P., Zee, B.M., Dundr, M., Garcia, B.A., Daujat, S., and Schneider, R. (2010). Histone H1 variant-specific lysine methylation by G9a/KMT1C and Glp1/KMT1D. Epigenetics Chromatin *3*, 7.

Will, C.L., and Lührmann, R. (2011). Spliceosome Structure and Function. Cold Spring Harb Perspect Biol *3*, a003707.

Woodcock, C.L., and Frank, J. (1984). Nucleosome mass distribution using image averaging. J. Ultrastruct. Res. *89*, 295–302.

Wu, S.C., and Zhang, Y. (2011). Cyclin-dependent kinase 1 (CDK1)-mediated phosphorylation of enhancer of zeste 2 (Ezh2) regulates its stability. J. Biol. Chem. *286*, 28511–28519.

Wysocka, J., Swigut, T., Xiao, H., Milne, T.A., Kwon, S.Y., Landry, J., Kauer, M., Tackett, A.J., Chait, B.T., Badenhorst, P., et al. (2006). A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. Nature *442*, 86–90.

Yamada, T., Yamaguchi, Y., Inukai, N., Okamoto, S., Mura, T., and Handa, H. (2006). P-TEFb-mediated phosphorylation of hSpt5 C-terminal repeats is critical for processive transcription elongation. Mol. Cell *21*, 227–237.

Yamaguchi, Y., Takagi, T., Wada, T., Yano, K., Furuya, A., Sugimoto, S., Hasegawa, J., and Handa, H. (1999). NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation. Cell *97*, 41–51.

Yamamoto, K., Sonoda, M., Inokuchi, J., Shirasawa, S., and Sasazuki, T. (2004). Polycomb group suppressor of zeste 12 links heterochromatin protein 1alpha and enhancer of zeste 2. J. Biol. Chem. *279*, 401–406.

Zhang, G., and Pradhan, S. (2014). Mammalian epigenetic mechanisms. IUBMB Life *66*, 240–256.

Zhang, C., Zhang, Z., Castle, J., Sun, S., Johnson, J., Krainer, A.R., and Zhang, M.Q. (2008). Defining the regulatory network of the tissue-specific splicing factors Fox-1 and Fox-2. Genes Dev. *22*, 2550–2563.

Zhang, H.S., Gavin, M., Dahiya, A., Postigo, A.A., Ma, D., Luo, R.X., Harbour, J.W., and Dean, D.C. (2000). Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. Cell *101*, 79–89.

Zhou, Q., Li, T., and Price, D.H. (2012). RNA polymerase II elongation control. Annu. Rev. Biochem. *81*, 119–143.

Zhou, W., Zhu, P., Wang, J., Pascual, G., Ohgi, K.A., Lozach, J., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (2008). Histone H2A monoubiquitination represses transcription by inhibiting RNA polymerase II transcriptional elongation. Mol. Cell *29*, 69–80.

Zhu, B., Zheng, Y., Pham, A.-D., Mandal, S.S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Reinberg, D. (2005). Monoubiquitination of human histone H2B: the factors involved and their roles in HOX gene regulation. Mol. Cell *20*, 601–611.

Zraly, C.B., Middleton, F.A., and Dingwall, A.K. (2006). Hormone-response genes are direct in vivo regulatory targets of Brahma (SWI/SNF) complex function. J. Biol. Chem. *281*, 35305–35315.