



HAL
open science

IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION DES CIBLES DE DSP1CHEZ DROSOPHILA MELANOGASTER.

Aurélien Rappailles

► **To cite this version:**

Aurélien Rappailles. IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION DES CIBLES DE DSP1CHEZ DROSOPHILA MELANOGASTER.. domain_other. Université d'Orléans, 2005. Français. NNT : . tel-00011521

HAL Id: tel-00011521

<https://theses.hal.science/tel-00011521>

Submitted on 1 Feb 2006

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.



**THESE PRESENTEE A L'UNIVERSITE D'ORLEANS
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'ORLEANS**

BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE

PAR

Aurélien Rappailles

**DETERMINATION ET CARACTERISATION DES CIBLES DE
DSP1 CHEZ DROSOPHILA MELANOGASTER**

Soutenu le 9 décembre 2005

Membres du jury :

Pr Daniel LOCKER

Pr Francis DELMOTTE

Pr Claudie LAMOUR-ISNARD

Pr Laurent THEODORE

Dr Martine DECOVILLE

Directeur de Thèse

Président du Jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

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

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Daniel Locker de m'avoir accueilli dans son équipe et de m'avoir encadré tout au long de ce travail, ainsi que Mademoiselle Martine Decoville, Maître de Conférence à l'Université d'Orléans, pour m'avoir prodigué conseils et critiques.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance à Madame Claudie Lamour-Isnard, Professeur à l'Université Denis Diderot de Paris, et à Monsieur Laurent Théodore, Professeur à l'Université d'Orsay, d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.

Je tiens également à adresser mes remerciements à Monsieur Francis Delmotte, Professeur à l'Université d'Orléans, pour avoir accepté d'être membre du jury.

Enfin je suis très heureux de remercier toutes les personnes qui me sont chères et qui ont contribué à la réalisation de ce travail dans les meilleures conditions.

Abréviations

Préambule

Introduction

I Structure de la chromatine et influence sur l'expression des gènes	11
I.1 Chromatine	11
I.1.1 Structure et assemblage de la chromatine	11
I.1.2 Euchromatine et hétérochromatine	14
I.2 Structure chromatinienne et régulation de l'expression des gènes	15
I.2.1 Influence sur l'expression des gènes : la variéation par effet de position	15
I.2.2 Modifications de la structure chromatinienne	17
II Maintien de l'expression des gènes par les protéines des groupes Polycomb et Trithorax	22
II.1 Rappel sur le développement	22
II.2 Protéines des groupes Polycomb et Trithorax	28
II.2.1 Identification des gènes des groupes <i>Polycomb</i> et <i>trithorax</i>	28
II.2.2 <i>Activateurs des Polycomb et Trithorax</i>	32
II.2.3 Caractérisation des protéines des groupes Polycomb et Trithorax	33
II.3 Complexes des groupes Polycomb et Trithorax	34
II.3.1 Complexes du groupe Polycomb	34
II.3.1.1 Complexe ESC-E(Z)	35
II.3.1.2 Complexe PRC1	35
II.3.2 Complexes du groupe Trithorax	39
II.3.2.1 Complexe Brahma	39
II.3.2.2 Complexes TAC1, ASH1 et ASH2	40
II.3.2.3 Complexe FACT	41
II.4 Modèle d'action des complexes Polycomb et Trithorax	41
II.4.1 Identification des PRE et TRE	42

II.4.2 Choix entre répression et activation	47
II.4.3 Maintien de la répression ou de l'activation	48
II.4.3.1 Répression de la transcription	49
II.4.3.2 Activation de la transcription	51
II.4.3 Mémoire cellulaire au cours des divisions	52
II.5 Gènes cibles des protéines Polycomb et Trithorax	53
II.6 Autres fonctions des protéines Polycomb et Trithorax	54
II.7 Evolution des protéines Polycomb et Trithorax	55
III Rôle de la protéine DSP1 dans la régulation des gènes	59
III.1 Famille HMGB et domaine HMG	59
III.2 Organisation de la protéine DSP1	61
III.3 Expression de la protéine DSP1 lors du développement et chez l'adulte	63
III.4 DSP1 et la régulation de l'expression des gènes	63
IV Sujet de recherche	68

Résultats

I Cibles de DSP1 sur les complexes <i>Antennapedia</i> et <i>Bithorax</i>	71
I.1 DSP1 est nécessaire à la régulation spatio-temporelle de <i>Scr</i>	71
I.1.1 Introduction à l'article 1	71
I.1.2 Résultats complémentaires	80
Matériel et méthode	80
Résultats	80
I.1.3 Conclusion	83
I.2 Recherche des cibles de DSP1 sur le complexe <i>Bithorax</i>	84
I.2.1 Introduction	84

I.2.2 Matériel et méthode	85
Souches	85
Immunoprécipitation de la chromatine pontée (ChIP)	85
Préparation des puces à ADN	85
I.2.3 Résultats	86
Profil de fixation de DSP1 le long du complexe <i>Bithorax</i>	86
DSP1 interagit avec le domaine <i>iab-2</i>	89
I.2.4 Discussion	91
I.3 Conclusion générale	91
II DSP1 est un recruteur des protéines du groupe Polycomb	93
II.1 Introduction à l'article 2	93
II.2 Conclusion	110
III Cibles de DSP1 en dehors des gènes homéotiques	111
III.1 DSP1 régule l'expression de <i>knirps</i>	111
III.1.1 Introduction à l'article 3	111
III.1.2 Conclusion	123
III.2 Les nouvelles cibles de DSP1	123
III.2.1 Introduction	123
III.2.2 Matériel et méthode	124
Immunoprécipitation de la chromatine pontée (ChIP)	124
Préparation des Chromosomes Artificiels de Bactéries (BAC)	124
III.2.3 Résultats	125
Profil de fixation de DSP1 le long des régions 2C/D, 50E/51A et 69C/D	125
Profil de fixation de DSP1 le long du locus <i>ph-d</i>	127
III.2.4 Discussion	129

Discussion

I DSP1 participe directement à la régulation de nombreux gènes	130
II DSP1 participe à l'initiation et au maintien de l'expression de gènes	132
III Comment DSP1 reconnaît ses gènes cibles ?	134
III.1 Nécessité d'une séquence particulière	134
III.2 Evolution des cibles de DSP1 en fonction du stade de développement	134
IV Modèle d'action de DSP1	135
IV.1 DSP1 et le recrutement des protéines Polycomb et Trithorax	135
IV.2 Modèle de rapprochement des séquences régulatrices et des promoteurs	137

Bibliographie

Abréviations

abd-A : abdominal-A
abx : anterobithorax
Abd-B : Abdominal-B
Ac : Anticorps
ADN : Acide Désoxyribonucléique
AntpC : Complexe *Antennapedia*
Antp : *Antennapedia*
ARN : Acide Ribonucléique
ash1 : *absent small or homeotic disc*
Asx : *Additional sex combs*
ATP : Adénosine Triphosphate
ATPase : Adénosine Triphosphatase
barr : *barren*
bcd : *bicoïd*
brm : *brahma*
BTB : domaine issu des trois protéines Bric à Brac, Tramtrack et Broad Complex
bx : *bithorax*
BxC : Complexe *Bithorax*
bxl : *bithoraxoïd*
cad : *caudal*
ChIP : Immunoprécipitation de la Chromatine Pontée
CMM : Module de Mémoire Cellulaire
Da : Dalton
DNase I : Désoxyribonucléase I
DSP1 : Dorsal Switch Protein 1
en : *engrailed*
esc : *extra sex combs*
E(z) : *Enhancer of zeste*
Fab-7 : *Fronta-abdominal-7*
GAF : Facteur GAGA
gt : *giant*
HAT : Histone Acétyl Transférase
hb : *hunchback*
HDAC : Histone Désacétylase
hh : *hedgehog*
HMG : High Mobility Group
HMT : Histone Méthyl Transférase
HP1 : Heterochromatin Protein 1
iab : *infra-abdominal*
kb : kilobase
kDa : kilo Dalton
kni : *knirps*
Kr : *Krüppel*
lacZ : Bêta-Galactosidase
MCP : *Miscadastral Pigmentation*
MDa : Méga Dalton
pb : paire de base

pbx : *postbithorax*

PCR : Polymerase Chain Reaction

PEV : Variégation par Effet de Position

ph : *polyhomeotic*

pho : *pleiohomeotic*

POU : domaine issu des trois protéines Pit-1, Oct-2 et Unc-86

POZ : domaine caractéristique du Poxvirus et à Doigts de Zinc

PRC1 : Polycomb Repressive Complex 1

PRC2 : Polycomb Repressive Complex 2

PRE : Polycomb Response Element

RING : Real Interesting New Gene

SAM : Sterile Alpha Motif

SANT : domaine issu des protéines Swi3, Ada2, NcoR et TFIIB

Scr : *Sex combs reduced*

Segments abdominaux 1 à 8 : A1 à A8

Segments thoraciques 1 à 3 : T1 à T3

SET : domaine issu des trois protéines Su(Var)3-9, E(Z) et TRX

Su(Var) : Suppresseur de Variégation

TAF : TBP Associated Factor

TBP : Tata Binding Protein

TRE : Trithorax Response Element

Ubx : *Ultrabithorax*

UV : Ultraviolet

µg : microgramme

Préambule

L'organisation de l'ADN en chromatine joue un rôle central dans de nombreux aspects de la biologie des organismes eucaryotes. Au cours des différents événements que sont la réplication, la transcription, la recombinaison ou bien la réparation, la machinerie cellulaire doit impérativement pouvoir accéder à la molécule d'ADN.

De nombreuses études ont montré depuis quelques années, l'aspect dynamique de la chromatine au niveau des promoteurs et autres séquences régulatrices lors de la transcription. Ces études montrent que l'activation d'un gène eucaryote dépend de l'action coordonnée des facteurs de remodelage de la chromatine, des enzymes de modification des histones, des facteurs généraux ou bien spécifiques de la transcription et enfin celle de l'ARN polymérase.

Les signaux moléculaires qui sont à l'origine de l'état activé ou réprimé de la transcription peuvent être transitoires. Or, le maintien de l'expression des gènes au cours des divisions cellulaires également appelé mémoire cellulaire est un événement indispensable au développement de tout organisme. Actuellement, l'une des questions fondamentales posées en biologie est de comprendre comment est maintenu l'état transcriptionnel des gènes au cours des divisions cellulaires. Les complexes de remodelage de la chromatine ainsi que les enzymes modificatrices des histones sont également connus pour maintenir un état d'activation ou de répression de la transcription. Il est clair que leurs capacités à déposer une marque épigénétique telle que la modification des queues d'histones ou bien à altérer le nucléosome participent activement au maintien de l'expression des gènes.

Chez la drosophile, la régulation des gènes homéotiques apparaît comme un bon modèle pour comprendre les mécanismes de la mémoire cellulaire. Les produits des gènes de segmentation induisent l'expression des gènes homéotiques au cours de l'embryogenèse précoce. Lorsque les protéines de segmentation disparaissent, les protéines des groupes Polycomb (PcG) et Trithorax (TrxG) maintiennent, par un remodelage de la chromatine, le profil d'expression des gènes homéotiques pour le reste du développement. Bien que de nombreux gènes des groupes *PcG* et *trxG* aient été identifiés par des mutations caractéristiques des gènes homéotiques, ils contrôlent l'expression d'autres gènes.

Notre équipe s'intéresse à une protéine chromosomique non histone de *Drosophila melanogaster* : Dorsal Switch Protein 1 (DSP1). DSP1 appartient à la famille des protéines à domaines HMG (High Mobility Group) et possède la capacité de se fixer sur des structures courbées de l'ADN. Ces dernières années, nous nous sommes intéressés à élucider les rôles biologiques de la protéine. L'analyse phénotypique d'un mutant nul pour le gène *dsp1* (*dsp1¹*) a révélé l'implication de DSP1 dans la régulation de plusieurs gènes homéotiques. Par ailleurs, des études d'interactions génétiques et des expériences de digestion à la DNase I montrent que DSP1 est un facteur de remodelage de la chromatine qui agit suivant le locus considéré en synergie avec les protéines des groupes PcG et TrxG. DSP1 fait donc partie des protéines qui participent à la mémoire cellulaire. Tout comme le laissent penser les analyses génétiques et les études d'immunolocalisation sur les chromosomes géants des glandes salivaires, l'action de DSP1 n'est pas limitée à la seule régulation des gènes homéotiques. L'objectif du travail de thèse que nous allons présenter ici est de déterminer les gènes cibles de DSP1 et de comprendre son rôle dans les mécanismes de régulation de ces gènes. Dans ce but, nous avons développé au laboratoire la technique d'immunoprécipitation de la chromatine pontée (ChIP). Cette approche et des analyses génétiques nous ont permis dans un premier temps d'isoler des séquences cibles de la protéine DSP1 au sein des complexes homéotiques. Dans un second temps, nous avons réalisé une étude plus systématique et proposé de nouvelles cibles de DSP1 sur l'ensemble du génome. Des études plus approfondies de certaines de ces cibles nous ont permis de montrer différents rôles de la protéine DSP1.

Introduction

I Structure de la chromatine et influence sur l'expression des gènes

I.1 Chromatine

Chez les organismes eucaryotes, l'ADN ne se trouve pas sous une forme nue mais se présente sous la forme d'un assemblage nucléoprotéique dynamique appelé chromatine. Cette structure a deux fonctions essentielles. D'une part, elle permet la compaction de l'ADN afin de maintenir cette grande molécule dans l'espace restreint qu'est le noyau, et d'autre part, elle est impliquée dans la régulation de l'expression des gènes.

I.1.1 Structure et assemblage de la chromatine

La chromatine présente une organisation fondamentale relativement simple basée autour du nucléosome (figure 1). Le nucléosome est composé d'une particule cœur et d'une région internucléosomale qui relie les particules cœurs adjacentes. La particule cœur, dont la structure est très conservée parmi les espèces, est composée d'un octamère d'histones (formé de paires d'histones H3, H4, H2A, H2B) autour duquel 147 pb s'enroulent en 1,75 tour (Luger et al., 1997). La région internucléosomale peut quant à elle être de longueur variable, de 10 à 100 pb en fonction du type cellulaire et de l'espèce. C'est au niveau de cette région qu'est incorporé un cinquième type d'histone (H1).

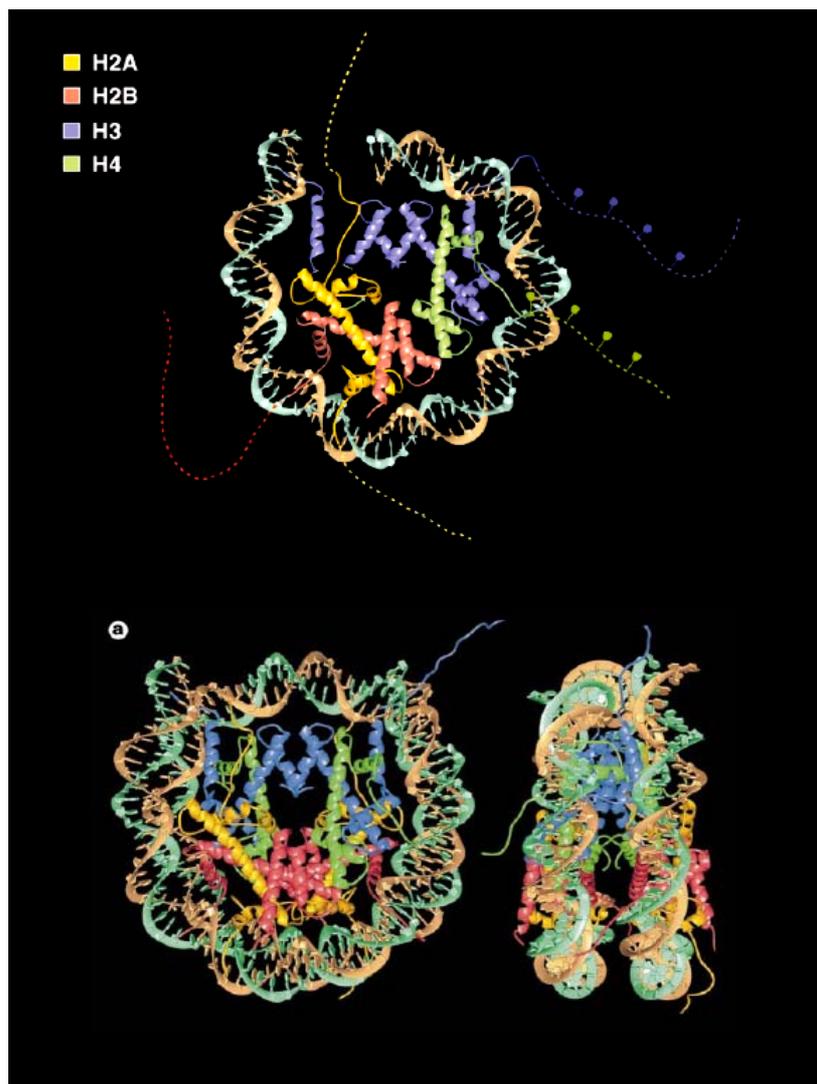


Figure 1. Structure tridimensionnelle du nucléosome (d'après Luger et al., 1997).

L'assemblage de l'ADN comprend plusieurs étapes avant d'atteindre un état de condensation élevé (figure 2). La première de ces étapes est la formation du cœur nucléosome suivant un déroulement bien particulier. Une molécule H3 s'associe avec une molécule H4 pour former un dimère (H3-H4). A son tour, il se dimérise pour former le tétramère (H3-H4)₂. Celui-ci se lie à 120 pb de l'ADN et compose un complexe stable. Parallèlement, les histones H2A et H2B s'associent en dimère. C'est par la suite qu'un tétramère central (H3-H4)₂ est associé à deux dimères (H2A-H2B) (Luger, 2003). Consécutivement à cet assemblage disposé

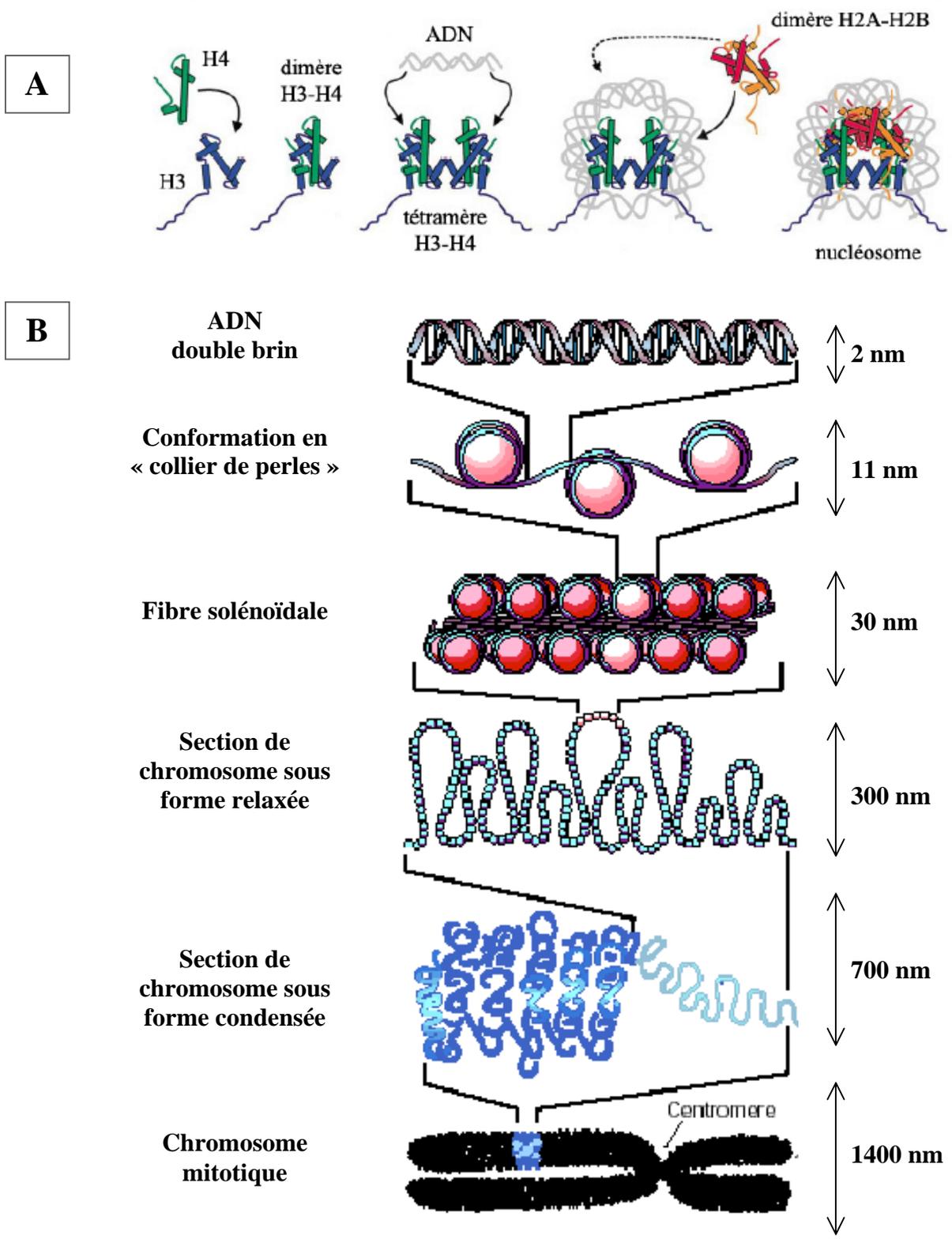


Figure 2. Les différents degrés d'organisation de la chromatine. A) Assemblage du nucléosome. B) Organisation de la fibre chromatinienne (d'après Felsenfeld and Goudine, 2003 ; Morales et al., 2001).

le long de la molécule d'ADN, on génère une structure chromatinienne en forme de fibre de 11 nm de diamètre. L'observation en microscopie électronique de cette structure rappelle celle d'un collier de perle. Dans ce cas, il a été montré que l'absence de l'histone H1 n'altère pas la formation du collier. Le deuxième degré de compaction repose quant à lui sur l'enroulement de la fibre de 11 nm de diamètre sur elle-même. Il se forme alors une fibre plus épaisse de 30 nm de diamètre qui prend la forme d'un solénoïde. Ce compactage chromatinien est stabilisé par l'incorporation de l'histone H1 sur l'ADN internucléosomal (Allan et al., 1986 ; Wong et al., 1998 ; Wolffe, 1999). Les mécanismes qui conduisent à la compaction de la fibre de 30 nm en chromosome restent mal connus. Le modèle le plus courant propose une organisation en boucles de cette fibre. Ces boucles s'enrouleraient sur elles-mêmes pour former le chromosome condensé.

1.1.2 Euchromatine et hétérochromatine

Les premières observations d'un noyau en interphase par Emile Heitz en 1928 révélèrent deux types de chromatine. La première très condensée et très colorée fut appelée hétérochromatine. La seconde plus diffuse et plus claire fut, par opposition, nommée euchromatine. Les études cytologiques, génétiques et moléculaires réalisées depuis ont montré que ces deux états chromatiniens ont bien des différences structurales, et surtout, qu'ils sont des compartiments fonctionnels à part entière.

L'euchromatine, essentiellement localisée au centre du noyau, contient la majorité des gènes. Elle est composée principalement de séquences d'ADN uniques. C'est une forme de chromatine peu dense au cours de l'interphase, constituée majoritairement de fibres en solénoïdes. Cette structure dite « ouverte » est facilement accessible à la machinerie transcriptionnelle, ce qui lui permet d'être fortement transcrite.

L'hétérochromatine est essentiellement localisée au niveau des télomères et des centromères. Elle représente une proportion significative du génome. Par exemple chez la drosophile, le chromosome Y est totalement sous forme d'hétérochromatine, ainsi que 40% du chromosome X, 25% des chromosomes 2 et 3 et plus de 50% du chromosome 4. Bien que cette structure soit présente dans tous les noyaux des cellules eucaryotes, elle est composée principalement de séquences d'ADN non codantes. On peut noter que si chez l'homme

l'hétérochromatine ne contient pas de gène, elle n'en est pas dépourvue dans toutes les espèces. Par exemple, les gènes des ARN ribosomiques (ARNr) y sont localisés chez la plupart des eucaryotes (Adams et al., 2000). Enfin, l'hétérochromatine présente une structure dite « fermée » qui est à l'origine d'une faible transcription en fin de phase S.

I.2 Structure chromatinienne et régulation de l'expression des gènes

I.2.1 Influence sur l'expression des gènes : la variégation par effet de position

L'un des premiers phénomènes étudiés ayant mis en évidence l'influence de la structure chromatinienne sur la régulation de l'expression des gènes est le phénomène de variégation par effet de position (PEV) (figure 3). Le phénomène de PEV a été décrit pour la première fois en 1930 par H. Muller. En irradiant des drosophiles aux rayons X, Muller a obtenu un nouveau phénotype du gène *white*⁺ (*w*⁺), un gène contrôlant la pigmentation rouge de l'œil. Ces mutants, à la suite d'un réarrangement chromosomique induit par les rayonnements X, présentaient des yeux tachetés traduisant une expression différente du gène *w*⁺ dans les différentes ommatidies. Plus tard, l'analyse de chromosomes polyténiques par J. Schultz a montré que les réarrangements chromosomiques produisant des phénotypes en mosaïque ont toujours un point de cassure situé dans des régions d'hétérochromatine. Il existe au niveau du point de cassure une variation de la structure du chromosome suivant le type de cellules. Dans certaines d'entre elles, les chromosomes polyténisés présentent une alternance de bandes. Dans les autres au contraire, une grande partie du chromosome proche du point de cassure n'est plus visible car il est sous forme d'hétérochromatine non polyténisée. Ces résultats suggèrent que la répression du gène *w*⁺ est liée à la mise en place d'une structure hétérochromatinienne répressive au niveau de ce locus euchromatique.

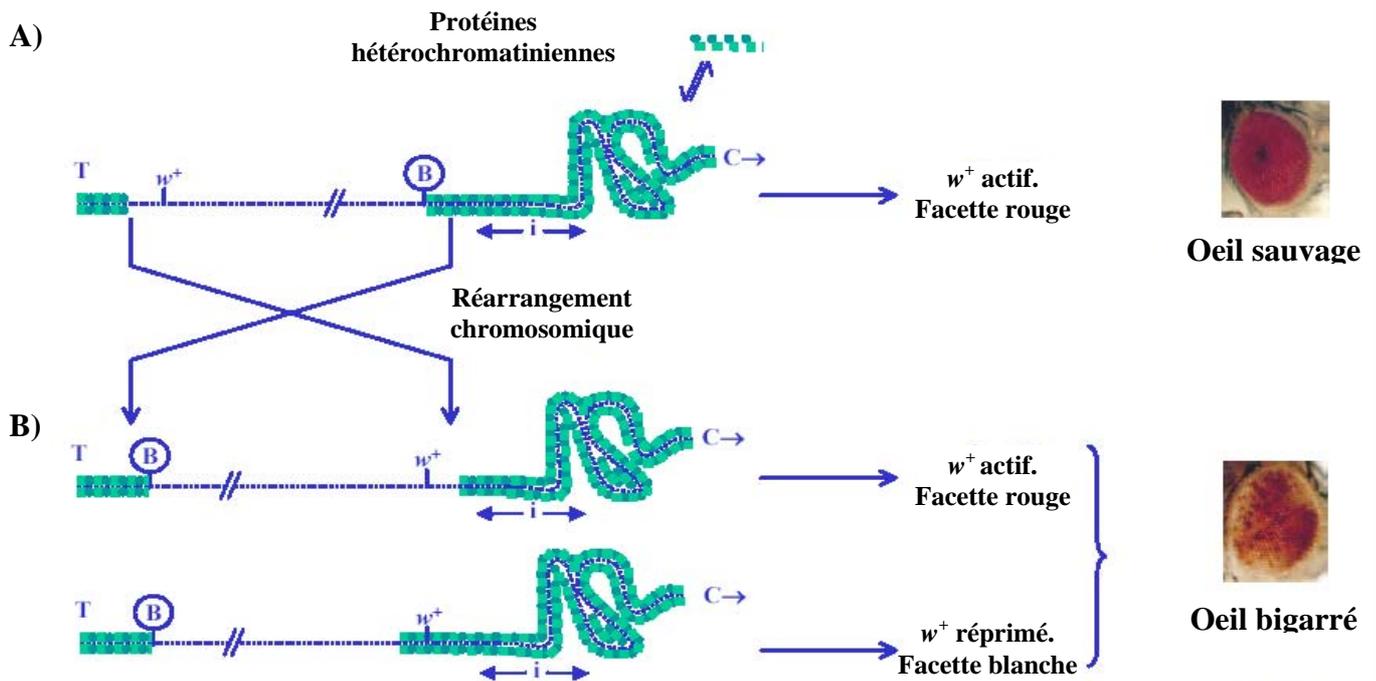


Figure 3. Variégation par effet de position (PEV). (A) Structure du chromosome X. Chez la drosophile, le locus du gène *white*⁺ (*w*⁺) est localisé dans une zone euchromatique. Avant le réarrangement chromosomique, les protéines hétérochromatiniennes sont accumulées au niveau d'un site d'initiation (*i*). Leur propagation est bloquée par la présence de barrières (*B*). (B) Un réarrangement chromosomique du chromosome X place le gène euchromatique *w*⁺ à proximité de l'hétérochromatine centromérique. Les barrières se retrouvent alors à proximité du télomère. Cela permet à l'hétérochromatine de s'étendre plus ou moins en fonction des protéines hétérochromatiniennes disponibles. Dans certaines cellules, la structure hétérochromatinienne se propage jusqu'au locus *w*⁺. Le gène est inactivé (facettes blanches). Dans les cellules restantes la propagation de l'hétérochromatine n'arrive pas jusqu'au locus *w*⁺. Le gène *w*⁺ reste actif (facettes rouges). Il en résulte un œil bigarré. Abréviations : C (centromère) et T (télomère) (d'après Grewal and Elgin, 2002).

Les techniques plus modernes de digestion de la chromatine par différentes nucléases ont permis de montrer assez rapidement que les structures actives et réprimées de la chromatine diffèrent en ce qui concerne l'accessibilité de la molécule d'ADN. Les gènes activement transcrits se trouvent dans une conformation chromatinienne ouverte qui les rend accessibles, en particulier au niveau des régions 5' des promoteurs. Ces régions promotrices ne sont pas compactées par les nucléosomes et présentent des sites hypersensibles à la DNase

I (site HD) (Elgin, 1988). Au contraire, la perte totale ou partielle de l'expression du gène w^+ placé en contexte hétérochromatinien lors du phénomène de PEV est associée à une plus grande résistance aux nucléases et à un resserrement des nucléosomes par rapport au gène w^+ endogène (Tartof et al., 1989 ; Wallrath, 1998). Des expériences de transgénèses où un gène rapporteur subit le phénomène de PEV montrent que des facteurs de transcription normalement présents sur le promoteur sont absents au niveau du gène rapporteur réprimé (Cryderman et al., 1999b). Ces résultats montrent que la structure chromatinienne influence l'expression des gènes en modifiant l'accessibilité de la chromatine à certains facteurs de transcription.

1.2.2 Modifications de la structure chromatinienne

Les processus qui contrôlent l'expression des gènes sont intimement liés à la configuration chromatinienne où le nucléosome possède un rôle central. Sa mobilité est nécessaire au remodelage de la chromatine qui accompagne l'initiation de la transcription. Au contraire, un arrangement régulier et stable de ces nucléosomes assure un état répressif de la chromatine. La chromatine est une structure dynamique dont l'organisation varie suivant le type cellulaire, l'état physiologique ou le stade de développement. Différentes activités étroitement associées entre elles interviennent pour réguler l'arrangement nucléosomique.

Dès les premières étapes de l'assemblage de la chromatine, la particule élémentaire qu'est le nucléosome peut être soumise à des variations. Ces variations se font au niveau de l'ADN (modifications covalentes) ou au niveau des histones qui peuvent exister sous des formes variantes essentielles au maintien de la structure chromatinienne de certains domaines (Rogakou et al., 1999 ; Sullivan et al., 1994). Les histones et plus particulièrement les groupements amines des histones H3, H4 ainsi que les groupements amines et carboxyles des histones H2A, H2B et H1 sont sensibles à une variété de modifications post-traductionnelles : méthylation (Bannister et al., 2002), acétylation (Roth et al., 2001), phosphorylation (Gurley et al., 1973 ; Mahadevan et al., 1991), ubiquitination (Sun and Allis, 2002). La grande diversité de ces modifications post-traductionnelles (figure 4) et leur association à des processus biologiques spécifiques ont conduit à proposer l'hypothèse d'un langage nommé « le code histone » (Strahl and Allis, 2000). Ce code semble être décrypté par un ensemble de protéines ou complexes protéiques capables d'interpréter des profils de modifications

spécifiques et de restructurer la chromatine en conséquence (Strahl and Allis, 2000 ; Jenuwein and Allis, 2001).

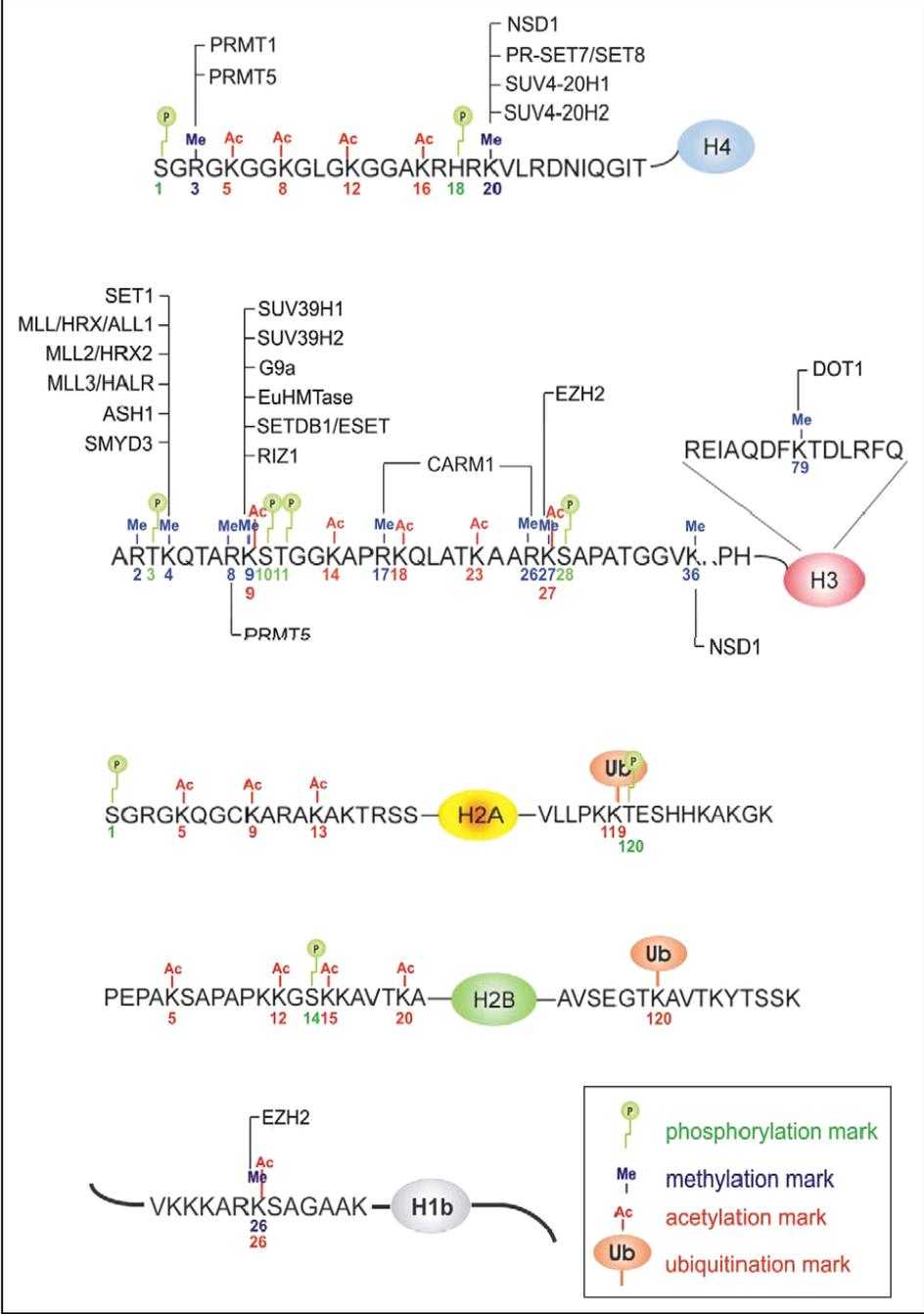


Figure 4. Représentation schématique des modifications post-traductionnelles connues à ce jour sur les queues d’histones (d’après Margueron et al., 2005).

Le positionnement des nucléosomes dépend également des protéines de remodelage de la chromatine. Classiquement ces facteurs agissent en déplaçant le nucléosome le long de l'ADN ou en remodelant la structure du nucléosome afin d'altérer l'interaction histone-ADN et faciliter l'accessibilité de la chromatine à d'autres facteurs. Ces facteurs de remodelage peuvent aussi remplacer certaines histones par un de leurs variants (figure 5).

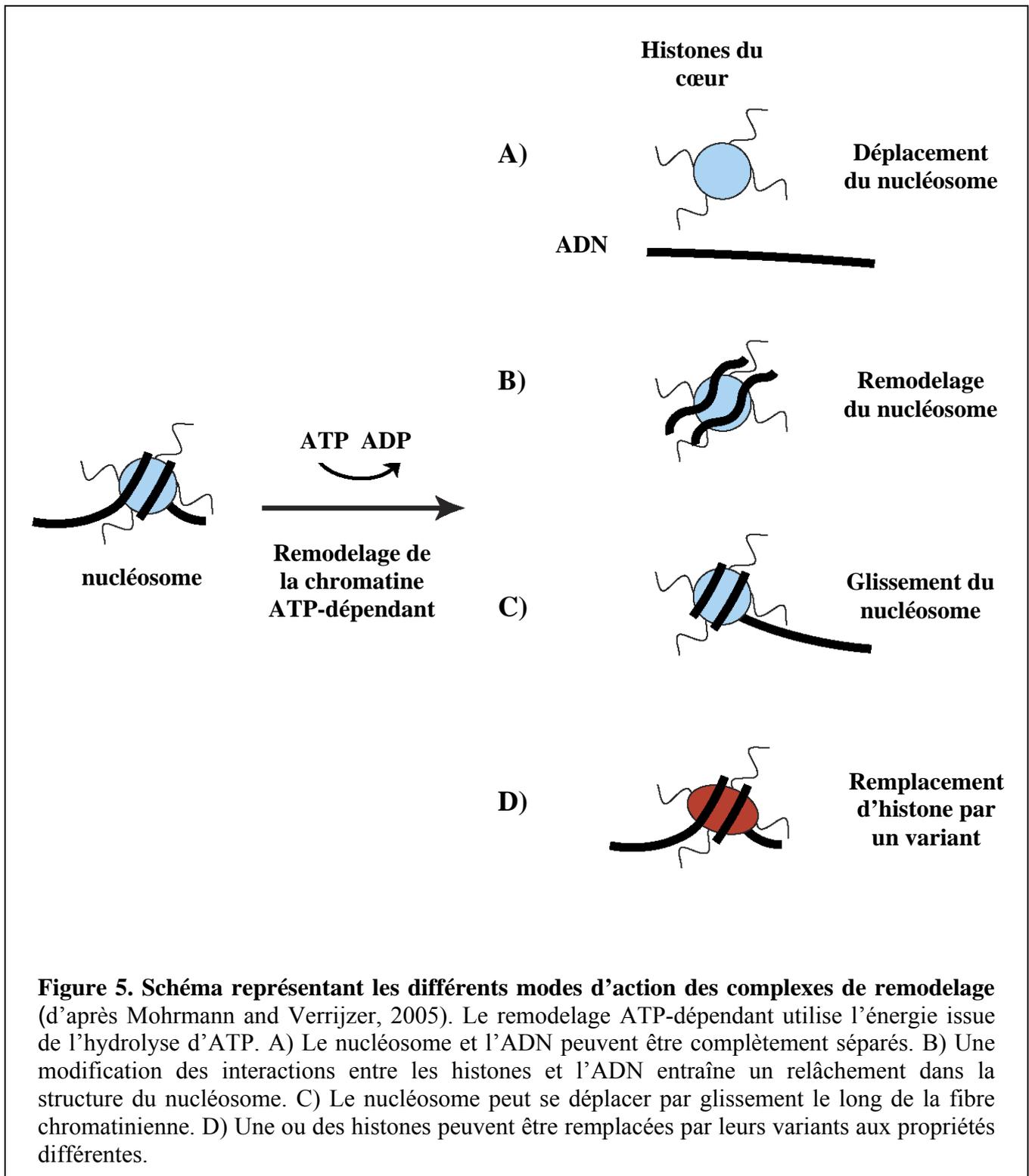


Figure 5. Schéma représentant les différents modes d'action des complexes de remodelage (d'après Mohrmann and Verrijzer, 2005). Le remodelage ATP-dépendant utilise l'énergie issue de l'hydrolyse d'ATP. A) Le nucléosome et l'ADN peuvent être complètement séparés. B) Une modification des interactions entre les histones et l'ADN entraîne un relâchement dans la structure du nucléosome. C) Le nucléosome peut se déplacer par glissement le long de la fibre chromatinienne. D) Une ou des histones peuvent être remplacées par leurs variants aux propriétés différentes.

L'une des composantes essentielles de ces complexes de remodelage est la présence d'une activité ATPasique. Ces complexes sont caractérisés par leurs sous unités apportant cette activité : SWI/SNF (mating-type Switching ; Sucrose Non Fermenting), ISWI (Imitation Switch), CHD (Chromodomain Helicase/ATPase DNA binding protein). Ces complexes possèdent d'autres sous unités protéiques exerçant différents rôles (figure 6). Ces autres sous unités peuvent réguler l'activité des sous unités ATPasiques, être impliquées dans les interactions entre le complexe et les facteurs le recrutant sur la molécule d'ADN, ou bien être impliquées dans la modification des histones. Enfin, d'autres protéines non histones induisent un remodelage de la chromatine indépendamment de l'hydrolyse d'ATP : ce sont notamment les protéines à boîtes HMG (Travers, 2003).

Actuellement les différents acteurs du remodelage de la chromatine commencent à être connus mais nous ne disposons que de très peu d'informations concernant les mécanismes moléculaires du maintien de l'expression des gènes au cours des divisions cellulaires une fois que la décision d'activer ou de réprimer ces gènes ait été prise. Ce point est très important au cours du développement dans la mesure où les signaux moléculaires qui sont à l'origine de l'expression spécifique d'un gène peuvent être transitoires alors que leurs effets doivent perdurer à plus long terme. La régulation des gènes homéotiques de drosophile, que nous allons développer par la suite, constitue un modèle représentatif de ces différents mécanismes.

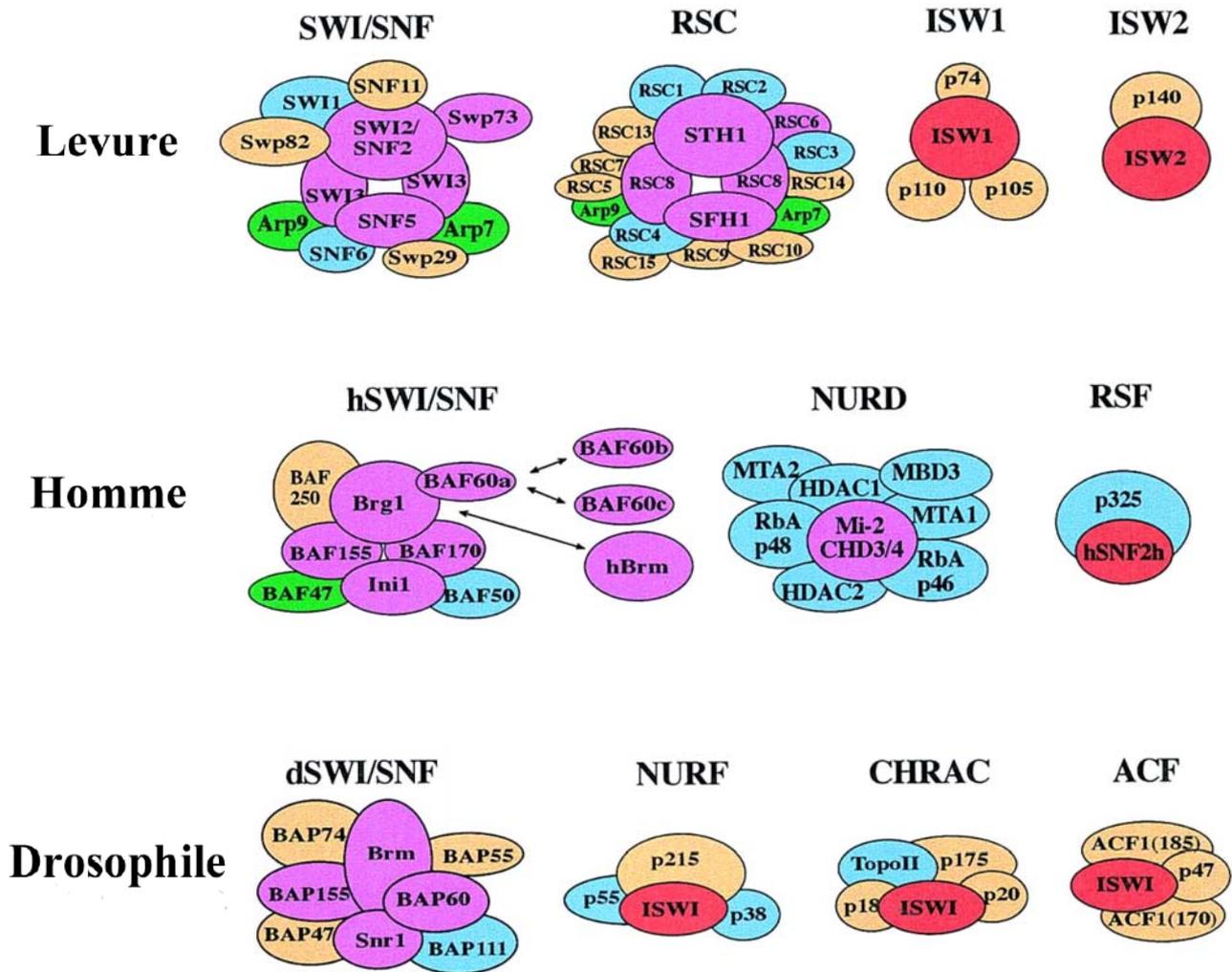


Figure 6. Exemples de complexes ATP-dépendants de remodelage de la chromatine. Les protéines conservées de la famille SWI/SNF et CHD sont en violet, celles de la famille ISWI en rouge, les protéines de séquences connues sont indiquées en bleues, et les protéines apparentées à l'actine en vert. Les stœchiométries des complexes sont hypothétiques. RSC : "Remodel the Structure of Chromatin", NURD : "Nucleosome Remodelling histone Desacetylase complex", RSF : "Remodelling and Spacing Factor", NURF : "Nucleosome Remodelling Factor", CHRAC : "Chromatin-Accessibility Complex", ACF : "ATP-utilizing Chromatin assembly and remodelling Factor" (d'après Kingston and Narlikar, 1999).

II Maintien de l'expression des gènes par les protéines des groupes *Polycomb et Trithorax*

II.1 Rappel sur le développement

Chez l'embryon précoce de drosophile, l'intervention hiérarchique d'un ensemble de gènes permet de diviser le corps en domaines le long de l'axe antero-postérieur (figure 7).

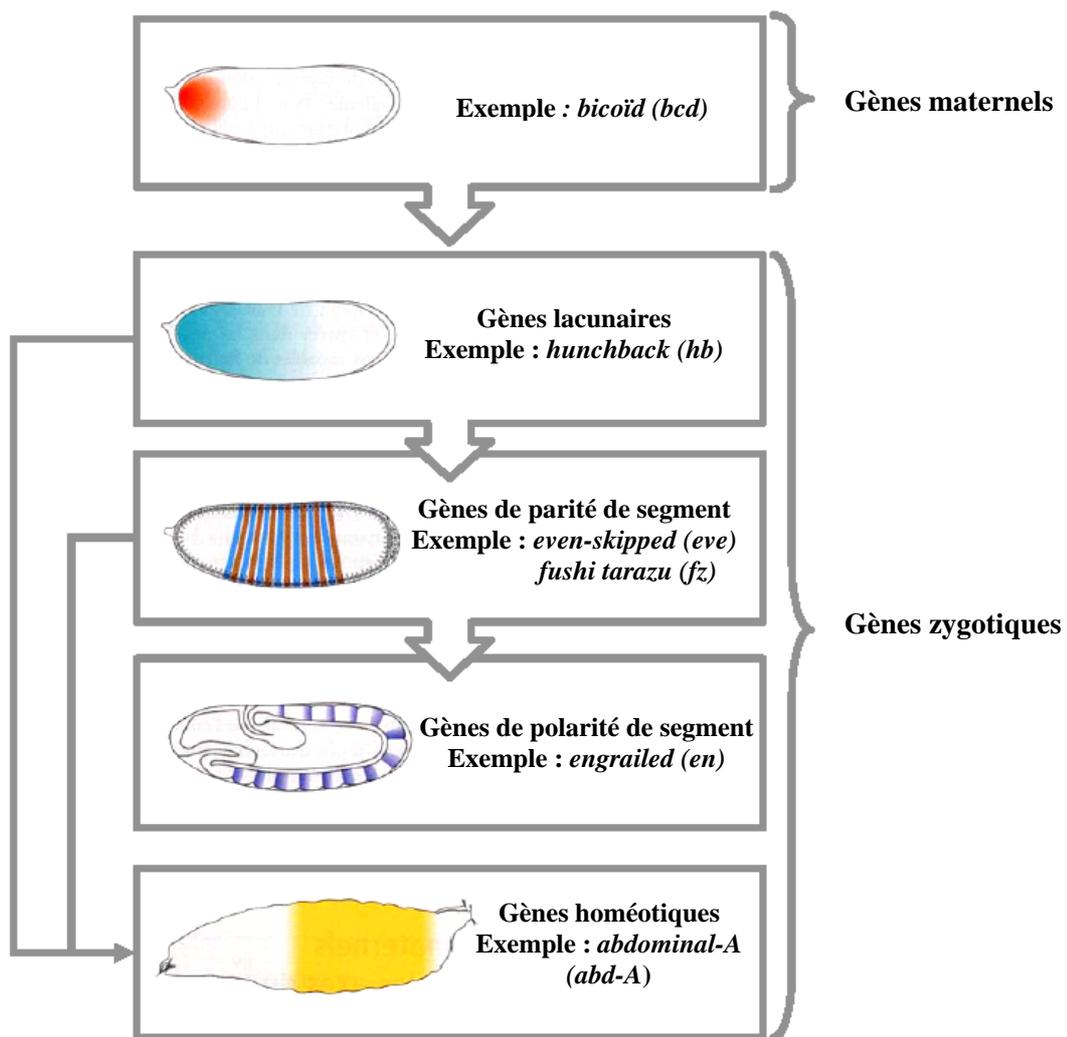


Figure 7. Mise en place du profil d'expression des gènes du développement chez la drosophile. Les produits des gènes à effet maternel activent ou répriment suivant leur concentration l'expression des gènes lacunaires. Les gènes lacunaires sont exprimés selon des profils d'expression bien précis. Les produits de ces gènes sont des facteurs de transcription qui contrôlent l'expression des gènes de parité de segment. Les gènes de parité de segment s'expriment aussi selon des profils bien précis. Chaque domaine de l'embryon possède ainsi une combinaison particulière en produits des gènes lacunaires et de parité de segment. Ces combinaisons sont à l'origine des profils d'expression particuliers des gènes de polarité segmentaire ainsi que ceux des gènes homéotiques. (D'après Wolpert et al., 1998).

Cette hiérarchie débute par l'intervention coordonnée des produits de gènes d'origine maternelle : *bicoid* (*bcd*), *nanos*, *hunchback* (*hb*) et *caudal* (*cad*). Les produits de ces gènes sont des facteurs de transcription qui régulent l'expression des gènes zygotiques pour poursuivre le développement embryonnaire. Différentes classes de gènes zygotiques interviennent successivement pour affiner la régionalisation initiée par les produits des gènes maternels. Ces gènes zygotiques sont dits de segmentation car leurs effets combinés engendrent la compartimentation de l'embryon en 14 segments.

Les premiers gènes de segmentation activés par les gènes maternels sont les gènes lacunaires (Gap genes). Cette dénomination provient du fait que la mutation d'un de ces gènes provoque une lacune importante dans la morphologie de l'embryon, due à la disparition de segments contigus. Les protéines HB et CAD d'origine zygotique sont présentes dans les mêmes régions que les protéines d'origine maternelle et reforment des gradients opposés de facteurs de transcription. On peut citer trois autres gènes lacunaires exprimés dans la zone centrale de l'embryon: *giant* (*gt*), *Krüppel* (*Kr*) et *knirps* (*kni*). Chacun d'eux est activé ou réprimé par une (ou des) concentration(s) différente(s) de HB en combinaison avec l'action des produits des gènes d'origine maternelle. Ces gènes lacunaires sont exprimés sous la forme d'un ou deux larges domaines d'expression le long de l'axe antéro-postérieur. Ces gènes vont mutuellement influencer leur expression. Ils délimitent ainsi des frontières entre leur domaine d'expression respectif, ce qui détermine les grandes régions du corps.

De la même manière, cette compartimentation de l'embryon par les gènes lacunaires guide l'expression des gènes de parité de segment (Pair-Rule genes). Chaque gène de parité de segment est exprimé sous la forme de 7 bandes transversales le long de l'embryon avant la cellularisation. On voit apparaître dans l'embryon des structures périodiques. Ces entités génétiques sont nommées parasegments. On peut citer comme exemple de gène de parité de segment *even-skipped* (*eve*) dont l'expression définit les parasegments impairs. Inversement le gène *fushi tarazu* (*ftz*) définit les parasegments pairs. L'embryon est alors divisé en 14 parasegments. Notons que chaque bande d'expression est mise en place de manière indépendante en réponse aux différentes concentrations et combinaisons des facteurs de transcription produits par les gènes lacunaires. Ceci implique un système complexe de régulation. A leur tour, les gènes de parité de segment qui codent des facteurs de transcription régulent l'expression des gènes de polarité de segment.

Ces gènes de polarité de segment (Segment Polarity genes) stabilisent les frontières des parasegments et permettent d'établir un plan d'organisation selon des segments qui contrairement aux parasegments ne sont plus des entités génétiques mais des entités physiques. On cite comme exemple les gènes *engrailed* (*en*), *wingless* (*wg*) ou bien *hedgehog* (*hh*). Les mutations de ces gènes entraînent généralement des perturbations de la polarité antéro-postérieure des segments.

Les gènes homéotiques (Hox genes) dont le profil d'expression est établi en fin de cascade codent des facteurs de transcription à homéodomains qui sont responsables de l'identité segmentaire. Une mauvaise expression de ces gènes entraîne une modification de l'identité d'un ou plusieurs segments sans en changer le nombre total : ce sont les transformations homéotiques (Lewis, 1978). Chez la drosophile, les gènes homéotiques s'organisent en deux complexes *Antennapedia* (*AntpC*) et *Bithorax* (*BxC*) (McGinnis and Krumlauf, 1992) qui s'étendent sur plus de 300 kb chacun. Chaque gène homéotique s'exprime dans une région précise de l'embryon selon la règle de colinéarité (Duboule and Morata, 1994). Cela signifie que l'expression de ces gènes le long de l'axe antéro-postérieur suit leur position le long du chromosome. En général, une perte de fonction d'un gène homéotique entraîne l'antériorisation des segments. Inversement un gain de fonction entraîne la postériorisation des segments (Botas et al., 1993). Le complexe *BxC* (figure 8) est constitué de trois gènes : *Ultrabithorax* (*Ubx*), *abdominal-A* (*abd-A*) et *Abdominal-B* (*Abd-B*). Leurs séquences régulatrices se subdivisent en 9 régions successives autonomes : *abx/bx*, *bxl/pbx* et *iab-2* à *iab-8*. Chacune d'entre elles définit l'identité d'un parasegment en activant spécifiquement l'un des gènes homéotiques. Par exemple *iab-5* régule l'expression d'*Abd-B* dans le parasegment 10. De même *iab-6*, *iab-7* et *iab-8* régulent respectivement l'expression d'*Abd-B* dans les parasegments 11, 12 et 13. (Boulet et al., 1991 ; Celniker et al., 1990 ; Sanchez Herrero, 1991).

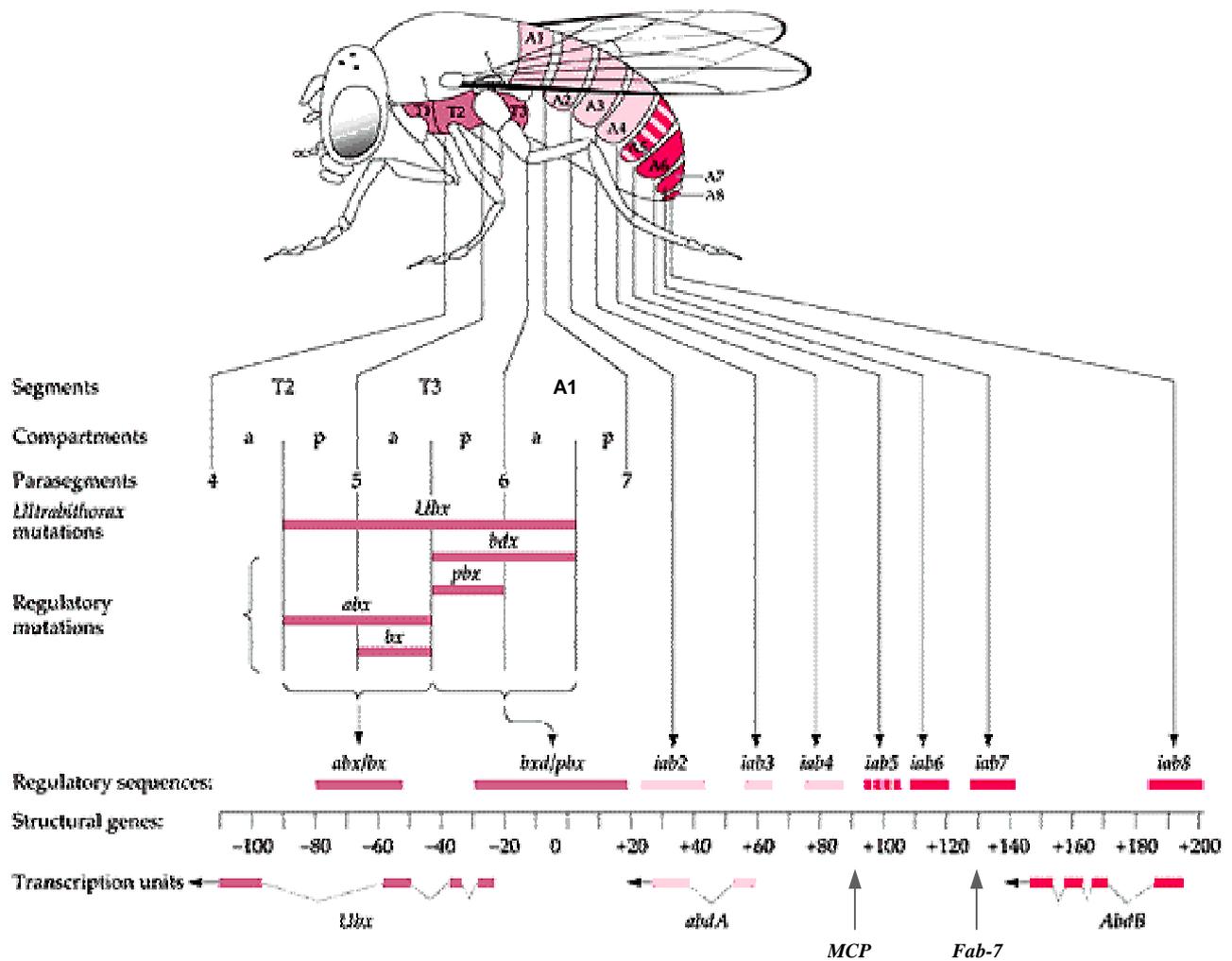


Figure 8. Organisation du complexe *Bithorax* (*BxC*). Sous le dessin de la drosophile sont indiquées les régions de contrôle du gène *Ultrabithorax* (*Ubx*). La ligne continue du bas représente les 300 kb du complexe. Les trois unités de transcription qui codent pour les trois protéines homéotiques du complexe *Bithorax* sont représentées en-dessous. Les exons sont représentés par les rectangles et les introns par les lignes pointillées. De part et d'autre de la ligne, on trouve les séquences régulatrices mises en évidence par des mutations génétiques. Abréviations : *abx* (*anterobithorax*), *bx* (*bithorax*), *bxd* (*bithoraxoïd*), *pbx* (*postbithorax*), *iab* (*infra-abdominal*), *MCP* (*Miscadastral Pigmentation*), *Fab-7* (*Fronta-abdominal-7*), *abd-A* (*abdominal-A*) et *Abd-B* (*Abdominal-B*). (D'après Gilbert, 1996).

Le complexe *AntpC* (Figure 9) est quant à lui composé de 5 gènes homéotiques : *labial (lb)*, *proboscipedia (pb)*, *Deformed (Dfd)*, *Sex combs reduced (Scr)* et *Antennapedia (Antp)*. Cependant d'autres gènes tels que *bcd* ou bien *ftz* font partie du complexe et sont localisés au niveau des séquences régulatrices des gènes homéotiques. Cette organisation particulière du complexe *AntpC* suggère que les mécanismes de régulation y sont compliqués et explique pourquoi peu d'études ont été réalisées à ce sujet. Quelques domaines de régulation ont toutefois pu être identifiés (figure 9). Par exemple les domaines *Scr8,5BamHI/EcoRI* et *Scr3,7HindIII* activent l'expression de *Scr* dans les parasegments 2 et 3 alors que le domaine *Scr7EcoRI* ne l'active que dans le parasegment 2 (Gindhart et al., 1995). Le région régulatrice AE1 qui est intercalée entre ces trois domaines contrôle l'expression du gène *ftz*.

Au début de l'embryogenèse, le profil d'expression des gènes homéotiques est contrôlé par les protéines codées par les gènes lacunaires et les gènes de parité de segment dont l'expression disparaît en quelques heures. Quoi qu'il en soit, les profils d'expression des gènes homéotiques ne changent pas au cours du développement. Il existe donc un mécanisme permettant de maintenir l'expression de ces gènes. Ce mécanisme capable de mémoriser et de reproduire l'état transcriptionnel des gènes au cours des divisions cellulaires repose en partie sur l'intervention des gènes des groupes *Polycomb (PcG)* et *trithorax (trxG)*. Les protéines PcG sont nécessaires au maintien de la répression tandis que les TrxG maintiennent l'activation des gènes. Ces gènes ont une expression ubiquitaire et codent des facteurs nucléaires qui agissent au sein de complexes multiprotéiques conservés au cours de l'évolution (Otte and Kwaks, 2003). Ces protéines interagissent directement avec la chromatine afin de réguler l'expression de leurs gènes cibles. Chez la drosophile, ces protéines n'exercent pas leur activité au hasard sur la fibre chromatinienne mais sont au contraire recrutées sur des régions d'ADN bien particulières nommées Polycomb Response Element ou Trithorax Response Element (PRE/TRE).

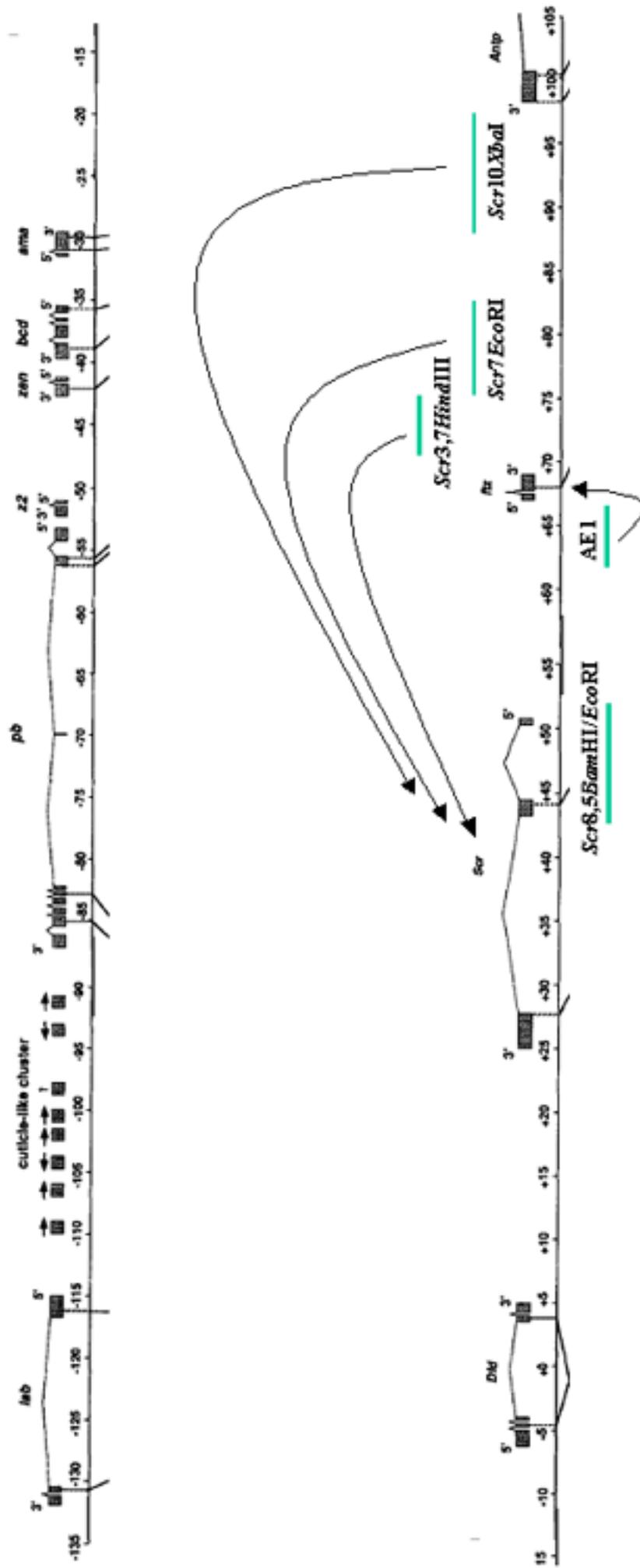


Figure 9. Organisation du complexe *Antennapedia* (*Antp*). Carte moléculaire des 300 kb du complexe *Antp*. Les exons sont représentés par les rectangles noirs et les introns par les lignes. Les traits verts indiquent de manière non exhaustive les domaines de régulation connus. Les flèches montrent les gènes dont l'expression est régulée par les domaines de régulation connus. Abréviations : *lb* (*labial*), *pb* (*proboscipedia*), *Dfd* (*Deformed*), *Scr* (*Sex combs reduced*), *Antp* (*Antennapedia*), *bcd* (*bicoid*), *ama* (*amalgam*), *ftz* (*fushi tarazu*).

II.2 Protéines des groupes *Polycomb* et *Trithorax*

II.2.1 Identification des gènes des groupes *Polycomb* et *trithorax*

Les premières mutations des gènes du groupe *PcG* : *extra sex combs* (*esc*) et *Polycomb* (*Pc*) et ont été identifiées chez la drosophile dans les années 40 par E.H. Slifer et P. Lewis (Lewis, 1947 ; Slifer, 1942). Chez les drosophiles sauvages, seul le mâle possède des peignes sexuels localisés sur le premier article du tarse de la première paire de pattes (pattes prothoraciques : T1). Comme leur nom le suggère, les mutations *esc* et *Pc* entraînent l'apparition de peignes sexuels supplémentaires sur la seconde et la troisième paire de pattes du mâle (T2, T3). Par la suite, d'autres études ont permis d'isoler des mutations dominantes ou récessives induisant un phénotype similaire (Jurgens, 1985 ; Paro, 1990). L'ensemble des gènes mutés en dehors des complexes *AntpC* ou *BxC* et présentant un phénotype similaire aux mutants *esc* et *Pc* constitue le groupe des *Polycomb* (*PcG*). Aujourd'hui, une vingtaine de gènes du groupe *PcG* ont été identifiés (tableau 1).

Les mutants perte de fonction des gènes *PcG* présentent d'autres phénotypes que l'apparition de peignes sexuels supplémentaires sur la seconde et la troisième paire de pattes du mâle. Le mutant *Pc* présente un phénotype larvaire extrême où tous les segments se transforment en dernier segment abdominal A8 (Lewis, 1978). Ce phénotype est caractéristique des mutants gain de fonction des gènes homéotiques. Edward Lewis a alors proposé un modèle où les protéines *PcG* répriment l'expression des gènes homéotiques. Cette idée a ensuite été confirmée par des études moléculaires montrant une expression ectopique des gènes homéotiques chez des mutants perte de fonction *PcG* (McKeon and Brock, 1991 ; Simon et al., 1992 ; Struhl and Akam, 1985). Les protéines du groupe *PcG* n'ont pas d'effet sur le profil d'expression initial des gènes homéotiques mais affectent ce profil plus tardivement au cours de l'embryogenèse (McKeon and Brock, 1991 ; Simon et al., 1992 ; Struhl and Akam, 1985). Il a été proposé que les produits des gènes *PcG* n'induisent pas mais maintiennent l'expression des gènes homéotiques au cours du développement. Comme nous l'avons vu précédemment, ce sont les gènes de segmentation qui sont à l'origine de leur expression.

Tableau 1. Les gènes du groupe *Polycomb*. Cette liste non exhaustive regroupe des gènes du groupe *Polycomb* identifiés chez la drosophile. Les gènes soulignés et en rouge sont des *ETP*.

Gènes (drosophile)	Protéines	Domaines protéiques
<u><i>Asx</i></u>	<u>Additional sex combs (ASX)</u>	Doigt PHD (Jurgens, 1985)
<u><i>Crn</i></u>	<u>Cramped (CRM)</u>	Domaine PEST (Yamamoto et al., 1997)
<i>dMi-2</i>	dMi-2	Chromodomaine et domaine ATPase (Kehle et al., 1998)
<u><i>corto</i></u>	<u>Corto</u>	Chromodomaine (Kodjabachian et al., 1998)
<u><i>E(Pc)</i></u>	<u>Enhancer of Polycomb (E(PC))</u>	Domaine leucine zipper (Sato et al., 1984)
<u><i>E(z)</i></u>	<u>Enhancer of Zeste (E(Z))</u>	Domaine SET (Jones and Gelbart, 1990)
<i>esc</i>	Extra sex combs (ESC)	Répétitions WD40 (Struhl, 1981)
<u><i>lola</i></u>	<u>Lola-like/Batman (LOLAL/Ban)</u>	BTB/POZ (Faucheux et al., 2003)
<i>mx</i>	Multi sex combs	(Santamaria and Randshold, 1995)
<u><i>pho</i></u>	<u>Pleiohomeotic (PHO)</u>	Doigt de zinc (Simon et al., 1992)
<i>Pc</i>	Polycomb (PC)	Chromodomaine (Lewis, 1978)
<i>Pcl</i>	Polycomb-like (PCL)	Doigt PHD et doigt RING (Duncan, 1982)
<i>ph</i> <i>ph-p</i> <i>ph-d</i>	Polyhomeotic (PH) polyhomeotic proximal polyhomeotic distal	Doigt de zinc et domaine SAM (Dura et al., 1985)
<u><i>Psc</i></u>	<u>Posterior sex combs (PSC)</u>	Doigt RING (Jurgens, 1985)
<u><i>Scm</i></u>	<u>Sex combs on midleg (SCM)</u>	Doigt de zinc et domaine SAM (Jurgens, 1985)
<i>Sce</i>	Sex combs extra (SCE/dRING)	(Breen and Duncan, 1986)
<u><i>Su(z)2</i></u>	<u>Suppressor of Zeste 2 (Su(Z)2)</u>	Doigt RING (Adler et al., 1989)
<i>Su(Z)12</i>	Suppressor of Zeste 12 (Su(Z)12)	--

Ce n'est que plus tard au cours des années 80 que des gènes appartenant au groupe *trithorax* (*trxG*) ont été identifiés selon différents critères (Adamson and Shearn, 1996). A l'heure actuelle, une vingtaine de ces gènes sont connus (tableau 2). Les critères d'identification sont les suivants :

- Les mutants perte de fonction *trxG* montrent des transformations homéotiques caractéristiques de celles observées chez les mutants perte de fonction des gènes homéotiques. C'est le cas par exemple du gène *trithorax* (*trx*) qui est à l'origine du groupe. Des individus homozygotes pour un allèle perte de fonction du gène *trx* montrent des transformations des segments thoraciques T1 et T3 en segment thoracique T2 ainsi qu'une transformation de tous les segments abdominaux en segments plus antérieurs (Ingham and Whittle, 1980). Cela correspond à la diminution de l'expression du gène *Antp* et des gènes du complexe *BxC*.

- Les mutants *trxG* sont des antagonistes des mutants *PcG*. Par exemple, un allèle perte de fonction *trxG* corrige l'apparition de peignes sexuels supplémentaires due à une mutation perte de fonction du gène *Pc* chez des mâles hétérozygotes.

- Les individus doubles hétérozygotes pour des mutations *trxG* montrent des transformations homéotiques aggravées par rapport aux mutants simples. Ceci montre que les *TrxG* agissent de façon synergique. Par exemple, si on combine une mutation *trx* avec une mutation *brahma* (*brm*), on observe une transformation du segment abdominal A5 en segment plus antérieur ainsi qu'une transformation de l'haltère en aile. Ces transformations n'apparaissent pas chez les mutants simples (Tamkun et al., 1992).

- Enfin, les mutations perte de fonction *trxG* réduisent l'expression des gènes homéotiques.

Tableau 2. Les gènes du groupe *trithorax*. Cette liste non exhaustive regroupe des gènes du groupe *trithorax* identifiés chez la drosophile. Les gènes soulignés et en rouge sont des *ETP*.

Gènes (drosophile)	Protéines	Domaines protéiques
<i>ash1</i>	Absent, small or homeotic disc 1 (ASH1)	Doigt PHD et domaine SET (Shearn, 1989)
<i>ash2</i>	Absent, small or homeotic disc 2 (ASH2)	Doigt PHD (Shearn, 1989)
<i>brm</i>	Brahma (BRM)	Bromodomaine, domaine ATPase et domaine BRK (Kennison and Tamkun, 1988)
<i>dev/btl</i>	Devenir/Breathless (Dev/Btl)	(Maixner et al., 1998)
<i>kto</i>	Kothalo	(Treisman, 2001)
<i>kis</i>	Kismet (KIS)	Chromodomaine, domaine ATPase et domaine BRK (Daubresse et al., 1999)
<i>lid</i>	Little imaginal discs (LID)	Doigt RING, doigt PHD, domaine ARID (Gildea et al., 2000)
<i>mor</i>	Moira (MOR)	Domaine SANT et leucine zipper (Kennison and Tamkun, 1988)
<i>mod(mdg4)</i>	mod(mdg4)	Domaine BTB/POZ (Georgiev and Gerasimova, 1989)
<i>osa</i>	Osa (OSA)	Domaine ARID (Vasquez et al., 1999)
<i>snr1</i>	Snf5 related protein 1 (SNR1)	(Dingwall et al., 1995)
<i>tara</i>	Taranis	Domaine SERTA (Calgaro et al., 2002)
<i>tna</i>	Tonalli	Doigt RING, doigt de zinc (Gutierrez et al., 2003)
<i>trx</i>	Trithorax (TRX)	Domaine SET (Ingham, 1985)
<u><i>Trl (Trithorax-like)</i></u>	<u>GAGA Factor (GAF)</u>	Domaine BTB/POZ (Farkas et al., 1994)
<u><i>Z</i></u>	<u>Zeste (Z)</u>	(Shannon et al., 1972)

II.2.2 Activateurs des Polycomb et Trithorax

Classiquement, l'antagonisme des gènes *PcG* et *trxG* était testé génétiquement par la recherche de suppressions de phénotypes mutants *PcG* par des mutations dans les gènes *trxG*. Au cours d'un crible inverse visant à isoler des activateurs et des supprimeurs d'une mutation perte de fonction du gène *trxG*, *ash1* (*absent small or homeotic discs 1*), Gildea et ses collaborateurs ont mis en évidence l'existence d'une classe de gènes dont les produits agissent à la fois en tant que *PcG* et *TrxG* (Gildea et al., 2000). De manière surprenante, plusieurs gènes initialement classés comme des *PcG* aggravent le phénotype du mutant *ash1*. Ce sont les gènes *Asx* (*Additional sex combs*), *Scm* (*Sex combs on midleg*), *E(Pc)* (*Enhancer of Polycomb*), *Psc* (*Posterior sex combs*) et *Su(Z)2* (*Suppressor of Zeste 2*). Dès lors, Gildea et ses collaborateurs ont proposé une nouvelle définition génétique des *PcG* (Gildea et al., 2000). Ainsi, seuls les gènes dont la perte de fonction augmente le phénotype d'un mutant pour le gène *Pc* et supprime le phénotype d'un mutant *trxG* appartiennent au groupe *PcG*. Les auteurs proposent également la création d'une nouvelle classe de gènes nommés *Activateurs des Polycomb et Trithorax* ou *Enhancers of Polycomb and Trithorax* (*ETP*).

D'autres protéines ont été identifiées depuis comme des *ETP*. Par exemple *GAF* (*GAGA Factor*), isolée précédemment comme une protéine *TrxG* (Farkas et al., 1994), a sur les chromosomes des sites de fixation communs avec *PC* (Strutt et al., 1997) et participe au recrutement des *PcG* (Busturia et al., 2001 ; Mishra et al., 2001 ; Mishra et al., 2003 ; Poux et al., 2001b). La protéine *Z* (*Zeste*) a initialement été identifiée comme une *TrxG*. Cependant, elle participe à la répression du gène *Ubx* (Dejardin and Cavalli, 2004). La protéine *PHO* (*Pleiohomeotic*) a quant à elle été initialement classée parmi les *PcG* (Brown et al., 1998 ; Fritsh et al., 1999 ; Girton and Jeon, 1994) mais interagit avec les *TrxG* (Mohd-Sarip et al., 2002). La protéine *Ban* ou *LOLAL* (*Batman* ou *Lola-like*) interagit avec *GAF* et participe au recrutement des complexes *PcG* (Mishra et al., 2003). Cela dit, un mutant *ban* augmente les phénotypes mutants *PcG* mais aussi ceux des mutants *trxG* (Faucheaux et al., 2003). Les *ETP* sont indiqués dans les tableaux 1 et 2 selon leur classement initial.

II.2.3 Caractérisation des protéines des groupes Polycomb et Trithorax

Les protéines PcG et TrxG ont une localisation nucléaire et se trouvent plus généralement situées au niveau de la chromatine (Kuzin et al., 1994 ; Zink and Paro, 1989 ; Zink et al., 1991). Afin de comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels ces protéines maintiennent l'expression des gènes homéotiques, leurs gènes ont été clonés et séquencés. Plusieurs des protéines PcG et TrxG possèdent des domaines conservés (tableaux 1 et 2) aux fonctions variées. Par exemple, ces domaines assurent des interactions protéine-protéine, des modifications chimiques des histones ou même l'hydrolyse d'ATP.

L'un des premiers gènes à avoir été cloné est *Pc*. La protéine PC possède un domaine appelé chromodomaine (Chromatin Modifier Organisation) identique à 58% au domaine de la protéine hétérochromatinienne de drosophile HP1 (Heterochromatin Protein 1) (Paro and Hogness, 1991). HP1 est une petite protéine très conservée. Elle est impliquée dans l'hétérochromatinisation, la répression transcriptionnelle (Singh and Georgatos, 2002) et active le phénomène de PEV. Dans le cas de PC, il a été montré que le chromodomaine est responsable de sa localisation chromosomique (Platero et al., 1995). En effet, lorsque le chromodomaine de HP1 est remplacé par celui de PC, HP1 est localisée sur les sites de fixation de PC. Cependant, le chromodomaine n'interagit pas avec l'ADN. Le recrutement de PC nécessite donc l'intervention d'autres facteurs. L'existence d'un domaine homologue entre la protéine HP1 et PC a conduit R. Paro et ses collaborateurs à proposer une parenté fonctionnelle entre les phénomènes de PEV et l'inactivation des gènes homéotiques par les produits des gènes *PcG*. Des approches génétiques ont étayé cette idée puisque la présence de séquences cibles des protéines PcG à proximité du gène *white*⁺ peut entraîner une perturbation de l'expression de ce gène analogue à celle observée lors du PEV. Il existe des données génétiques et physiologiques montrant que l'effet de variévation obtenu avec des séquences cibles des produits du groupe PcG n'est pas dû à l'influence des blocs d'hétérochromatine adjacents. On interprète ici l'effet mosaïque comme résultant de la présence des PcG qui inactivent la transcription. L'analogie phénotypique qui existe entre l'inactivation en mosaïque dépendante des protéines PcG et celle dépendante de l'hétérochromatine suggère que l'extinction des gènes ciblés par les protéines PcG, notamment ceux regroupés dans les complexes homéotiques, fait intervenir un compactage chromatinien local semblable à celui de l'hétérochromatine.

Plusieurs des protéines PcG et TrxG ont des domaines de modification des histones. Par exemple TRX, E(Z) (Enhancer of Zeste) et ASH1 possèdent un domaine particulier nommé SET avec une activité Histone Méthyl Transférase (HMT). Ce domaine est présent chez la protéine de drosophile SU(VAR)3-9 (Suppressor of Variegation) d'où son nom de domaine SET (SU(VAR)3-9, Enhancer of zeste et Trithorax) (Rea et al., 2000). SU(VAR)3-9 est une protéine impliquée dans l'hétérochromatinisation et la répression transcriptionnelle (Aagaard et al., 1999). TRX méthyle la lysine 4 de l'histone H3 (Nagy et al., 2002 ; Roguev et al., 2001), ASH1 méthyle les lysines 3, 4 et 9 de H3 (Beisel et al., 2002 ; Byrd and Shearn, 2003), enfin E(Z) méthyle la lysine 27 de H3 (Cao et al., 2002 ; Czermin et al., 2002 ; Muller et al., 2002). D'un point de vue transcriptionnel, la méthylation des résidus lysines peut avoir deux effets opposés, activateur ou répresseur, déterminés par la position du résidu affecté. Les protéines PcG et TrxG présentent également des activités ATPases nécessaires aux complexes de remodelage de la chromatine. Par exemple, la protéine PcG dMi-2 est une ATPase du type CHD (Kehle et al., 1998). La protéine TrxG Brahma (BRM) (Tamkun et al., 1992) est quant à elle une ATPase du type SWI2/SNF2.

II.3 Complexes des groupes Polycomb et Trithorax

II.3.1 Complexes du groupe Polycomb

L'aggravation du phénotype chez un double mutant perte de fonction *PcG* par rapport à un mutant simple montre l'action synergique des protéines PcG (Jurgens, 1985). De plus, certaines d'entre elles ont des sites de fixation communs sur les chromosomes géants des glandes salivaires. Tout ceci suggère que ces protéines forment et agissent au sein de complexes multiprotéiques. A l'heure actuelle, 2 complexes PcG principaux ont été décrits : ESC-E(Z) et PRC1. Seules 7 protéines PcG apparaissent comme des composants permanents de ces 2 complexes. Cela suggère que ces complexes ont des compositions variables. Cette idée est étayée par le fait que les mutants *PcG* ont des phénotypes globalement semblables mais présentent malgré tout des différences. Par exemple, on retrouve chez des embryons mutants pour *Asx* et d'autres *PcG*, une dérégulation des gènes *Ubx*, *abd-A* et *Abd-B* au niveau des cellules épidermiques et du mésoderme viscéral. Cette dérégulation existe également au niveau du système nerveux central du mutant *Asx*. Il existe d'autres arguments en faveur de

l'existence des complexes à composition variable. Par exemple, bien que PC, PH, et PSC sont associées au niveau des mêmes éléments régulateurs du gène de polarité de segment *en*, elles n'ont pas la même distribution sur les séquences régulatrices du gène paralogue de drosophile *invested* (Strutt and Paro, 1997).

II.3.1.1 Complexe ESC-E(Z)

ESC-E(Z) (ou Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2)) est un complexe de 600 kDa (Ng et al., 2000 ; Tie et al., 2001) composé des protéines ESC, E(Z), SU(Z)12 (Suppressor of Zeste 12) (Czermin et al., 2002 ; Muller et al., 2002). Ce complexe contient une protéine HDAC (Histone Désacétylase) nommée HDAC1 ainsi qu'une protéine de 55 kDa : P55. La protéine P55 est également trouvée dans les complexes de remodelage de la chromatine ACF (ATP-utilizing Chromatin assembly and remodeling Factor) et NURF (Nucleosome Remodeling Factor) de la drosophile (pour revue voir Becker and Horz, 2002). L'association de ces protéines suggère que la répression de la transcription par les complexes de type ESC-E(Z) fait intervenir une activité HDAC (Kuzmichev et al., 2002 ; Tie et al., 2001). La présence d'un domaine SET chez E(Z) suggère un rôle du complexe ESC-E(Z) dans la méthylation des histones. En effet, il a été montré que ESC-E(Z) méthyle les lysines 9 et 27 des histones H3 (Cao et al., 2002 ; Czermin et al., 2002 ; Kuzmichev et al., 2002 ; Muller et al., 2002). Le complexe ESC-E(Z) semble exister sous plusieurs formes puisqu'un plus grand complexe de 1MDa et contenant la protéine Polycomb Like (PCL) a été purifié (Tie et al., 2003). ESC-E(Z) a une composition dynamique au cours du développement puisque la protéine ESC n'est présente qu'au cours de l'embryogenèse. Ceci montre que ce complexe intervient précocement dans la maintien de la répression des gènes puis évolue dans sa composition ou bien disparaît pour être remplacé par un autre complexe.

II.3.1.2 Complexe PRC1

Le complexe « Polycomb Repressive Complex 1 » (PRC1) a une taille de 1 à 2 MDa (Satijn and Otte, 1999 ; Shao et al., 1999). Une trentaine de partenaires ont été co-purifiés à partir d'extraits embryonnaires de drosophile (tableau 3) (Saurin et al., 2001). Toutefois,

seules les protéines PC, PH, Posterior Sex Combs (PSC) et dRING/Sex Comb Extra (SCM) constituent le cœur fonctionnel du complexe (Francis et al., 2001).

Tableau 3. Composition du complexe PRC1 de drosophile (d'après Saurin et al., 2001).

Protéines du complexe PRC1
PSC
PH
PC
dRING1
Zeste
HSC4
dTAFII250
dTAFII110
dTAFII85
dTAFII62
dTAFII42
dTAFII30 β
SMRTER
dMi-2
dSin3A
HDAC1
p55
dSbf1
DRE4/dSPT16
p90
HSC3
Modulo
Reptin
dTopoII
p110
Tubulin
Actin
Ribosome RS2
Ribosome RL10

Parmi les autres protéines, on peut citer le facteur de transcription séquence spécifique Zeste. La protéine Z est un facteur initialement classé parmi les protéines TrxG pour ses capacités à activer *in vivo* l'expression du gène *Ubx* (Laney and Biggin, 1992). Malgré tout Z co-localise avec certaines protéines PcG sur des sites réprimés par ces mêmes protéines (Rastelli et al., 1993). Zeste pourrait participer au ciblage du complexe PRC1 sur l'ADN. Son rôle en tant que recruteur sera discuté plus tard au cours de cette introduction.

Les protéines TAF (TATA binding Protein Associated Factor) ont été identifiées initialement comme des sous unités du facteur de transcription TFIID mais sont aussi présentes dans des complexes ayant une activité HAT (Histone Acétyl Transférase) (Albright and Tjian, 2000). Plusieurs des ces TAF appartiennent au complexe PRC1 (Saurin et al., 2001). Les protéines PC et PH co-localisent avec des facteurs généraux de la transcription comme la TBP (TATA binding Protein) sur les promoteurs des gènes homéotiques, dans des cellules de drosophile en culture (Breiling et al., 2001). Cette association au niveau des promoteurs avec des facteurs généraux de la transcription est certainement un élément important du mécanisme de la répression de la transcription par les protéines PcG, mais l'effet exact de cette interaction reste à élucider.

Les premières activités du complexe PRC1 ont été mises en évidence *in vitro* en utilisant un complexe marqué par un épitope (Shao et al., 1999). Il a ainsi été montré que PRC1 inhibe le remodelage de la chromatine par le complexe humain SWI/SNF, qui est un complexe contenant des homologues des protéines TrxG. On notera que l'inhibition nécessite une pré-incubation du complexe PRC1 avec l'échantillon d'ADN alors que le remodelage n'est en aucun cas perturbé si les deux complexes PRC1 et SWI/SNF sont ajoutés tous les deux en même temps à l'ADN. Ceci montre que PRC1 n'inactive pas directement le complexe SWI/SNF mais agit directement sur l'ADN. Il est donc proposé que le blocage du complexe de remodelage SWI/SNF est dû à une diminution de l'accessibilité de l'ADN. Des études par microscopie électronique montrent effectivement que les composants du cœur PRC1 induisent *in vitro* la condensation de la chromatine (figure 10) (Francis et al., 2004). Des manipulations *in vivo* ont également montré que l'ADN codant les gènes homéotiques et qui sont sous l'effet répresseur des protéines PcG, se présente sous la forme d'une chromatine condensée et de ce fait peu accessible (Fitzgerald and Bender, 2001). Il semble que la condensation de la chromatine nécessite particulièrement l'intervention de PSC (Francis et al., 2004). Cette baisse de l'accessibilité du complexe SWI/SNF à l'ADN et la préservation de

l'accès d'enzymes de restriction à ces mêmes séquences montrent que le complexe PRC1 ne bloque pas totalement l'accès à l'ADN (Francis et al., 2001).

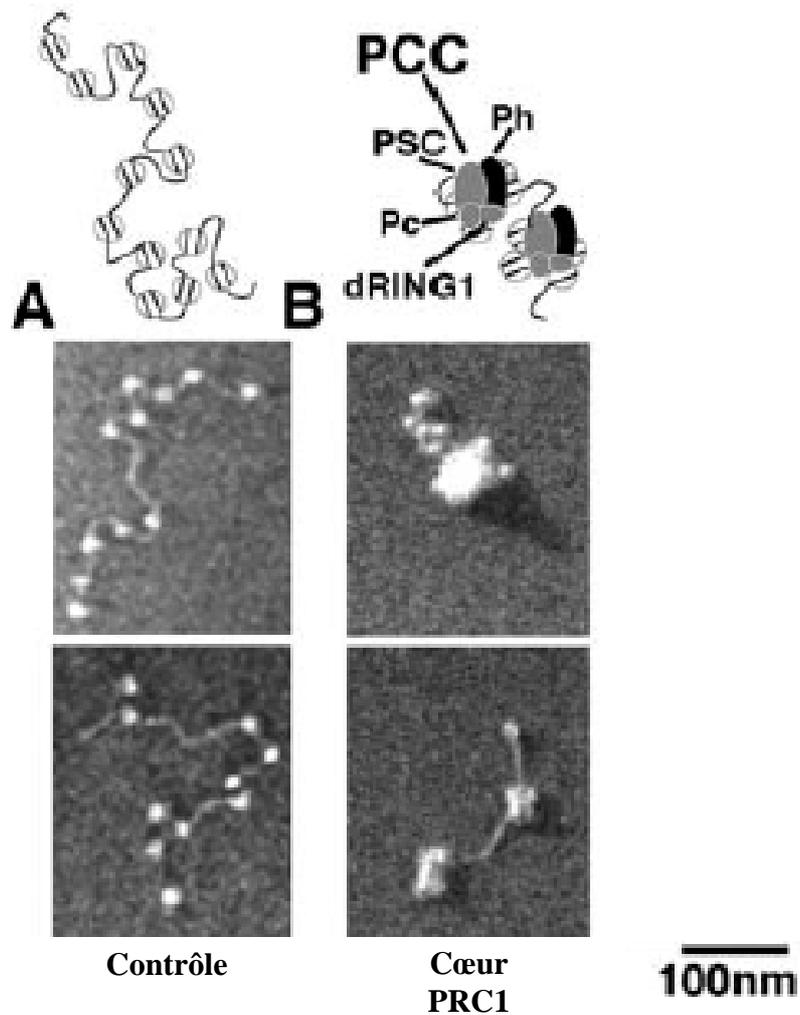


Figure 10. Le complexe PRC1 altère la structure de la chromatine. Image en microscopie électronique de la fibre chromatinienne. A) Chromatine seule. B) Compactage de la chromatine en présence du complexe cœur PRC1 (PCC) (d'après Francis et al., 2004).

Le Complexe CHRASCH (Chromatine Associated Silencing Complex for Homeotics) est apparenté à PRC1 et a été purifié à partir de cellules en culture *Schneider SL-2* (Huang et al., 2002 ; Huang and Chang, 2004). Celui-ci ressemble au complexe PRC1 mais contient également la protéine PSQ (Pipsqueak) qui lui permet de fixer spécifiquement l'ADN des PRE contenant le motif GAGAG (GA)_n.

II.3.2 Complexes du groupe Trithorax

Comme les protéines PcG, les protéines TrxG s'organisent en complexes. Chez la drosophile, 5 complexes principaux ont été étudiés : BRM, TAC1, ASH1, ASH2 et FACT.

II.3.2.1 Complexe Brahma

Le complexe Brahma (BRM) de 2 MDa est principalement composé des protéines BRM, Moira (MOR), SNF5-Related gene 1 (Snr1), OSA, Polybromo et d'autres protéines accessoires nommées Brahma Associated Proteins (BAP) (Collins et al., 1999 ; Papoulas et al., 1998 ; Papoulas et al., 2001). Chez la drosophile, le complexe BRM existe sous deux formes distinctes (figure 11) (Mohrmann et al., 2004). Le complexe BRM appartient à la famille des complexes de remodelage de la chromatine du type SWI/SNF. Rappelons que la protéine BRM est l'homologue de la protéine SWI2/SNF2 et fonctionne comme la sous unité ATPasique du complexe (Collins et al., 1999 ; Crosby et al., 1999 ; Kal et al., 2000 ; Petruk et al., 2001 ; Vasquez et al., 1999). Au niveau des chromosomes polyténiques, le complexe BRM est largement associé aux régions transcriptionnellement actives. Sa présence y est essentielle pour la transcription par l'ARN polymérase II. Le complexe BRM possède donc un rôle général dans l'activation de la transcription, du moins au niveau des glandes salivaires (Armstrong et al., 2002). Les protéines OSA, Snr1 et la protéine à domaines HMG BAP111 modulent les interactions entre le complexe BRM et la chromatine (Collins et al., 1999 ; Collins and Treisman, 2000 ; Marena et al., 2003 ; Papoulas et al., 2001 ; Vasquez et al., 1999). D'autres protéines du groupe TrxG peuvent cibler le complexe BRM vers des promoteurs spécifiques et moduler son activité. C'est le cas par exemple de la protéine Z (Kal et al., 2000).

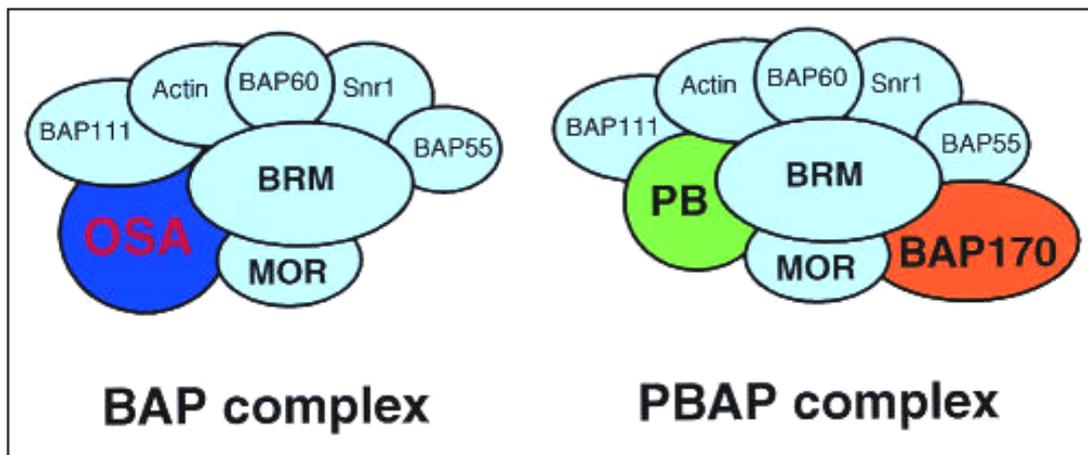


Figure 11. Composition des deux complexes Brahma. Abréviations : BRM (Brahma), BAP (BRM Associated Potein), MOR (Moirra), Snr1 (SNF5-related gene 1), PB (Polybromo) (d'après Morhmann et al., 2004)

II.3.2.2 Complexes TAC1, ASH1 et ASH2

Un autre complexe de 1 MDa nommé « Trithorax Acetyltransférase 1 » (TAC1) a été découvert. Il contient la protéine TRX, la protéine HAT : « drosophila CREB Binding Protein » (dCBP) et l'antiphosphatase « Set binding factor 1 » (Sbf1) (Petruk et al., 2001). *In vivo*, les composants du complexe TAC1 sont nécessaires à l'activation du gène *Ubx* (Petruk et al., 2001). TAC1 pourrait activer la transcription des gènes homéotiques en acétylant et en méthylant les histones situées à proximité des TRE. Cette idée est étayée par le fait que le domaine *Fab-7* maintient l'activation lorsque les histones H4 y sont hyperacétylées (Cavalli and Paro, 1999). La méthylation des histones H3 est également associée à une transcription active des gènes (Bernstein et al., 2002 ; Schneider et al., 2004).

Les complexes contenant ASH1 et ASH2 ont respectivement des masses moléculaires de 2 MDa et 0,5 MDa. Les autres composants de ces complexes restent à définir (Papoulas et al., 1998). La protéine ASH1 est une HMT et la méthylation des histones par cette protéine est associée à l'activation de la transcription dans des cellules de drosophile en culture et dans les disques imaginaux de pattes. Ces modifications représentent un marquage épigénétique qui empêche la fixation des protéines répressives de la transcription et favorise la fixation du complexe BRM (Beisel et al., 2002). Par ailleurs, plusieurs arguments étayent l'idée que les complexes ASH1 et TAC1 interagissent. Tout d'abord, les deux protéines ASH1 et TRX co-précipitent à partir d'extraits embryonnaires de drosophile et ont de nombreuses localisations

communes sur les chromosomes. Ces deux protéines interagissent directement et physiquement via leur domaine SET *in vitro* et dans des expériences de double-hybride chez la levure. De plus, la perte partielle de la fonction du gène *ash1* diminue la fixation de TRX sur la chromatine (Rozovskaia et al., 1999). D'autres arguments sont que la protéine ASH1 interagit physiquement avec dCBP *in vitro* et les mutations de *ash1* suppriment le phénotype dû à la surexpression de dCBP *in vivo* (Bantignies et al., 2000). Tout ceci suggère que ASH1 et TAC1 pourraient interagir pour modifier la structure de la chromatine.

II.3.2.3 Complexe FACT

Initialement, le complexe FACT (Facilitates Chromatin Transcription) a été isolé chez l'Homme (Orphanides et al., 1998). C'est un hétérodimère composé de protéines à boîtes HMG (SPT16 et SSRP1) qui facilite l'élongation de la transcription par l'ARN polymérase II et permet la restructuration des nucléosomes en se fixant sur les histones H2A et H2B (Orphanides et al., 1999). Le complexe FACT est un complexe hautement conservé chez les eucaryotes. Chez la drosophile, FACT (dSPT16 et dSSRP1) a été co-purifié avec la protéine GAF à partir d'extraits embryonnaires (Shimojima et al., 2003). Shimojima et ses collaborateurs montrent que le complexe GAF-FACT de drosophile est impliqué dans le remodelage de la chromatine nécessaire au maintien de l'expression des gènes homéotiques (Shimojima et al., 2003).

II.4 Modèle d'action des complexes Polycomb et Trithorax

Nous avons vu précédemment que la régulation de l'expression des gènes homéotiques s'organise en deux phases. Lors de la première phase, le profil d'expression des gènes est établi par les produits des gènes de segmentation. Lors de la seconde phase, les protéines PcG et TrxG maintiennent le profil d'expression des gènes homéotiques au cours des divisions cellulaires par un remodelage de la chromatine. Ce maintien de l'état transcriptionnel des gènes s'organise en deux étapes. La première étape est précoce et correspond à l'initiation du maintien. La seconde plus tardive correspond au maintien à

proprement parlé (pour revue voir van Lohuizen, 1999). Au cours de ce chapitre, nous allons faire état des connaissances actuelles concernant ces deux étapes.

II.4.1 Identification des PRE et TRE

L'étude de la fixation des PcG et TrxG sur les chromosomes polyténiques révèle plus d'une centaine de sites bien définis et l'une des questions importantes qui est posée aujourd'hui est de comprendre comment s'effectue le recrutement spécifique des PcG et TrxG sur leurs cibles ?

Chez la drosophile, le recrutement des PcG sur leurs cibles nécessite des séquences régulatrices particulières appelées PRE. Les PRE ont tout d'abord été isolés au sein des régions régulatrices des gènes homéotiques ainsi qu'au sein des régions régulatrices des gènes *en* et *ph* (*polyhomeotic*) (Chan et al., 1994 ; Fauvarque and Dura, 1993 ; Kassis, 1994). Les PRE sont des séquences dont la taille varie de quelques centaines à plusieurs milliers de paires de bases. Les PRE sont définis comme des unités fonctionnelles qui répondent à plusieurs caractéristiques essentielles au cours d'expériences de transgénèse chez la drosophile.

1) Tout d'abord les PRE induisent la répression d'un gène rapporteur placé à leur voisinage (Chiang et al., 1995 ; Hagstrom et al., 1997). Le profil de répression est maintenu tout au long du développement. La répression est perturbée en contexte mutant *PcG*.

2) La répression est plus forte si le transgène est présent en deux copies. Ce phénomène a été appelé « Pairing Sensitive Silencing » (PSS) (Pirrotta, 1997). Ce phénomène de PSS est visible chez des individus homozygotes pour le transgène mais aussi chez des individus où le transgène est inséré à différents sites. Cela montre qu'il existe des régulations en trans.

3) Enfin, l'insertion d'un transgène contenant un PRE crée un nouveau site de fixation des protéines PcG sur les chromosomes polyténiques au niveau du site d'insertion du transgène.

Les PRE sont généralement localisés à plusieurs dizaines de kb des promoteurs qu'ils régulent. Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer le fait que les PRE maintiennent la répression des gènes à distance. Parmi les modèles, le plus probable propose que les PRE interagissent directement avec les promoteurs par un mécanisme de « boucle » de l'ADN identique à celui utilisé par les activateurs de la transcription (Bulger and Groudine, 1999). La présence des protéines TAF et TBP au sein du complexe PRC1 (Saurin et al., 2001) et leur colocalisation sur les promoteurs des gènes homéotiques (Breiling et al., 2001) sont cohérentes avec un mécanisme de rapprochement par un système de boucle de l'ADN.

Les cibles des protéines TrxG sont appelées TRE. Les TRE sont moins bien caractérisés que les PRE et ont initialement été définis comme étant capables de maintenir l'activation stable d'un gène. Plusieurs études montrent que les PRE et TRE sont physiquement proches les uns des autres (Tillib et al., 1999). En effet, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine pontée (ChIP) montrent que des protéines PcG et TrxG sont associées à des domaines chevauchants (1 à 3 kb), des régions régulatrices *bx*, *Mcp*, *Fab-7* et *Scr* des gènes homéotiques (Gindhart and Kaufman, 1995 ; Strutt et al., 1997 ; Orlando et al., 1998). Cette proximité physique entre PRE et TRE est également reflétée par leur capacité à maintenir activé et réprimé la transcription au cours d'expériences de transgénèse. Par exemple, le domaine *Fab-7* participe normalement au maintien d'un état répressif de la transcription au sein de lignées transgéniques. A contrario, suite à une activation forcée de la transcription lors de l'embryogenèse, le même élément permet le maintien d'un état activé (Cavalli and Paro, 1998). A l'heure actuelle, nous ne disposons pas des outils nécessaires pour faire une réelle distinction entre PRE et TRE. C'est pourquoi les régions qui maintiennent, en réponse à la fois aux protéines PcG et TrxG, le profil d'expression d'un gène au cours du temps ont été nommées : Module de Mémoire Cellulaire (CMM). Nous garderons cette appellation dans la suite de notre exposé.

Des alignements des séquences montrent qu'il existe une grande diversité au sein des CMM. Ceci peut expliquer en partie la régulation spécifique des gènes. Malgré cette diversité, il existe des séquences particulières que l'on retrouve régulièrement sur ces domaines.

- Le premier motif est le site de fixation spécifique de PHO et PHOL : GCCAT (Brown et al., 1998 ; Brown et al., 2003 ; Mihaly et al., 1998). PHO et PHOL sont les seules protéines PcG connues pour se fixer sur des séquences spécifiques de l'ADN. Les premières

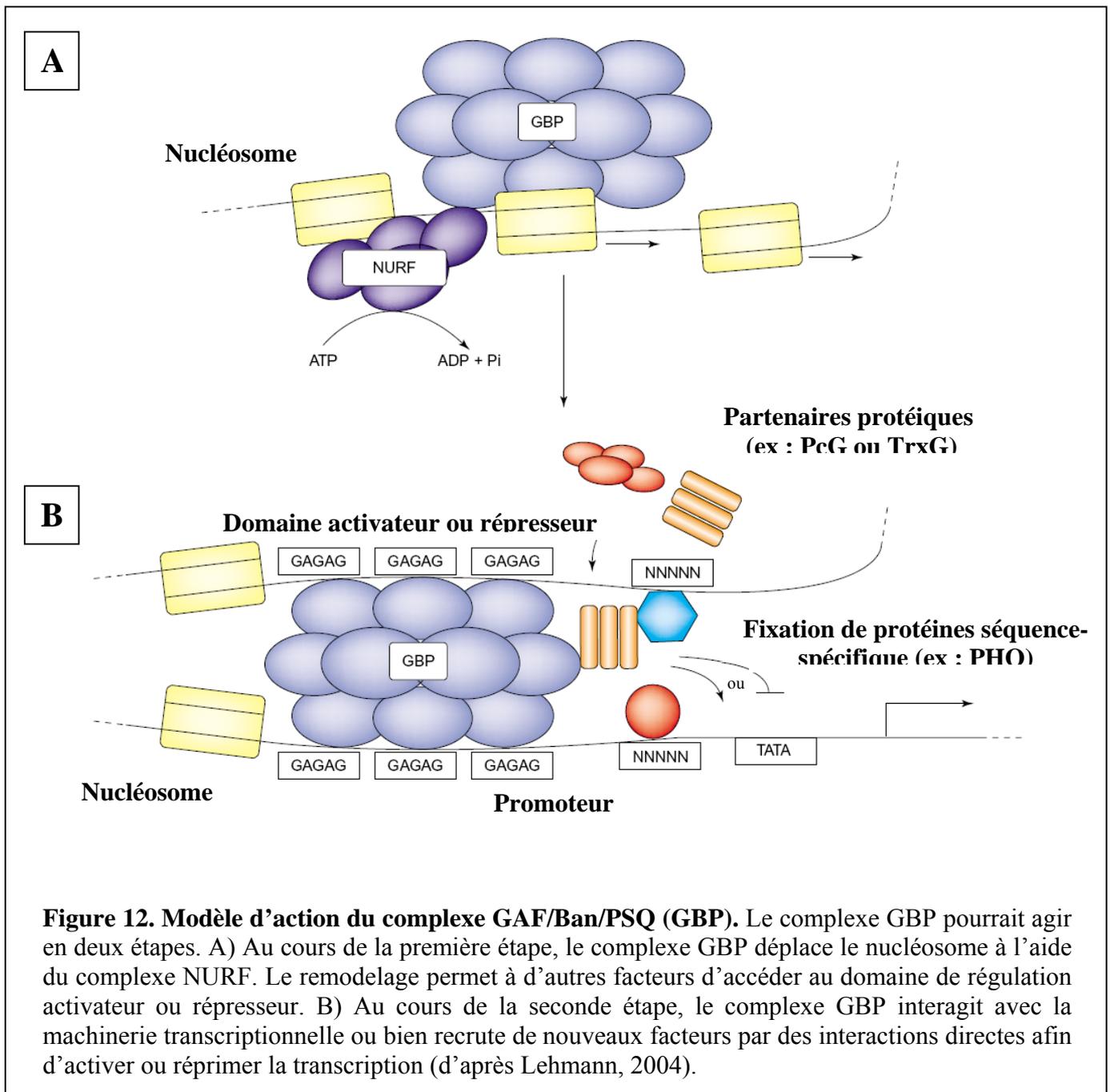
études réalisées *in vivo* montrent que les mutations des sites de fixation de PHO sur l'ADN ou de la protéine PHO elle-même diminuent la répression par les protéines PcG (Brown et al., 1998 ; Busturia et al., 2001 ; Mishra et al., 2001 ; Shimell et al., 2000). De plus, quand les sites de fixation de PHO sont mutés au sein du CMM *bxd*, la répression de la transcription n'est plus efficace dans les disques imaginaux (Fritsch et al., 1999). Il a été mis en évidence par des études génétiques que la répression de la transcription associée à PHO est dépendante de la protéine PC (Fritsch et al., 1999). Suite aux travaux de Fritsch, il a été proposé que PHO se fixe au CMM et recrute les protéines PcG. La protéine PHO interagit avec le complexe ESC-E(Z) par co-immunoprécipitation à partir d'extraits nucléaires d'embryons de drosophiles (Poux et al., 2001b). La même technique révèle que la protéine PHO se fixe au complexe PRC1. Plus précisément, PHO se fixe aux protéines PC et PH. Des expériences de retardement sur gel et de co-immunoprécipitation montrent *in vitro* que la protéine PHO permet le recrutement de PC sur l'ADN. Le domaine de PHO qui permet la liaison de cette protéine à PC peut entraîner la répression de la transcription après transfection dans des cellules de drosophile en culture. Cette propriété est renforcée par la surexpression de PC (Mohd-Sarip et al., 2002). Cependant, une étude menée *in vivo* a montré que contrairement aux protéines PC, PSC ou PH, la protéine PHO ne recrute pas de complexes PcG quand elle est artificiellement dirigée vers un gène rapporteur (Poux et al., 2001a). Il semble donc que la protéine PHO soit nécessaire mais pas suffisante à l'établissement d'un domaine répressur de la transcription au niveau de différents CMM.

- Un autre motif régulièrement retrouvé au sein des CMM est la séquence YGAGYG, site de fixation de Zeste (Z). Bien que Z soit classée parmi les TrxG, elle partage sur les chromosomes polyténiques 57 de ses 60 sites de fixation avec les PcG (Rastelli et al., 1993). Zeste se fixe au promoteur *Ubx* quelque soit son état d'activation. Tout ceci suggère que Z pourrait être fixée constitutivement sur un grand nombre de CMM. La mutation des sites de fixation de Z sur le CMM *Fab-7* n'altère pas le recrutement des PcG (Dejardin and Cavalli, 2004). Néanmoins, Z a été purifiée avec le complexe PRC1 (Saurin et al., 2001) qui inhibe le remodelage de la chromatine par le complexe humain SWI/SNF (Shao et al., 1999). La protéine Z favorise cette inhibition (Mulholland et al., 2003). Par conséquent, Z ne semble pas impliquée dans la mise en place du maintien de la répression mais semble plutôt être impliquée plus tardivement une fois que le maintien est établi. Au contraire, Z apparaît nécessaire au recrutement stable du complexe BRM et de ce fait au maintien de l'activation (Dejardin and Cavalli, 2004). Cela est cohérent avec des études précédentes montrant que Z et

le complexe BRM interagissent *in vitro* via une interaction directe entre Z, MOR et OSA (Kal et al., 2000). TRX pourrait coopérer avec Z afin de recruter le complexe BRM puisque TRX interagit avec SNR1, un composant du complexe BRM (Rozenblatt-Rosen et al., 1998 ; Zraly et al., 2003).

- Enfin, un troisième motif est présent sur les CMM. Il s'agit de la séquence (GA)_n, site de fixation de la protéine GAF, produit du gène *Trithorax-like* (*Trl*). Cette séquence est également reconnue par la protéine PSQ. Initialement GAF a été caractérisée comme une protéine du groupe TrxG (Farkas et al., 1994). La mutation *Trl* entraîne la transformation de l'haltère en aile, due à la perte d'expression du gène *Ubx*. Les individus homozygotes pour l'allèle muté présentent une transformation homéotique du segment abdominal A6 en segment abdominal A5. Cela suggère que GAF est nécessaire à l'activation du gène *Abd-B*. GAF peut être co-immunoprécipitée avec TRX à partir d'extraits embryonnaires (Poux et al., 2002). Il a été montré que la fixation de TRX sur le domaine *bxd* repose en partie sur la présence des sites (GA)_n (Poux et al., 2002). Tout ceci suggère le rôle de GAF et éventuellement celui de PSQ en tant que recruteurs des TrxG. Toutefois, les activités répressives des CMM *bxd*, *MCP* et *Fab-7* sont inhibées en contexte mutant *Trl* (Busturia et al., 2001 ; Hagstrom et al., 1997 ; Horard et al., 2000 ; Mishra et al., 2001). L'idée que GAF puisse aussi agir en tant que protéine du groupe PcG a été étayée par des expériences de co-immunoprécipitation montrant que GAF est associée physiquement avec le complexe répresseur PRC1 et avec la protéine HDAC1 du complexe ESC-E(Z) (Horard et al., 2000 ; Poux et al., 2001b). GAF ne s'associe pas directement avec ces protéines, ce qui suggère l'intervention de facteurs intermédiaires. L'un de ces facteurs pourrait être Corto. Corto interagit directement avec la protéine GAF (Salvaing et al., 2003). Des études d'interactions génétiques montrent que Corto assisterait GAF dans le recrutement des complexes ESC-E(Z) et PRC1. Le maintien de l'activation ou de la répression par GAF semble basé sur une activité de remodelage de la chromatine. En effet, GAF est un partenaire du complexe FACT qui rappelons-le facilite l'élongation de la transcription. Il a été montré *in vitro* que le complexe FACT fixe les nucléosomes et que GAF permet leur déplacement (Shimojima et al., 2003). La protéine GAF interagit avec un autre complexe de remodelage NURF (Badenhorst, 2002 ; Xiao et al., 2001). Plusieurs arguments indiquent que PSQ et Ban sont deux partenaires essentiels de GAF. Ces trois protéines montrent une majorité de sites de fixation communs (Schwendemann and Lehman, 2002). Comme dans le cas de GAF, PSQ et Ban sont nécessaires aux mêmes mécanismes d'activation et de répression des gènes homéotiques. PSQ et Ban ont été co-

immunoprécipitées avec GAF à partir d'extraits embryonnaires. Enfin, ces protéines se lient au CMM *bxd* au sein de complexes qui pourraient être identiques (Faucheux et al., 2003 ; Hodgson et al., 2001 ; Huang et al., 2002 ; Mishra et al., 2003). Il a donc été proposé un modèle où Ban pourrait fonctionner comme une protéine adaptatrice nécessaire à la formation d'un complexe de remodelage basé autour du triplet GAF, PSQ et Ban (figure 12) (pour revue voir Lehmann, 2004).



II.4.2 Choix entre répression et activation

Nous venons de voir que les CMM sont des unités fonctionnelles où les protéines séquences spécifiques PHO, GAF, et Z peuvent dans certains cas participer au recrutement des protéines PcG ou TrxG. Le fait que ces protéines ont une expression ubiquitaire alors que leurs gènes cibles ont des profils d'expression bien spécifiques montre que leur recrutement sur les CMM est hautement régulé. Quels sont donc les moyens de recruter les complexes TrxG plutôt que PcG lorsqu'un gène est exprimé précocement ? Inversement, lorsque l'expression d'un gène est réprimée, quels sont les moyens permettant le recrutement des complexes PcG plutôt que TrxG ? Peu de choses sont connues en ce qui concerne l'initiation du maintien de l'expression des gènes, néanmoins plusieurs hypothèses peuvent être faites.

De nombreuses données suggèrent que les CMM sont réprimés par défaut et que leur passage vers un état activé nécessite une activation précoce (Cavalli and Paro, 1998 ; Sengupta et al., 2004 ; Klymenko and Muller, 2004). Plusieurs études suggèrent également que la transcription d'ARN non codants issus des CMM eux-mêmes pourrait induire leur passage d'un état à l'autre. Il existe au sein du complexe *BxC* une corrélation importante entre la transcription des séquences codantes des gènes homéotiques et celle des séquences non codantes des CMM. Chaque CMM est transcrit simultanément et suivant un profil spécifique identique à celui du gène homéotique qu'il régule (Rank et al., 2002). Ceci montre que la transcription des CMM coïncide avec l'initiation de la transcription au niveau des promoteurs. Ainsi, une transcription ectopique des CMM du complexe *BxC* a pour effet l'activation des gènes homéotiques et l'apparition de transformations homéotiques (Bender and Fitzgerald, 2002 ; Hogga and Karch, 2002). De plus, dans un système transgénique, la transcription des CMM induit l'activation stable d'un gène rapporteur placé sous contrôle de cette séquence (pour revue voir Ringrose and Paro, 2004). Les ARN non codants pourraient interagir avec les PcG et induire leur inactivation. Il a été montré chez la drosophile que le chromodomaine d'une protéine impliquée dans « la compensation de dosage » peut interagir avec des ARN (Akhtar et al., 2000). Dans ce cas, on peut imaginer que PC interagit avec des ARN non codants via son chromodomaine. En conclusion, si la transcription des CMM paraît essentielle à l'initiation du maintien de la transcription des gènes, les mécanismes moléculaires mis en jeu restent à définir.

Les complexes PcG et TrxG ont une composition dynamique. En conséquence, des régulateurs précoces pourraient faire partie de leurs protéines accessoires et pourraient assurer le recrutement de ces complexes. On peut citer l'exemple de la protéine PcG de drosophile dMi-2 qui est recrutée par le produit du gène lacunaire *hb* et participe à la répression des gènes homéotiques (Kehle et al., 1998). Ces régulateurs positifs ou négatifs pourraient être spécifiques de certains tissus.

Enfin, la mise en place d'un marquage épigénétique précoce pourrait également expliquer le recrutement spécifique des PcG et TrxG. Nous avons vu précédemment que très tôt au cours du développement, les histones sont soumises aux modifications post-traductionnelles qui constituent le code histone. On peut donc proposer que des marquages épigénétiques mis en place par les activateurs précoces permettent le recrutement de TRX et d'autres protéines TrxG. TRX marquerait à son tour par la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3, un état actif afin d'éviter toute répression induite par les PcG. Dans le cas contraire, un marquage épigénétique différent recruterait les PcG puisque le chromodomaine de PC fixe de manière stable une histone H3 tri-méthylée sur la lysine 27.

II.4.3 Maintien de la répression ou de l'activation

Aujourd'hui, si les mécanismes de recrutement des PcG et TrxG sur les CMM restent mal connus, on commence à mieux comprendre l'influence de ces protéines sur le maintien du profil d'expression des gènes homéotiques en tant que modificateurs du code histone ou facteurs de remodelage de la chromatine. Simon et Tamkun ont proposé un modèle général d'action des complexes PcG et TrxG (Simon and Tamkun, 2002). Dans ce modèle, les protéines PcG répriment par défaut la transcription par la création au niveau des CMM d'une structure chromatiniennne inaccessible à certaines protéines activatrices. A l'inverse, les protéines TrxG assurent une ouverture de la chromatine. La conformation chromatiniennne pourrait ainsi s'étendre des CMM distants jusqu'aux promoteurs. D'autres mécanismes non exclusifs sont envisageables. L'un de ces mécanismes repose sur une interaction directe entre les PcG/TrxG et la machinerie de l'ARN polymérase II. Enfin, dans le cadre d'une activité répressive, un moyen permettant de bloquer la transcription serait d'isoler les gènes cibles au sein de compartiments nucléaires débarrassés des ARN polymérases.

II.4.3.1 Répression de la transcription

Dans la voie de répression proposée pour les complexes PcG (figure 13), PHO recruterait PC (Mohd-Sarip et al., 2002). La protéine PC pourrait alors recruter directement ESC et de ce fait le complexe ESC-E(Z). ESC-E(Z) méthyle les lysines 27 et 9 de l'histone H3 et désacétylerait localement les nucléosomes. Le nouveau code histone serait alors reconnu par le complexe répresseur PRC1 (Cao et al., 2002 ; Czermin et al., 2002 ; Kuzmichev et al., 2002 ; Muller et al., 2002). Après sa stabilisation, PRC1 verrouillerait le stade réprimé en bloquant l'accès de la chromatine aux complexes de remodelage tel que SWI/SNF (Francis et al., 2001 ; Francis et al., 2004).

Un autre mécanisme d'inactivation possible est la compartimentation nucléaire. L'euchromatine et l'hétérochromatine définissent des territoires nucléaires distincts qui influencent l'expression des gènes. Les travaux étudiant par immunodétection la distribution subnucléaire des protéines montrent qu'il existe d'autres compartiments nucléaires. Ces compartiments ne sont pas inertes mais sont de réels domaines fonctionnels impliqués dans la régulation de l'expression des gènes. Chez la drosophile, l'utilisation des lignées transgéniques où PC a été fusionnée à la GFP (Green Fluorescent Protein) montre que la distribution subnucléaire de PC varie selon les tissus et les stades de développement. Dans les noyaux d'embryons précoces se divisant rapidement, PC-GFP est distribuée de façon homogène, alors que plus tard, lorsque les mitoses ralentissent ou cessent et que les cellules commencent à se différencier, une répartition ponctuée apparaît. Ceci traduit une agrégation locale des complexes PcG dans le noyau (Dietzel et al., 1999). Par ailleurs, l'une des caractéristiques surprenantes de la répression dépendante des protéines PcG est qu'elle est fortement accrue par l'appariement des chromosomes homologues. En effet quand on analyse l'expression d'un gène rapporteur sous influence d'un CMM, on observe que la répression de ce gène est plus forte chez les individus homozygotes que chez les hétérozygotes. C'est le phénomène de PSS que nous avons déjà pu citer précédemment. Ce même CMM *Fab-7* inclus dans une lignée transgénique ne peut pleinement fonctionner qu'en présence du domaine *Fab-7* endogène (Bantignies et al., 2003). Notons que dans des noyaux de cellules embryonnaires, le CMM *Fab-7* permet à des régions chromosomiques éloignées d'établir une répression accrue des gènes adjacents. L'ensemble de ces données suggère que les PcG peuvent co-localiser les CMM naturels dans des compartiments nucléaires spécifiques, débarrassés des ARN polymérases.

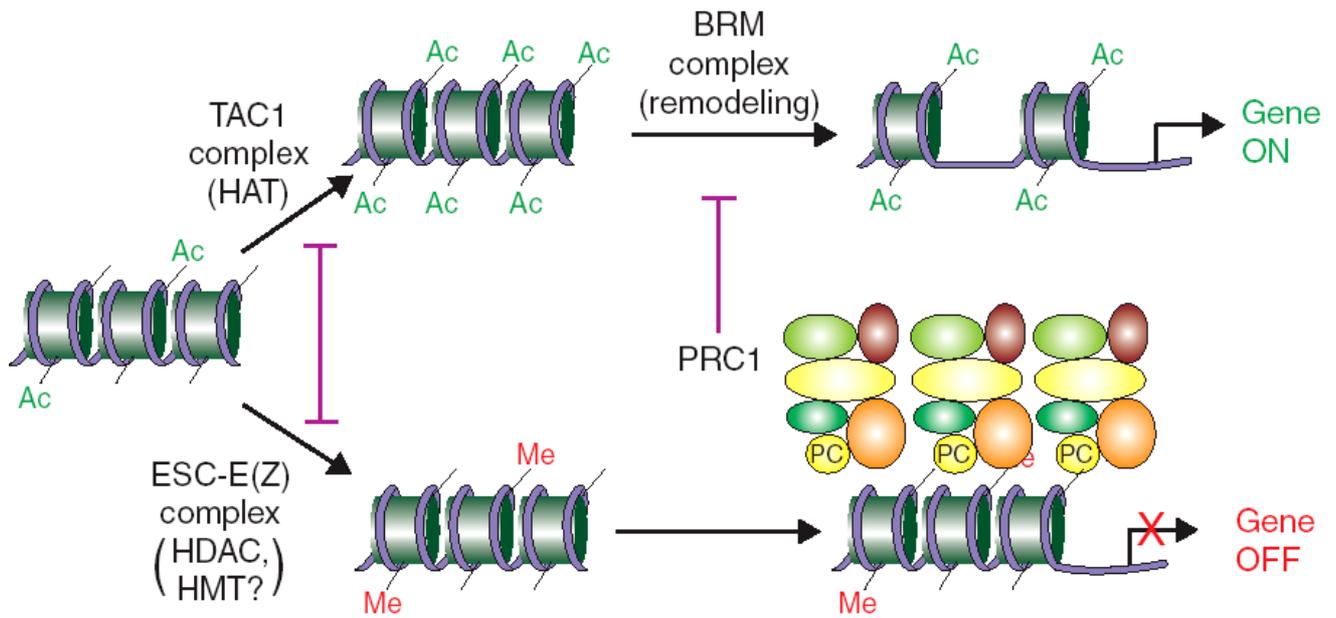


Figure 13. Modèle du mécanisme d'action des complexes PcG et TrxG d'après Simon and Tamkun (2002). Ce schéma représente une séquence contrôlée par les protéines TrxG ou PcG sous la forme d'une fibre nucléosomique (CMM ou promoteur). Le contrôle par les protéines TrxG conduit à l'activation de la transcription : le complexe TAC1 hyperacétyle les queues des histones et permet le recrutement du complexe BRM. Inversement, le recrutement des protéines PcG conduit à la répression de la transcription. Le complexe ESC-E(Z) désacétyle et méthyle les queues des histones. Cette modification du code histone permet le recrutement du complexe PRC1 qui maintient la chromatine dans un état condensé.

II.4.3.2 Activation de la transcription

Une fois qu'un gène est activé, un CMM maintient cet état au cours du temps (Cavalli and Paro, 1998 ; Rank et al., 2002), ce qui se traduit par une ouverture de la chromatine. Cet état d'activation s'accompagne notamment de la méthylation de l'histone H3 sur la lysine 9 par ASH1 (Beisel et al., 2002), sur la lysine 4 par TRX (Smith et al., 2004) ainsi que de l'acétylation par l'histone acétyltransférase dCBP contenue avec TRX dans le complexe TAC1 (Petrucek et al., 2001). Ces actions ne sont en aucun cas exclusives ni redondantes puisque ASH1 et TRX n'interviennent pas sur les mêmes lysines de l'histone H3. Cette différence peut alors expliquer pourquoi il y a deux HMT actives agissant sur les CMM. Le nouveau code histone ainsi mis en place pourrait induire le recrutement du complexe BRM via le bromodomaine de la protéine BRM. La protéine SNR1 du complexe BRM interagit avec TRX (Rozenblatt-rosen et al., 1998). Par conséquent, TAC1 pourrait recruter BRM grâce à une interaction physique. En remodelant l'arrangement, la conformation ou la position des nucléosomes, BRM faciliterait l'accessibilité de la chromatine pour que puissent agir d'autres facteurs activateurs de la transcription. Ce modèle est présenté dans la figure 13. Il existe de nombreuses alternatives à ce modèle où la collaboration ou l'indépendance fonctionnelles des complexes TrxG pourraient être locus spécifique. Là encore, l'activité de maintien transcriptionnel pourrait faire intervenir des protéines TrxG locus spécifiques telle que Tantalus qui confère une spécificité de tissu à ASX (Dietrich et al., 2001). Un autre exemple pourrait être un ordre d'assemblage inversé des complexes TrxG : le remodelage par le complexe BRM pourrait précéder le recrutement de TAC1, comme l'action du complexe SWI/SNF précède celle du complexe HAT au niveau du gène *HO* de la levure (Cosma et al., 1999 ; Krebs et al., 1999).

La mise en évidence du mécanisme d'activation des CMM par leur transcription (Bender and Fitzgerald, 2002 ; Hogga and Karch, 2002, Schmitt et al., 2005) permet d'envisager un rôle important du complexe ARN polymérase II dans le recrutement des complexes TrxG. Le fait que le complexe BRM interagisse avec l'ARN polymérase II est cohérent avec cette hypothèse (Armstrong et al., 2002). Les protéines TrxG pourraient faciliter l'élongation de la transcription dans la mesure où le facteur de remodelage ATP-indépendant GAF est un partenaire du complexe FACT (Shimojima et al., 2003). On peut également citer l'exemple du gène *kismet* qui code une protéine proche de BRM et d'autres membres de la famille SWI2/SNF2 (Daubresse et al., 1999 ; Therrien et al., 2000). Kismet

(KIS) n'est pas une protéine directement associée au complexe BRM (Daubresse et al., 1999). Il semblerait plutôt qu'elle agisse comme la sous unité catalytique d'un nouveau complexe de remodelage. Dans une étude récente, Srinivasan et ses collaborateurs suggèrent que KIS facilite une étape précoce de l'élongation de la transcription (Srinivasan et al., 2005).

II.4.3 Mémoire cellulaire au cours des divisions

Le maintien de l'état transcriptionnel des gènes au cours de divisions cellulaires également nommé mémoire cellulaire repose en grande partie sur l'activité des protéines PcG et TrxG. A l'heure actuelle, on commence à comprendre le rôle moléculaire de ces protéines et des complexes qu'elles constituent mais les mécanismes moléculaires de la mémoire restent à déterminer. Une première hypothèse est qu'après l'initiation du maintien de l'expression des gènes, les protéines PcG et TrxG restent associées à leurs cibles au cours des mitoses. Les différentes études réalisées à ce sujet réfutent cette hypothèse puisque les protéines PcG sont décrochées de la chromatine mitotique (Buchenau et al., 1998 ; Dietzel et al., 1999). Francis et Kingston proposent d'autres hypothèses (Francis and Kingston, 2001). Tout d'abord, d'autres facteurs que les PcG et TrxG pourraient rester associés à la chromatine en mitose. Ces facteurs permettraient le réassemblage des complexes PcG et TrxG. Si c'est le cas, ces facteurs restent à déterminer et cela suggère l'existence d'autres complexes PcG et TrxG que ceux que nous connaissons actuellement. Une autre hypothèse est que le maintien de la mémoire cellulaire repose sur un marquage épigénétique. Grâce à leur activité de modification du code histone, les protéines PcG et TrxG pourraient assurer elles-mêmes le marquage de la chromatine et assurer leur recrutement rapide après les mitoses. La méthylation des lysines des histones pourrait être un événement important. La tri-méthylation semble être une modification très stable puisque la seule déméthylase connue à ce jour n'altère pas cette modification post-traductionnelle (Shi et al., 2004). Ainsi au cours de la réplication, la distribution équilibrée des histones méthylées entre les deux chromatides filles serait un marqueur intemporel de l'état transcriptionnel de l'ADN qui les porte. Ce modèle implique un renouvellement d'histones méthylées, ce qui est cohérent avec le besoin permanent des HMT au cours du développement.

II.5 Gènes cibles des protéines Polycomb et Trithorax

Les travaux d'immunolocalisation montrent que les protéines des groupes Polycomb et Trithorax se fixent sur plus d'une centaine de bandes discrètes sur les chromosomes géants des glandes salivaires (Sinclair et al., 1998). De plus, les mutants *PcG* et *trxG* présentent des phénotypes pléiotropes. Tout ceci indique que les gènes homéotiques ne sont pas les seules cibles de ces protéines.

Certains mutants PcG montrent des malformations au niveau des ailes (Garcia-Bellido et al., 1973 ; Randsholt et al., 2000) dont le développement dépend en partie de l'expression différentielle et stable des gènes de polarité de segment. Deux des premières cibles des PcG et TrxG identifiées en dehors des gènes homéotiques sont les gènes de polarité de segment *en* et *hh* (Kassis, 1994 ; Randsholt et al., 2000 ; Maurange and Paro, 2002). Dans le cas du développement de l'œil, les PcG et TrxG régulent l'expression du gène *Ubx* mais aussi celle des gènes *homothorax*, *eyes absent* et *dachshund* (Janody et al., 2004 ; Ringrose et al., 2003). Il a été suggéré que les gènes *ph*, *scm* et *sce* ont un rôle dans la régulation de gènes impliqués lors de l'ovogenèse (Narbonne et al., 2004). Les mutants *PcG* et *trxG* présentent également des anomalies cuticulaires (embryon) ou des pertes de segments (adulte). Des études génétiques montrent que des gènes lacunaires tels que *hb*, *kni*, *gt*, et des gènes de parité de segment tel qu'*eve* sont directement ou indirectement régulés par les produits des gènes *PcG* et *trxG*. Les PcG et TrxG contrôlent leur propre expression puisque des CMM ont été identifiés et caractérisés à proximité du locus *ph* (Bloyer et al., 2003). Dans ce cas précis, notons que deux CMM régulent différemment les deux unités transcriptionnelles de ce gène : *polyhomeotic proximal (php)* et *polyhomeotic distal (phd)*. Les PcG et TrxG participent à la régulation d'autres gènes que ceux impliqués dans le développement. Plusieurs arguments étayent l'idée que ces protéines sont impliquées dans la prolifération cellulaire. Tout d'abord les mutants *ash1* et *ash2* présentent des disques imaginaux de petite taille. De plus, le gène *multi sex combs* a été identifié comme un suppresseur de tumeur (Santamaria and Randsholt, 1995). La prolifération cellulaire est très étudiée chez les mammifères dans la mesure où elle est associée aux problèmes de cancérisation. Ainsi les gènes humains *Bmi1*, *mel-18*, *Mll*, homologues respectifs des gènes de drosophile *Psc*, *Su(Z)2* et *trx* contrôlent l'expression de régulateurs de la prolifération cellulaire. Récemment, une approche bioinformatique a été menée afin d'identifier des CMM et les gènes associés au sein du génome de drosophile

(Ringrose et al., 2003). Dans cette étude, environ 160 loci apparaissent comme des CMM potentiels. Des études d'immunoprécipitation de chromatine pontée montrent que certains d'entre eux identifiés en dehors des gènes du développement sont bien des domaines de fixation des protéines PC et TRX.

II.6 Autres fonctions des protéines Polycomb et Trithorax

Nous avons pu voir jusqu'à présent que les protéines PcG et TrxG ont un rôle majeur dans la régulation de l'expression de nombreux gènes. Cependant quelques données montrent que ces protéines pourraient avoir d'autres fonctions.

Les protéines PcG et TrxG pourraient organiser les chromosomes. PH semble interagir avec la protéine BARR. BARR est la protéine homologue de la protéine humaine XCAP-H une sous unité du complexe 13S condensine, un complexe impliqué dans la condensation des chromosomes mitotiques (Hirano, 1999). Les mutants *ph* et *barr* montrent dans l'embryon, des défauts identiques de ségrégation des chromosomes (Lupo et al., 2001 ; Bhat et al., 1996). L'interaction des protéines PH et BARR peut refléter une fonction mitotique commune.

Les PcG et TrxG semblent avoir un rôle dans le phénomène de répression télomérique. Il a été montré que la répression de gènes rapporteurs insérés dans des séquences télomériques TAS (Telomeric Associated Sequences) dépend des gènes *PcG* (Cryderman et al., 1999a). Des séquences TAS peuvent également induire la répression transcriptionnelle d'un gène rapporteur placé en amont de ces séquences (Kurenova et al., 1998). Chez la levure, les répresseurs transcriptionnels des cassettes sexuelles, les protéines SIR, sont impliqués dans la structure des télomères et participent ainsi à l'organisation du noyau. Cela laisse imaginer un rôle des protéines PcG et TrxG dans l'organisation nucléaire.

Chez la drosophile, des études génétiques montrent une interaction fonctionnelle entre l'ETP Cramped et PCNA (Proliferative Cell Nuclear Antigen) (Yamamoto et al., 1997). PCNA est une protéine impliquée dans la réplication et la réparation de l'ADN. Les PcG et TrxG pourraient participer à ces deux activités.

II.7 Evolution des protéines Polycomb et Trithorax

Les protéines des groupes Polycomb et Trithorax sont de manière générale bien conservées au cours de l'évolution (Hsieh et al., 2003). Les tableaux 4 et 5 donnent quelques exemples des équivalents des protéines de drosophile dans le règne animal. Les gènes *E(Z)* et *esc* apparaissent comme les mieux conservés au cours de l'évolution. A titre d'exemple, seuls ces deux gènes ont été isolés chez *C.elegans* (Holdeman et al., 1998 ; Korf et al., 1998). Chez *Arabidopsis thaliana*, la protéine FIE (Fertilization Independent Endosperm) est l'homologue d'ESC et est aussi impliquée dans la répression des gènes homéotiques (Kinoshita et al., 2001). Afin de mettre en évidence la conservation fonctionnelle des protéines homologues, on peut montrer par des expériences de sauvetage qu'une protéine d'origine mammifère peut compenser une mutation de son gène correspondant chez la drosophile. De telles expériences ont montré que de l'ADN complémentaire codant l'homologue murin de la protéine PC : M33, ou l'homologue murin de la protéine PH : MPH1, ou l'homologue humain de la protéine PHO : YY1, peut sauver le phénotype mutant pour le gène correspondant chez la drosophile (Muller et al., 1995). Enfin, la protéine humaine MLL, qui est un homologue de la protéine de drosophile TRX, sauve partiellement un mutant *trx* de drosophile (Muyrers-Chen et al., 2004). Ainsi les protéines des vertébrés peuvent dans certains cas se substituer à leurs homologues chez la drosophile. Cependant, aucune protéine de souris n'a été montrée comme étant capable de sauver complètement la létalité chez la drosophile. Cela est probablement dû au fait que les protéines de souris et de drosophile partagent une homologie limitée ou bien qu'aucun des gènes utilisés pour le sauvetage n'a été exprimé sous le contrôle d'un promoteur endogène de drosophile. Il existe malgré tout une différence entre la drosophile et les vertébrés, notamment pour les 3 protéines séquences spécifiques PHO, GAF et Z. Chez les vertébrés, si la séquence cible de GAF, $(GA)_n$ est essentielle à la fonction de nombreux promoteurs, le facteur qui s'y fixe n'est pas encore connu. A l'heure actuelle, aucun homologue de GAF n'a été identifié. Enfin, l'existence chez différentes espèces d'interactions protéine-protéine homologues à celles décrites chez la drosophile suggère que les complexes PcG et TrxG sont eux-mêmes conservés (Satijn et al., 2001). C'est le cas par exemple chez l'homme où EED (homologue de ESC) et EZH2 (homologue de E(Z)) interagissent et appartiennent à un même complexe homologue du complexe ESC-E(Z) (Sewalt et al., 1998). Les interactions entre les complexes ESC-E(Z) et PRC1 pourraient être conservées puisque les homologues des protéines PC et PSC interagissent chez le poisson zèbre (Gunster et al.,

1997 ; Kawamura et al., 2002 ; Satijn et al., 1997). Les complexes TrxG sont également conservés. La composition et la fonction du complexe BRM de drosophile sont homologues à celles du complexe SWI/SNF de levure. BRM est l'homologue de la protéine ATPase de levure SWI2/SNF2 et leur domaine ATPasiques est interchangeable (Elfring et al., 1994). En conclusion, la conservation des protéines PcG et TrxG au cours de l'évolution dénote de leur importance biologique.

Tableau 4. Les protéines du groupe Polycomb et leurs homologues. Cette liste non exhaustive regroupe les protéines du groupe Polycomb identifiées chez la drosophile ainsi que quelques unes de leurs homologues chez l'Homme (H), la Souris (S) et le Xénope (X). Les protéines soulignées et en rouge sont des *ETP*.

Protéines de drosophile	Homologues
<u>Additional sex combs (ASX)</u>	(H) ASXL1 et 2 ; (S) asxl1 et 2
<u>Cramped (CRM)</u>	--
dMi-2	(H) Mi-2 ; (X) Xmi-2
<u>Corto</u>	--
<u>Enhancer of Polycomb (E(PC))</u>	(H) EPC1 et 2 ; (S) Epc1 et 2
<u>Enhancer of Zeste (E(Z))</u>	(H) EZH1 et 2 ; (S) Ezh1 et 2
Extra sex combs (ESC)	(H) Heed ; (S) eed
<u>Lola-like/Batman (LOLAL/BAN)</u>	--
Multi sex combs	--
<u>Pleiohomeotic (PHO)</u>	(H, S, X) YY1
Polycomb (PC)	(H) hPc1, 2 et 3 ; (S) M33, MPC2 et 3 ; (X) Xpc, Xpc1
Polycomb-like (PCL)	(H) PHF1, Tctex3 ; (S) MPc11 ; (X) XPc11
Polyhomeotic (PH) polyhomeotic proximal polyhomeotic distal	(H) HPH1, HPH2 ; (S) Mph1 et 2
<u>Posterior sex combs (PSC)</u>	(H) BMI1 ; (S) Bmi-1 ; (X) Xbmi-1
<u>Sex combs on midleg (SCM)</u>	(H) SCML1, 2 et SCM1 ; (S) Scmh1
Sex combs extra (SCE/dRING)	(H) RING1 ; (S) Ring1A, Ring1B
<u>Suppressor of Zeste 2 (Su(Z)2)</u>	(H) BMI1 ; (S) Mel-18
Suppressor of Zeste 12 (<u>Su(Z)12</u>)	SUZ12

Tableau 5. Les protéines du groupe Trithorax et leurs homologues. Cette liste non exhaustive regroupe les protéines du groupe Trithorax identifiées chez la drosophile ainsi que quelques unes de leurs homologues chez l'Homme (H), la Souris (S) et le Xénope (X). Les protéines soulignées et en rouge sont des *ETP*.

Protéines de drosophile	Homologues
Absent, small or homeotic disc 1 (ASH1)	(H) huASH1
Absent, small or homeotic disc 2 (ASH2)	(H) ASH2L ; (S) ash2l
Brahma (BRM)	(H) HBRM et BRG1 ; (S) brm et brg1
Devenir/Breathless (Dev)	--
Kothalo	(H) trap 230
Kismet (KIS)	(H) EST
Little imaginal discs (LID)	(H) Rb binding protéin 2 ; (S) XE 129
Moira (MOR)	(H) BAF 170 et BAF 155 ; (S) SRG3
mod(mdg4)	--
Osa (OSA)	(S) OSA1
Snf5 related protein 1 (SNR1)	(H) INI1b
Taranis	(H) Y127
Tonalli	--
Trithorax (TRX)	(H) ALL-1/HRX/MLL ; (S) All1
<u>GAGA Factor (GAF)</u>	(H, S, X...) Facteur GAGA
<u>Zeste (Z)</u>	--

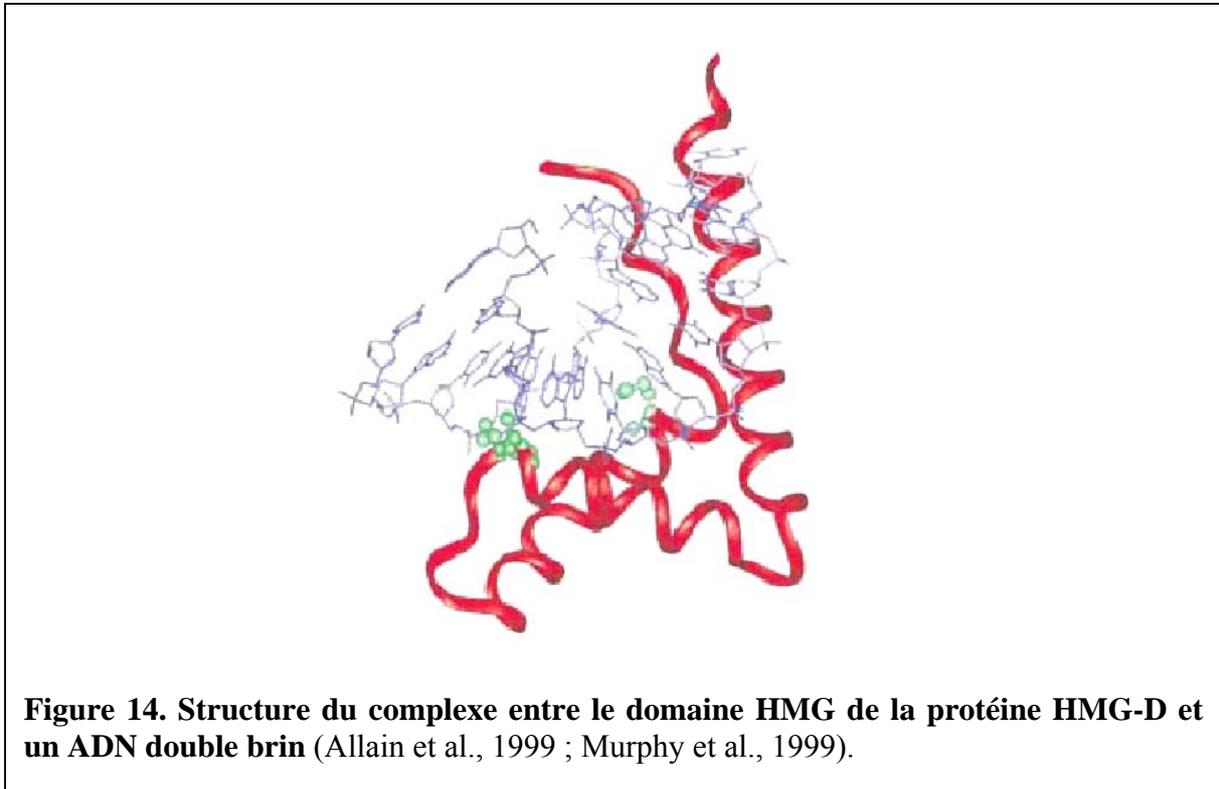
III Rôle de la protéine DSP1 dans la régulation des gènes

Notre équipe travaille sur une protéine de drosophile, DSP1 (Dorsal Switch Protein 1), appartenant à la famille des protéines HMGB (High mobility group). Cette famille se caractérise par la présence d'une ou plusieurs boîtes HMG. Ces protéines se fixent sur l'ADN courbé et induisent, suite à leur fixation, une courbure plus importante. Grâce à l'étude d'un mutant nul *dsp1¹* généré au laboratoire, il a été montré que la protéine DSP1 appartient à la famille des TrxG ou PcG suivant le locus considéré (Decoville et al., 2000) et participe à la mémoire cellulaire.

III.1 Famille HMGB et domaine HMG

L'ensemble des protéines appartenant à la famille HMGB est caractérisé par l'existence d'un ou plusieurs domaines HMG. Ce domaine détermine principalement les propriétés de liaison à l'ADN de ces protéines. Sur les 80 acides aminés qui le constituent, seuls quelques-uns sont fortement conservés au sein des protéines de cette famille. Aromatiques ou basiques pour la plupart, ces acides aminés conservés sont impliqués dans le maintien de la structure tridimensionnelle du domaine et dans l'interaction avec l'ADN (Baxevanis and Landsman, 1995 ; Bustin, 1999 ; Falciola et al., 1994 ; Grosschedl et al., 1994 ; Teo et al., 1995 ; Weir et al., 1993 ; Wisniewski et al., 1997 ; Xu et al., 2002). Les études structurales de différents domaines HMG montrent une conservation de la structure tertiaire en forme de L. Le domaine comporte trois hélices α comprenant 75% des acides aminés du domaine. Ces trois hélices α et la région N-terminale du domaine se replient en deux bras formant entre eux un angle d'environ 80° (Broadhurst et al., 1995 ; Read et al., 1993 ; Weir et al., 1993 ; Xu et al., 2002). Le domaine HMG se fixe préférentiellement au niveau des petits sillons élargis de l'ADN, des jonctions à quatre voies, de l'ADN modifié par le cis platine, de l'ADN relâché, ou encore au niveau de l'ADN des points d'entrée et de sortie des nucléosomes (Bianchi et al., 1989 ; Bianchi et al., 1992 ; Bianchi and Beltrame, 2000 ; Bustin, 1999 ; Hughes et al., 1992 ; Pil and Lippard, 1992 ; Wright and Dixon, 1988). La face concave du domaine HMG interagit avec le petit sillon de la double hélice d'ADN. Dans ce cas, des résidus d'acides aminés hydrophobes se positionnent à l'intérieur du sillon et une série de résidus basiques interagit avec le squelette phosphodiester (figure 14). Certains acides aminés

hydrophobes de cette face concave s'intercalent partiellement entre les bases, ce qui provoque l'élargissement du petit sillon, le déroulement de la double hélice, et sa courbure vers le grand sillon (Allain et al., 1999 ; Murphy et al., 1999).



Cette famille HMGB est subdivisée en deux groupes. Les protéines de la classe 1 sont des protéines qui possèdent plusieurs domaines HMG et qui reconnaissent des structures courbées de l'ADN. Ce groupe comprend entre autre la protéine HMGB1 (Pauken et al., 1994) qui est une protéine ubiquitaire, ainsi que les protéines HMGB2 (Shirakawa and Yoshida, 1992) et HMGB3 (Vaccari et al., 1998). Ces trois protéines possèdent deux domaines HMG notés A et B et un domaine riche en résidus d'acides aminés acides dans la partie C-terminale. Le facteur de transcription mitochondrial mtTF-1 (Parisi and Clayton, 1991), ainsi que le facteur de transcription nucléolaire UBF (Upstream Binding Factor) (Jantzen et al, 1990), appartiennent également à cette classe. Ces deux protéines contiennent respectivement deux et six domaines HMG. La protéine DSP1, avec ses deux domaines HMG, est apparentée à cette famille (Lehming et al., 1994) et serait plus particulièrement

l'homologue chez la drosophile de la protéine HMGB1 des mammifères (Canaple et al., 1997). Les protéines HMGB de la classe 1 semblent impliquées dans des phénomènes biologiques très variés comme la recombinaison, la réplication, la réparation, la transcription de l'ADN. Ces protéines semblent être recrutées sur l'ADN par des facteurs de transcription spécifiques au moment de la formation d'une structure particulière de la chromatine. Leur rôle serait alors d'induire une courbure de l'ADN afin de mobiliser à leur tour d'autres facteurs nécessaires aux différentes activités biologiques.

La classe 2 des protéines HMGB rassemble des protéines n'ayant qu'un seul domaine HMG. Ces protéines ne sont exprimées que dans certains tissus et se fixent sur des séquences spécifiques d'ADN. On peut citer pour exemples des régulateurs transcriptionnels tels que le facteur SRY (Sex determining Region Y) qui est le déterminant du sexe mâle chez les mammifères (Sinclair et al, 1990), les facteurs activateurs lymphoïdes TCF-1 (T Cell Factor-1) et LEF-1 (Lymphocyte Enhancer Factor-1) (Travis et al., 1991 ; van de Wetering and Clevers, 1992 ; Waterman et al., 1991). On retrouve des protéines de cette classe chez la drosophile comme la protéine Pangolin, qui intervient dans la voie de transduction Wg (Brunner et al., 1997).

III.2 Organisation de la protéine DSP1

La protéine DSP1 est une protéine longue de 386 acides aminés et d'une masse moléculaire de 44 kDa (Canaple et al., 1997). Elle peut être divisée en deux régions. La partie N-terminale comporte deux régions riches en résidus glutamine d'environ une trentaine de résidus d'acides aminés. La deuxième moitié de la protéine présente une forte homologie de structure primaire avec les protéines HMGB1 et 2 des mammifères (Lehming et al., 1994). Cette partie est constituée de deux domaines HMG notés A et B et d'une région C-terminale riche en résidus acides. Les domaines HMG de DSP1 possèdent respectivement 70% et 40% d'identité avec les domaines HMG correspondants des protéines HMGB1 et 2 humaines. La région C-terminale acide de DSP1 est plus courte que celles des protéines HMGB1 et 2 (figure 15). Des études préliminaires menées au laboratoire ont montré que les boîtes HMG de DSP1 permettent des interactions de type : ADN-protéine mais aussi protéine-protéine (Decoville et al., 2000).

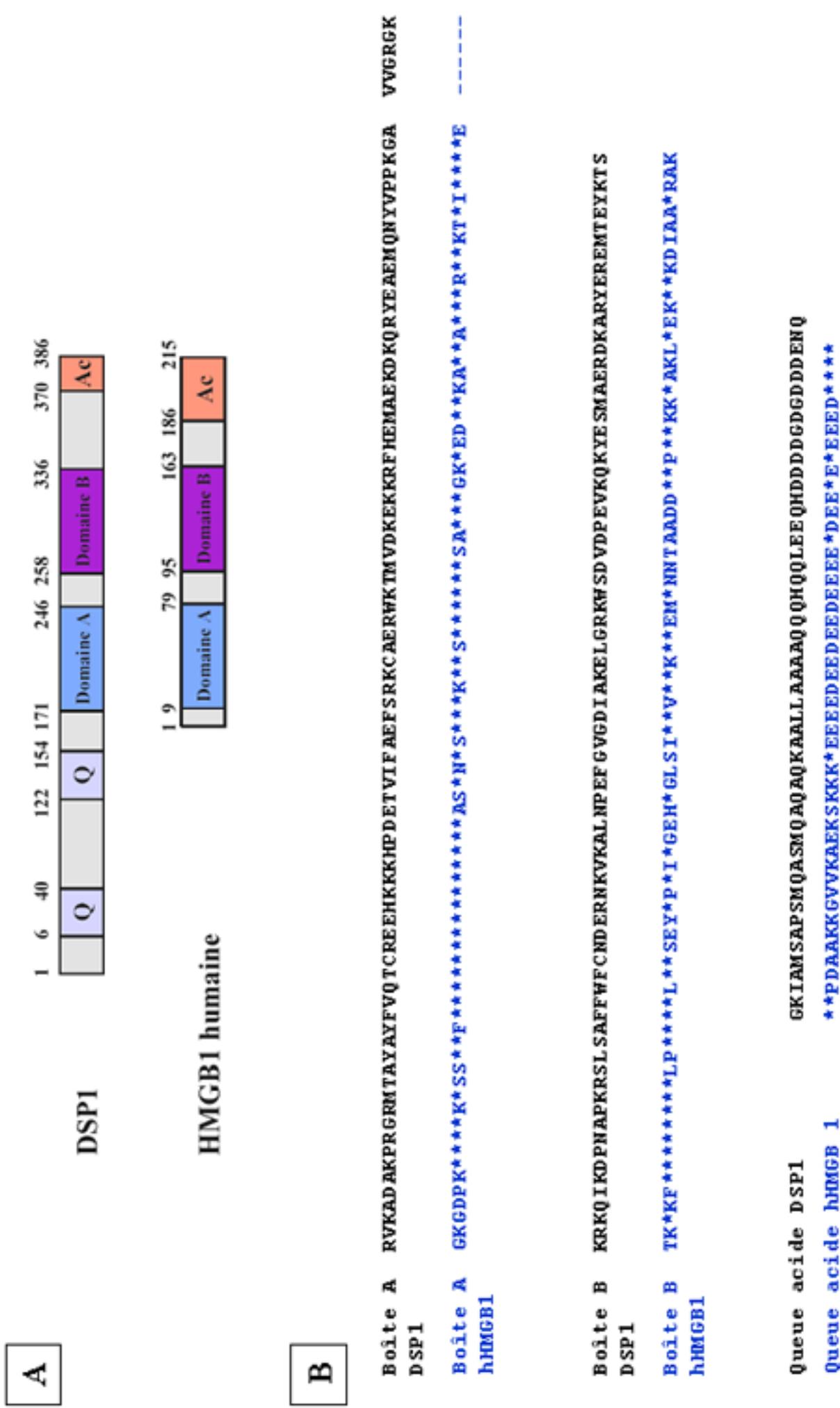


Figure 15. Représentation schématique (A) et alignement des séquences (B) des protéines DSP1 de drosophile et HMGB1 humaine.
Abréviations sur le schéma des protéines : Q correspond aux régions riches en résidus glutamine, Ac correspond à la région riche en résidus d'acides aminés acides.

III.3 Expression de la protéine DSP1 lors du développement et chez l'adulte

Le laboratoire s'est attaché à élucider le(s) rôle(s) biologique(s) de DSP1 chez la drosophile. La protéine DSP1 et son messenger ont été recherchés à différents stades du développement jusqu'au stade adulte dans différents tissus. Au cours de l'ovogenèse, la protéine DSP1 apparaît dans le cytoplasme des cellules nourricières, puis elle est déversée dans les ovocytes. Aux stades les plus précoces de l'embryogenèse (stades 1 à 6), la protéine DSP1 est faiblement détectée, il s'agit de la protéine DSP1 d'origine maternelle. L'ARNm *dsp1* zygotique est synthétisé à partir du stade blastoderme cellulaire. La protéine est alors présente dans le noyau de toutes les cellules de l'embryon. Ceci suggère un rôle général de DSP1 au cours du développement précoce. Au fur et à mesure du développement de l'embryon, la localisation de la protéine se restreint à l'épiderme et au système nerveux central, puis uniquement au cerveau, aux disques imaginaux et dans les glandes salivaires au stade larvaire. Chez l'adulte, on retrouve DSP1 dans le cerveau et dans les cellules nourricières des ovaires (Mosrin-Huaman et al., 1998).

III.4 DSP1 et la régulation de l'expression des gènes

Afin de mieux comprendre le rôle biologique de la protéine DSP1 chez la drosophile, il a été obtenu au laboratoire par mutagenèse à l'élément P, un mutant nul pour le gène *dsp1*. Cet allèle noté *dsp1¹* a perdu l'ensemble du gène *dsp1* et uniquement ce gène. A l'état homozygote cet allèle est peu viable, peu fertile et montre un phénotype très pléiotrope (Mosrin-Huaman et al., 1998 ; Decoville et al., 2001). On remarque en particulier les transformations homéotiques suivantes : (i) Transformation du segment thoracique T3 en segment thoracique T2 pour 3 individus sur 1000. Ce phénotype se traduit par la transformation de l'haltère en aile. (ii) Transformation du segment thoracique T1 en T2 qui se caractérise par une diminution du nombre de dents au niveau des peignes sexuels des mâles (6 dents pour les mutants contre 11 pour les sauvages). Tous les mâles sont affectés. (iii) Transformation du segment abdominal A6 en A5 se traduisant par l'apparition de soies ectopiques sur le sternite A6 pour 20% des mâles.

Ces transformations homéotiques dues à l'absence de DSP1 miment des mutations perte de fonction de différents gènes homéotiques tels que *Ubx*, *Scr* et *Abd-B*. Il a été montré au laboratoire que l'expression de *Scr* diminue très fortement dans un contexte mutant pour *dsp1* (Decoville et al., 2001). De plus, des études d'interactions génétiques montrent que ces phénotypes sont aggravés en contextes mutants perte de fonction pour les gènes *Ubx*, *Scr*, *Abd-B* et certains *trxG*. Au contraire, la mutation *dsp1¹* corrige en partie le phénotype caractéristique de mutants perte de fonction *PcG*. Par ailleurs, la surexpression de DSP1 augmente la fréquence des transformations homéotiques de mutants *PcG*. La protéine DSP1 appartient donc aux protéines du groupe TrxG.

L'un des traits phénotypiques présentés par le mutant *dsp1¹* est malgré tout corrélé à une mutation d'un gène *PcG*. En effet, on observe chez 50% des mâles des taches pigmentées noires sur le tergite A4, un défaut révélateur d'une transformation partielle du segment abdominal A4 en A5. Cette transformation homéotique ressemble à des mutations touchant la région *MCP*. *MCP* est une région frontière de 300 pb qui permet aux régions de régulation *iab-4* et *iab-5* des gènes *abd-A* et *Abd-B* de fonctionner indépendamment (figure 16). Une délétion de cette région entraîne une expression ectopique d'*Abd-B* dans le segment A4, ce qui se traduit par une pigmentation de ce segment. Cette région *MCP* se caractérise par une hypersensibilité à la DNase (Karch et al., 1994). Des expériences de digestion à la DNase de chromatine extraite d'embryons de drosophiles sauvages ou mutantes (Decoville et al., 2001) montrent l'absence de cette région d'hypersensibilité à la DNase chez le mutant nul *dsp1¹*. Ces résultats montrent que la protéine DSP1 est capable de remodeler la chromatine au niveau du locus *MCP*. Ainsi, il a été proposé que la protéine DSP1 est directement impliquée dans la régulation de l'expression des gènes homéotiques et participe au remodelage de la chromatine des régions régulatrices de ces gènes. En conclusion, DSP1 se comporte soit comme une protéine TrxG, soit comme une protéine PcG selon le gène considéré.

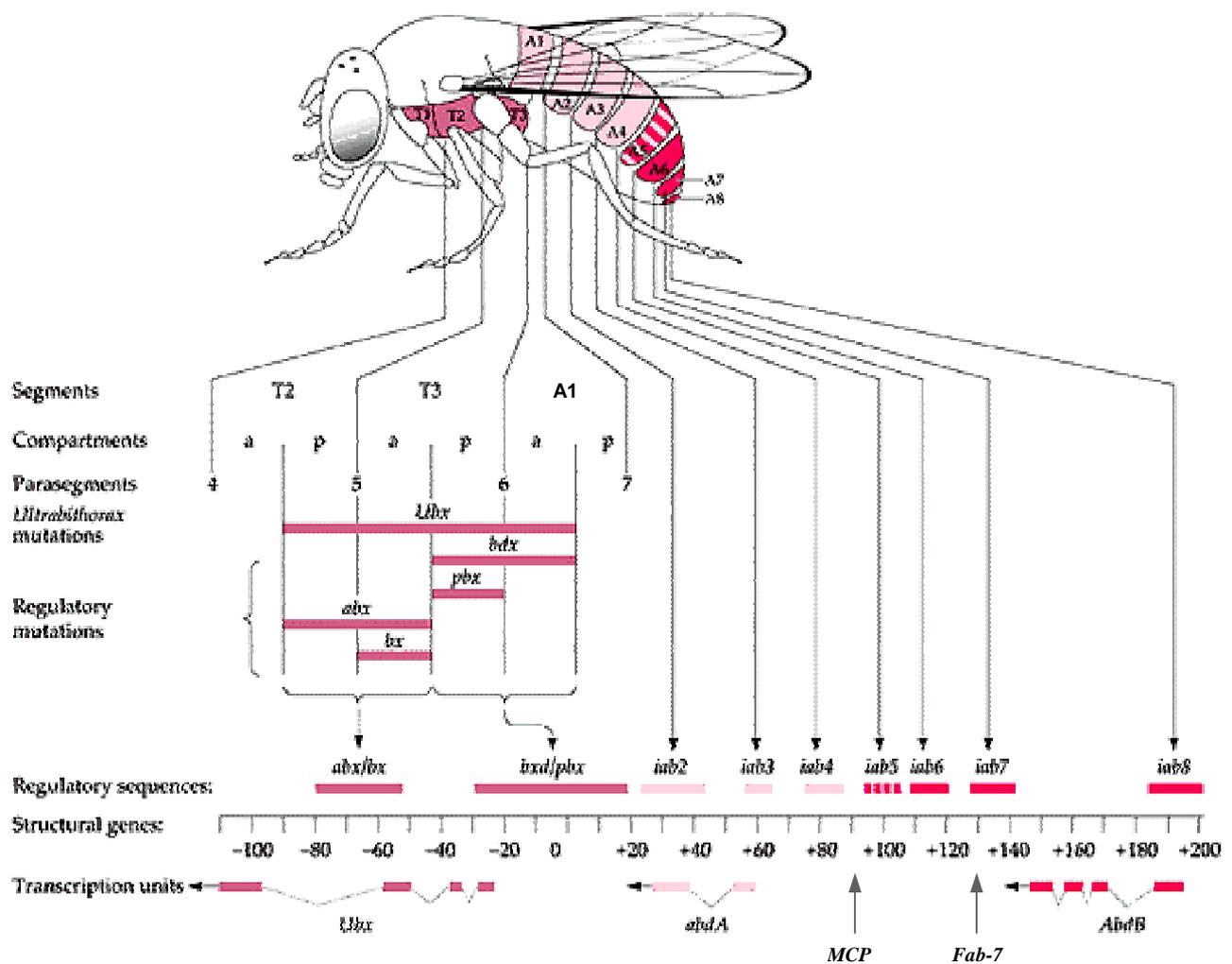


Figure 16. Organisation du complexe *Bithorax* (*BxC*). Sous le dessin de la drosophile sont indiquées les régions de contrôle du gène *Ultrabithorax* (*Ubx*). La ligne continue du bas représente les 300 kb du complexe. Les trois unités de transcription qui codent pour les trois protéines homéotiques du complexe *Bithorax* sont représentées en-dessous. Les exons sont représentés par les rectangles et les introns par les lignes pointillées. De part et d'autre de la ligne, on trouve les séquences régulatrices mises en évidence par des mutations génétiques. Abréviations : *abx* (*anterobithorax*), *bx* (*bithorax*), *bxd* (*bithoraxoïd*), *pbx* (*postbithorax*), *iab* (*infra-abdominal*), *MCP* (*Miscadastral Pigmentation*), *Fab-7* (*Fronta-abdominal-7*), *abd-A* (*abdominal-A*) et *Abd-B* (*Abdominal-B*). (D'après Gilbert, 1996).

Le phénotype pléiotrope du mutant *dsp1¹* suggère que DSP1 ne se limite à la régulation de l'expression des gènes homéotiques. Par exemple, la présence d'anomalies cuticulaires chez les embryons et la perte totale ou partielle du segment abdominal A4 chez les adultes de la souche mutante *dsp1¹* montrent le rôle de la protéine dans la régulation des gènes contrôlant la segmentation embryonnaire. Les expériences d'immunomarquage de DSP1 sur les chromosomes géants des glandes salivaires révèlent plus d'une centaine de bandes de fixation discrètes (tableau 6) ([Igor Zhimulev, communication personnelle](#)). Ceci indique que DSP1 participe à la régulation de nombreux gènes.

Tableau 6. Localisation de DSP1 sur les chromosomes polyténiques de la souche sauvage Oregon-R.

X	2L	2R	3L	3R	4
2C	21A	43A	61A	82E	
2D	21C	44A	61C	84A	
3E	22A	44C	61E	84B	
4C	22B	44D	61F	84C	
5A	23A	45A	62C	84D	
6E	24A	46A	63A	84F	
7B	24F	46C	63B	85A	
8A	25A	46D	63E	85C	
8B	25E	47A	63F	85F	
8E	25F	47B	64D	86A	
9A	26A	47D	64E	86C	
9F	26F	47E	65A	86D	
12A	27A	48A	66A	86E	
12E	27C	48C	66B	87B	
12F	28A	49A	66C	87C	
13E	28B	49F	66D	87D	
15D	28C	50C	67C	88A	
16A	28D	51A	67D	88C	
16B	29E	53C	67F	88D	
16D	29F	54A	68A	88E	
17A	30A	54B	68C	89A	
17D	33A	55F	69C	89B	
18A	33B	56A	69D	89D	
20A	34A	56C	69E	89E	
	34D	56F	70C	90A	
	35A	57E	70D	90B	
	35D	57F	70E	92A	
	35E	58A	70F	92B	
	36C	58D	71A	92C	
	36D	59A	71B	92D	
	37C	59D	71F	92F	
	37D		73F	93E	
	38C		75C	93F	
	38E		75D	94A	
			75F	94D	
			76C	95A	
			77A	95B	
			77B	96A	
			77D	97A	
			77E	98C	
			78A	99A	
			78B	99B	
			78C	99E	
				100A	
				100B	

IV Sujet de recherche

Actuellement plusieurs questions essentielles sont posées en biologie. Comment sont recrutées les protéines PcG et TrxG sur leurs cibles ? Comment s'exerce le maintien de l'état transcriptionnel des gènes au cours du temps ? Est-ce que les mécanismes moléculaires de la mémoire cellulaire sont conservés et s'appliquent à l'ensemble des gènes cibles des protéines PcG et TrxG ?

A la recherche des cibles de DSP1 et de son rôle biologique

Le travail de thèse que nous présentons ici a pour objectif la recherche des gènes cibles de DSP1 et du rôle biologique de cette protéine dans la régulation de l'expression de ces gènes. La technique d'immunoprécipitation de la chromatine pontée (ChIP) que nous avons développée au laboratoire (figure 17), nous a permis de proposer des cibles préférentielles de DSP1 sur l'ensemble du génome. La réalité biologique de plusieurs de ces cibles a été validée *in vivo* par des études d'interactions génétiques et de lignées transgéniques.

Nous avons étudié plus particulièrement le rôle de DSP1 sur plusieurs de ses cibles : le CMM *Fab-7* du gène *Ultrabithorax*, le CMM *Scr10XbaI* du gène *Sex combs reduced* et la région régulatrice du gène *knirps*. Dans le cas du CMM *Fab-7*, nous montrons par des études de ChIP à haute résolution que DSP1 se fixe sur un CMM minimal de 219 pb nommé *Ab-Fab*. Nous avons voulu mettre en évidence un rôle de DSP1 dans l'activité répressive de ce domaine régulateur. Nous montrons par des études de lignées transgéniques dans lesquelles *Ab-Fab* a été placé en amont d'un gène rapporteur que l'absence de DSP1 sur ce CMM altère son activité répressive et la fixation des PcG. Ces résultats ont également été observés dans le cas du CMM du gène *en*. Ainsi nous montrons pour la première fois que la protéine DSP1 agit en tant que recruteur des PcG suivant le locus considéré au cours de l'embryogenèse. Au contraire, l'observation du mutant *dsp1¹* indique que DSP1 régule l'expression de *Scr* au cours de la vie larvaire. Nous avons voulu montrer que DSP1 régule l'activité de *Scr* via le CMM *Scr10XbaI*. L'utilisation de lignées transgéniques où le CMM a été placé en amont d'un gène rapporteur nous a permis de montrer que DSP1 interagit avec *Scr10XbaI* pour maintenir l'activation de *Scr* au cours de la vie larvaire. Enfin, le phénotype du mutant *dsp1¹*

suggère que la protéine intervient dans la régulation du gène lacunaire *kni*. Nous avons regardé par des expériences d'immunolocalisation si l'absence de DSP1 a une incidence sur l'expression de *kni*. Après confirmation du rôle de DSP1 dans la régulation de ce gène, nous avons recherché des partenaires protéiques. DSP1 interagit avec BCD, un facteur de transcription activateur du gène *kni*. Les résultats que nous présentons ici nous ont permis de discuter du rôle de DSP1 en tant qu'activateur de l'expression du gène *kni*.

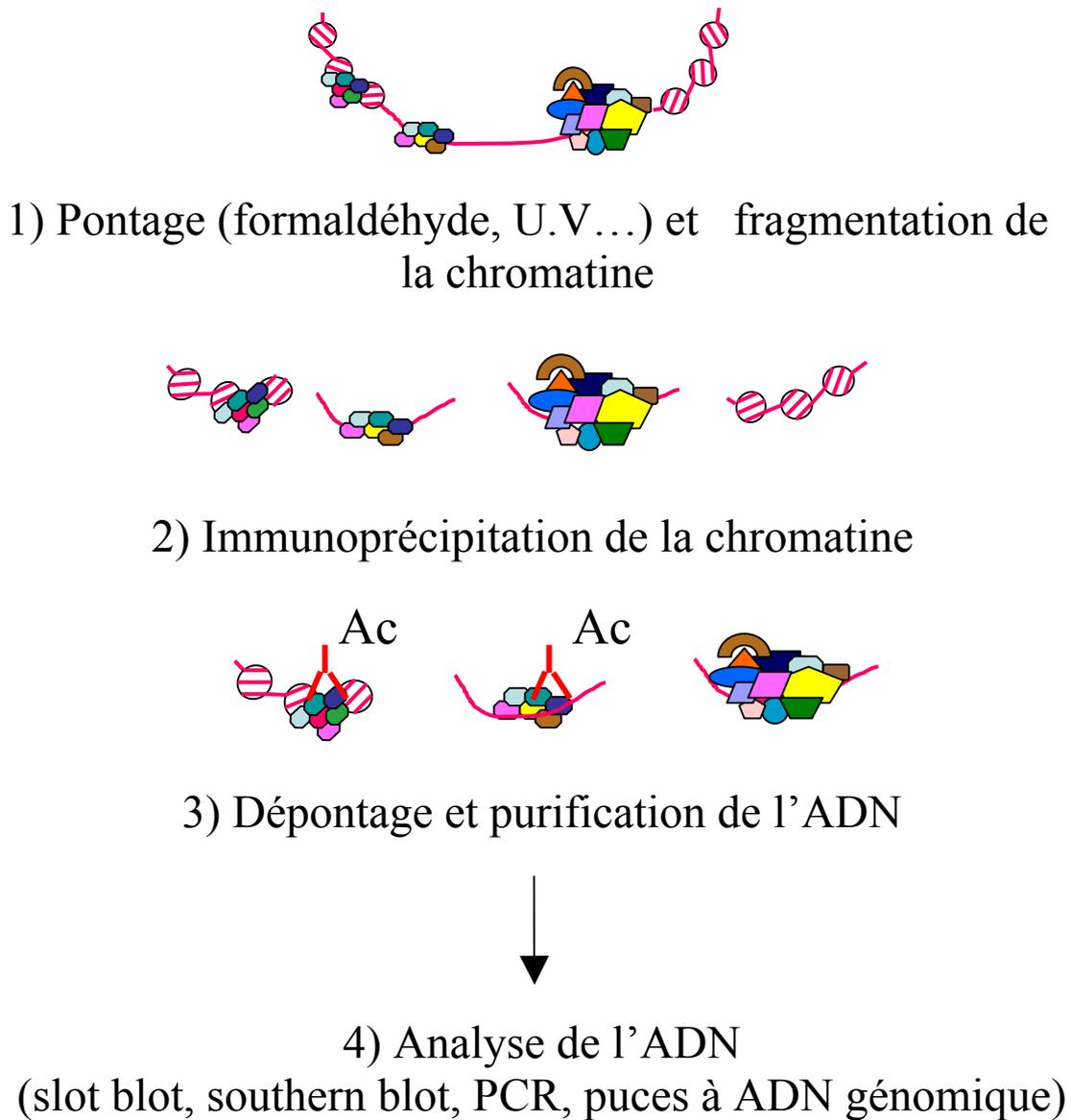


Figure 17. Représentation schématique des différentes étapes de la technique de ChIP. 1) Pontage de l'ADN aux protéines chromatinienne et fragmentation par sonication de la chromatine pontée. 2) Ajout de l'anticorps spécifique (anti-DSP1) et immunoprécipitation avec de la protéine A-sépharose. 3) Purification des fragments d'ADN immunoprécipités. 4) Analyse de l'ADN enrichi par immunoprécipitation avec l'anticorps anti-DSP1.

Résultats

I Cibles de DSP1 sur les complexes Antennapedia et Bithorax

I.1 DSP1 est nécessaire à la régulation spatio-temporelle de Scr

I.1.1 Introduction à l'article 1

Comme le suggère le phénotype du mutant *dsp1*¹ et les résultats d'immunolocalisation sur les chromosomes géants des glandes salivaires, des cibles évidentes de la protéine DSP1 sont les régions de régulation des gènes homéotiques. Ces gènes s'organisent en deux complexes *Bithorax* (*BxC*) et *Antennapedia* (*AntpC*). Contrairement au complexe *BxC* où de nombreuses études ont été réalisées, nous ne disposons à l'heure actuelle que de très peu d'informations concernant les mécanismes de régulation employés au sein du complexe *AntpC*. Dans le but d'éclaircir ces mécanismes, nous nous sommes intéressés au cours de cette première étude à l'implication de la protéine DSP1 dans la régulation du gène *Sex combs reduced* (*Scr*) dont l'expression est considérablement diminuée dans le segment T1 du mutant *dsp1*¹ (Decoville et al., 2001).

Le gène *Scr* inclus dans le complexe *AntpC* est nécessaire à l'établissement et au maintien de l'identité morphologique des segments thoraciques et du labium (Pattatucci et al., 1991 ; Sato et al., 1985 ; Wakimoto and Kaufman, 1981). Des fragments d'ADN issus du complexe *AntpC* ont été sous-clonés et ont permis de mettre en évidence des domaines régulateurs du gène *Scr* répondant aux protéines PcG et TrxG (Gindhart and Kaufman, 1995). Nous avons décidé d'étudier plus particulièrement le lien entre DSP1 et l'un de ces domaines : *Scr10.0XbaI*. Ce domaine de 10 kb induit spécifiquement l'expression d'un gène rapporteur au niveau du segment thoracique T1 chez l'embryon et dans les disques imaginaux T1 (Gindhart et al., 1995).

Au cours de cette étude, nous avons pu montrer au sein d'une lignée transgénique (*Scr10.0XbaI*) apportant le domaine régulateur de 10 kb en amont du gène rapporteur *lacZ*, le

rôle de DSP1 dans le maintien de l'expression de ce gène rapporteur au cours de la vie larvaire. La création d'un nouveau site de fixation de DSP1 sur les chromosomes polyténiques de la lignée transgénique montre que la fonction d'activateur de DSP1 repose sur une interaction physique entre cette protéine et la région régulatrice. Des expériences de ChIP couplées à une analyse par southern blot de l'ADN immunoprécipité, nous ont permis de préciser la fixation de DSP1 sur le domaine régulateur de 10 kb. Deux régions de 1 kb apparaissent comme les cibles préférentielles de la protéine. L'ensemble de ces résultats nous fournit des éléments permettant de discuter de l'implication de DSP1 dans la régulation spatio-temporelle du gène *Scr*.

DSP1, a *Drosophila* HMG protein, is involved in spatiotemporal expression of the homoeotic gene *Sex combs reduced*

Aurélien Rappailles¹, Martine Decoville and Daniel Locker

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

Background information. The *Pc-G* (*Polycomb* group) and *trx-G* (*trithorax* group) genes play a key role in the regulation of the homoeotic genes. The homoeotic gene *Scr* (*Sex combs reduced*) contained in the *Antennapedia complex* specifies segmental identity of the labial and prothoracic segments in *Drosophila*. Regulation of *Scr* requires the action of different enhancer elements spread over several kilobases. We previously identified an HMGB (high mobility group)-like protein DSP1 (dorsal switch protein 1), which works like a *trx-G* protein for the normal *Scr* expression.

Results. In the present study, we attempted to characterize the regulatory sequences involved in the maintenance of the *Scr* activation by DSP1. We report here, using a transgenic line for the *Scr10.0Xbal*-regulatory element, that lack of DSP1 affects the function of a reporter gene in legs' imaginal discs but not in embryos. We show by immunolocalization that DSP1 is recruited on polytene chromosomes to the insertion site of the transgene. Moreover, using chromatin immunoprecipitation experiments, we identify two regions of 1 kb in *Scr10.0Xbal* as the main DSP1 targets.

Conclusion. These results provide strong evidence that the *Scr* gene expression is influenced by direct interaction between DSP1 and two *Scr* regulation elements. In addition, our results show that this interaction undergoes dynamic changes during development.

Introduction

BX-C (*Bithorax complex*) and *ANT-C* (*Antennapedia complex*) are the two homoeotic gene clusters in the *Drosophila* genome that specify the identities of head, thoracic and abdominal segments (Kaufman et al., 1990; Lewis, 1993, 1998). The precise temporal and spatial expression of these loci occurs primarily during embryogenesis of maternal, gap and pair-rule

gene products. Since these regulators are transiently expressed during embryogenesis, a second group of genes maintains heritable activation or repression of homoeotic gene expression later in development. The maintenance genes have been divided into two groups, namely the *Pc-G* (*Polycomb* group) and the *trx-G* (*trithorax* group), which acts as repressor and activator, respectively. *Pc-G* and *trx-G* proteins mediate transcriptional repression or activation by modifying locally the chromatin structure. In *Drosophila*, these proteins associate with DNA regions named *Polycomb* and *Trithorax* response elements (*PRE* and *TRE* respectively).

The *Scr* (*Sex combs reduced*) locus contained in the *ANT-C* is unique in that it directs functions required for both cephalic and thoracic development in embryo

¹To whom correspondence should be addressed (email rapaille@cns-orleans.fr).

Key words: chromatin immunoprecipitation (ChIP), *in situ* hybridization, immunolocalization, *Polycomb* group protein (*Pc-G*), *trithorax* group protein (*trx-G*).

Abbreviations used: *ANT-C*, *Antennapedia complex*; ChIP, chromatin immunoprecipitation; DSP1, dorsal switch protein 1; *Pc-G*, *Polycomb* group; *Scr*, *Sex combs reduced*; SL-2, Schneider line 2; *trx-G*, *trithorax* group; X-Gal, 5-bromo-4-chloroindol-3-yl β-D-galactopyranoside.

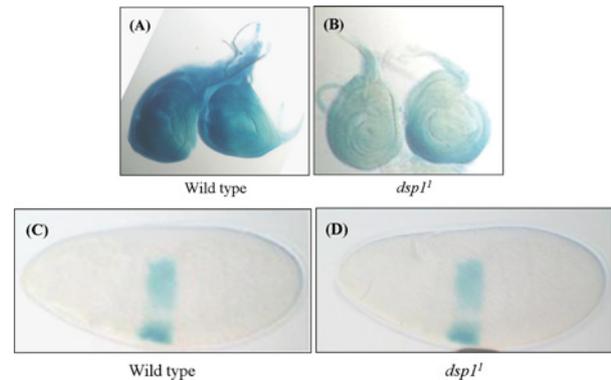
till the final stage of adult fly. Scr protein accumulates during embryogenesis in parasegment 2 (labial and prothoracic segments) with additional expression in the visceral mesoderm of the anterior and posterior midgut and the suboesophageal ganglion of the ventral nerve cord. During larval development, high levels of Scr protein are detected in the labial discs and prothoracic leg discs, with additional expression in other imaginal tissues. The developmental regulation of *Scr* expression appears to be very complex, because *Scr* mutations map to an 80 kb interval that includes > 40 kb of upstream regulatory DNA (for a review see Kaufman et al., 1990). Gindhart and Kaufman (1995) have identified regulatory sequences involved in the maintenance of *Scr* expression by *Pc-G* and *trx-G* gene products. These sequences are located 15 kb downstream and 40 kb upstream of the *Scr* transcriptional start site, and genetic interactions of a subset of *Pc-G* or *trx-G* loci with these fragments suggests that some *Pc-G* and *trx-G* proteins interact directly or indirectly with sequences to maintain a transcriptionally repressed or activated state.

DSP1 (dorsal switch protein 1) is a *Drosophila* HMGB (high mobility group)-like protein, which acts as a *trx-G* or *Pc-G* protein depending on the locus considered (Decoville et al., 2001). It is expressed in a relatively ubiquitous manner during embryogenesis, and is also detected in the imaginal tissues. A *dsp1* null mutant (*dsp1*¹) shows various homoeotic transformations, in particular a reduction in the size of the sex comb that mimics loss-of-function mutation in the *Scr* gene. In addition, we have shown that *Scr* expression is reduced in T1 imaginal discs in *dsp1*¹ mutant, but not in embryos. This strongly suggests that DSP1 participates in the maintenance of *Scr* expression like a *trx-G* gene product in T1 imaginal disc.

The aim of the present work was to characterize the regulatory sequences involved in the maintenance of *Scr* activation by DSP1. We used a transgenic *Drosophila* strain containing a reporter gene (*lacZ*) under the control of an *Scr* regulatory sequence (*Scr10.0XbaI*). We compared the pattern of expression of the reporter gene in embryos and imaginal tissues in the wild-type and *dsp1* mutant contexts. Immunolocalization of DSP1 on polytene chromosomes and ChIP (chromatin immunoprecipitation) experiments allowed us to demonstrate a physical

Figure 1 | Loss of DSP1 modifies β -galactosidase activity regulated by the *Scr10.0XbaI* fragment in prothoracic imaginal discs

β -Galactosidase expression pattern in prothoracic imaginal discs and embryos: (A, C) wild-type Oregon-R; (B, D) *dsp1*¹ mutant. The expression of β -galactosidase is reduced in *dsp1*¹ prothoracic imaginal discs but not in the embryo.



interaction of DSP1 with the *Scr* regulatory element and to identify two regions of size 1 kb involved in the activation of *Scr* transcription by DSP1.

Results

Lack of DSP1 spatiotemporally modifies *lacZ* reporter gene regulation by the *Scr10XbaI* regulatory fragment

In a first attempt to characterize the *Scr*-regulatory sequences involved in DSP1 activation, we used a *lacZ* reporter gene under the control of a *Scr*-regulatory element described by Gindhart and Kaufman (1995). We focused on the *Scr10.0XbaI* fragment located 40–50 kb upstream of the *Scr* transcription start site. This element has been shown to direct the *Scr-lacZ* expression in the prothoracic segment, and to be a target for *Pc-G* and *trx-G* proteins. Expression of *lacZ* in T1 imaginal disc was studied in male larvae from Oregon R strain or from crosses between *dsp1*¹/*dsp1*¹ females and *dsp1*¹/*Y*; *Scr-lacZ*/*CyO* males. In wild-type larvae, we observed a coloration in all parts of the disc but the signal was stronger in a sector of cells between the central knob and peripheral margin up to the stalk, which corresponds to the *Scr* expression pattern (Figure 1A). In contrast, hemizygote larvae for the *dsp1*¹ allele showed a reduced coloration in T1 imaginal disc

DSP1 is involved in expression of the *Scr* gene

(Figure 1B). This result indicates that the *lacZ* expression through the *Scr10.0XbaI* is not maintained in the absence of DSP1. To know if this is specific to imaginal discs, a similar experiment has been performed in embryos. Wild-type embryos stained for β -galactosidase activity showed *lacZ* expression in labial and T1 segments (Figure 1C). Approximately 300 embryos resulting from a cross between *dsp1¹/dsp1¹* females and *dsp1¹/Y; Scr-lacZ/Cy0* males were also stained for β -galactosidase activity. All embryos showed the same pattern of *lacZ* expression, restricted to the parasegment 2 as in wild-type embryos (Figure 1D). This result indicates that lack of the DSP1 protein does not alter the *lacZ* expression controlled by the *Scr10.0XbaI* during embryogenesis. Thus, it appears that the *Scr10.0XbaI* fragment could be the target of DSP1 to maintain the activation of *Scr* in imaginal discs.

DSP1 is recruited to *Scr10.0XbaI*

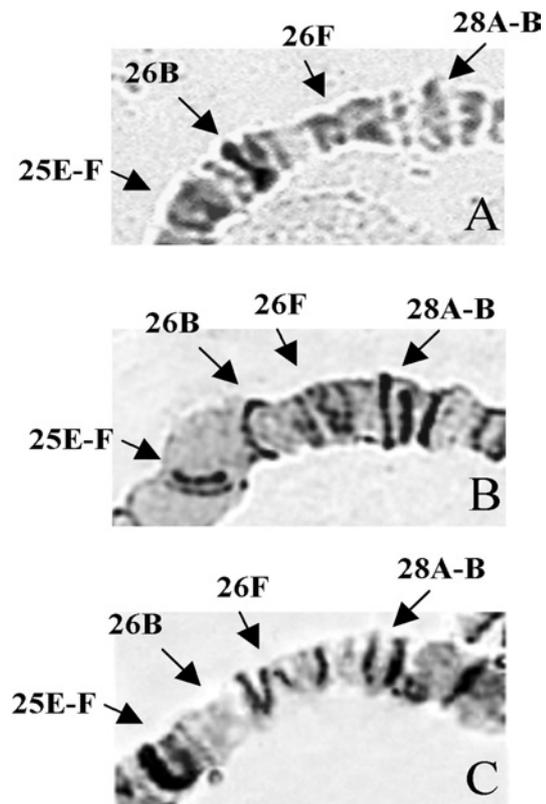
To demonstrate that the *Scr10.0XbaI* fragment is a target of DSP1 in larvae, we used the strain carrying the *Scr10.0XbaI-lacZ* transgene to show that DSP1 is recruited to the site of transgene insertion. Because the precise location of the transgene was not determined, we first realized an *in situ* hybridization experiment on polytene chromosomes using a probe specific for the transgene. As shown in Figure 2(A), a hybridization signal is clearly detected at position 26B. Immunostaining of polytene chromosomes from this transgenic strain with anti-DSP1 antibodies revealed a strong signal at the same position (Figure 2B). In contrast, no signal at 26B was detected on wild-type polytene chromosomes (Figure 2C). This result clearly demonstrates that DSP1 is recruited to the transgene insertion site.

Scr10.0XbaI fragment is a direct target of DSP1 regulation

To identify precisely the target sequence(s) of DSP1, we performed a ChIP experiment. As starting material we chose *Drosophila* SL-2 (Schneider line 2) tissue culture cells. These cells were used previously in ChIP experiments to determine the target sequences of various Pc-G or trx-G proteins in the *Bithorax complex* (Strutt and Paro, 1999). Four fragments of sizes between 2 and 2.5 kb encompassing the *Scr10.0XbaI* fragment were generated by PCR (Fig-

Figure 2 | Recruitment of DSP1 to *Scr10.0XbaI* fragment

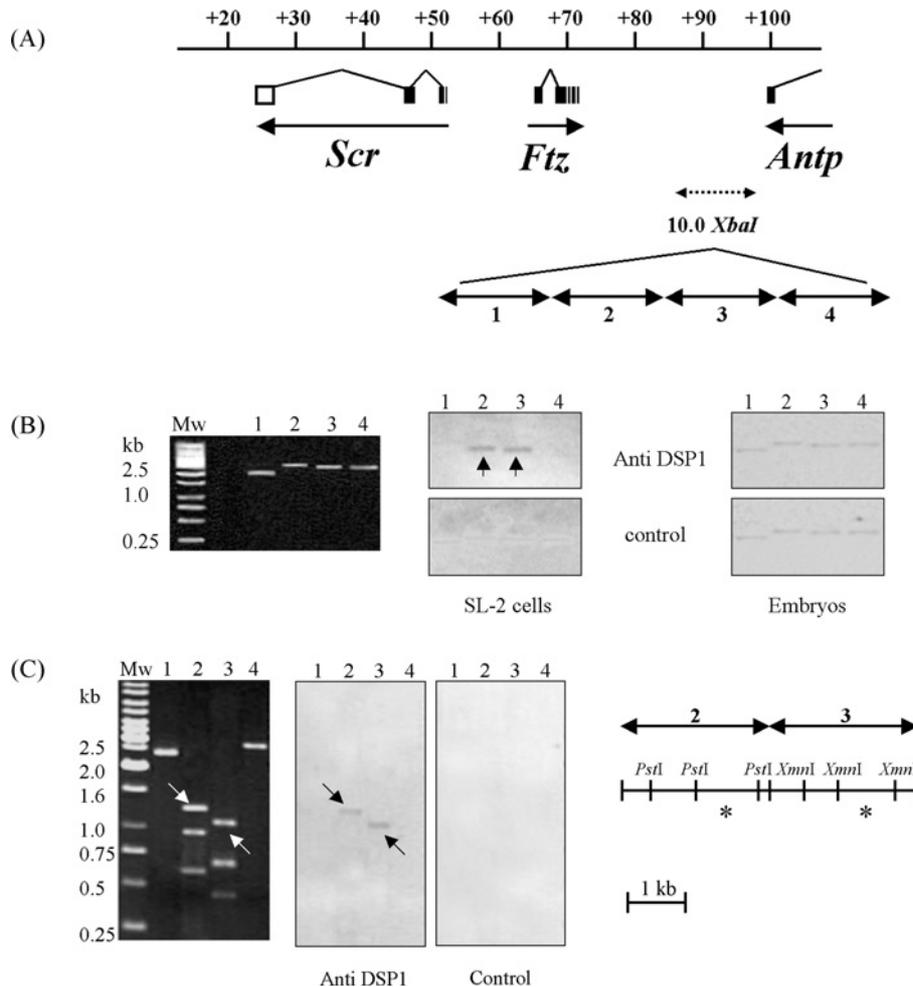
(A) *In situ* hybridization of the *Scr10.0XbaI* probe to polytene chromosomes from an *Scr10.0XbaI* transformant line shows a chromosomal insertion site at position 26B. Immunolocalization of DSP1 on polytene chromosomes from (B) *Scr10.0XbaI* transformant strain and (C) the wild-type. A new DSP1-binding site coincides with the site of transgene insertion.



ure 3A) and probed with the DNA immunoprecipitated with anti-DSP1 antibodies or with preimmune serum as a control (Figure 3B). A very weak signal was detected in the control experiment. In contrast, the two central fragments 2 and 3 were strongly hybridized (the ratio DSP1/control was > 10). The high enrichment of these two fragments in DNA immunoprecipitated with anti-DSP1 antibodies indicates that sequences contained in these fragments are targets of DSP1. Next we tried to refine the target sequences of DSP1 in these fragments. They were subjected to digestion by restriction enzymes to obtain fragments of approx. 1 kb or less in size. After hybridization with DNA immunoprecipitated with anti-DSP1 antibodies, only two fragments were revealed

Figure 3 | Direct binding of DSP1 to *Scr10.0XbaI*

(A) Molecular organization of the *Scr* locus and location of *Scr10.0XbaI*. The four PCR fragments of approx. 2.5 kb covering the *Scr10.0XbaI* region are indicated (1, 2, 3, 4). (B) Results of ChIP experiments performed on SL-2 cells or embryos aged 0–14 h. DSP1 association with the four *Scr10.0XbaI* subfragments is shown. Control indicates immunoprecipitation of the preimmune serum. Arrows show signals corresponding to enriched fragments in DSP1 immunoprecipitation. (C) DSP1 association with restriction digests of the two *Scr10.0XbaI* subfragments 2 and 3 in SL-2 cells. Restriction map is shown on the right. Enriched fragments in DSP1 immunoprecipitation are indicated by arrows and asterisks. Mw, molecular-mass standard.



(Figure 3C), each corresponding to a 1 kb region. These two fragments were not detected in the control experiment. Thus we have identified two regions that bind DSP1 *in vivo*. Since DSP1 does not regulate *Scr* expression in embryos, we could hypothesize that DSP1 does not bind to these fragments in embryos. This was confirmed by ChIP experiments using chromatin from wild-type embryos. DNA from embryos did not show any enrichment for the frag-

ments encompassing the *Scr10.0XbaI* fragment (Figure 3B) when immunoprecipitated with anti-DSP1 antibodies.

Discussion

DSP1 physically interacts with *Scr10.0XbaI*

In a previous paper, we have shown that expression of *Scr* was not correctly maintained in T1 imaginal disc

DSP1 is involved in expression of the *Scr* gene

in the absence of DSP1 (Decoville et al., 2001). In the present study, we demonstrate clearly that DSP1 interacts with *Scr10.0XbaI* to maintain the *Scr* activated state in the imaginal disc. By ChIP experiments, we have identified two subfragments of approx. 1 kb in size, which interact directly or indirectly with DSP1 (1120 and 970 bp). These two fragments are not contiguous but are approx. 1360 bp apart (Figure 3). This raises the question whether these two fragments are two distinct targets of DSP1 or not. One can envisage several explanations. The first one suggests that there are two binding sites for DSP1, one in the 1120 bp fragment and the other in the 970 bp fragment. The second one suggests that DSP1 binds only one fragment, becoming part of a large multiprotein complex. The function of this complex is to remodel locally the chromatin. DSP1 being an HMGB-like protein capable of introducing a curve in DNA, it could participate in this process. As a result of looping of DNA, the second DNA fragment can be brought to DSP1 or an associated protein and consequently be cross-linked and immunoprecipitated with anti-DSP1 antibodies.

How is DSP1 recruited to *Scr10.0XbaI*?

An important question to be addressed is how Pc-G or trx-G complexes are recruited to specific loci. Most of the Pc-G or trx-G proteins do not bind specific-DNA sequences. However, they clearly act through specific DNA response elements (PRE and TRE). Although there are no significant sequence similarities between different PRE/TRE proteins, several short motifs have been identified to be necessary for PRE/TRE function. These include binding sites for three sequence-specific DNA-binding proteins: the PHO (pleiohomoeotic protein) that is a Pc-G member (Mihaly et al., 1998), the GAGA factor (Strutt et al., 1997) and the Zeste protein (Saurin et al., 2001; Hur et al., 2002). It is proposed that these multiple sequence motifs contribute to PRE/TRE function by recruiting subsets of proteins that form the chromatin complex. DSP1 binds preferentially to curved or distorted DNA in a sequence-agnostic manner. Recruitment of DSP1 could be mediated by a sequence-specific DNA-binding protein like PHO or GAGA for example. It is worthy to note that sequence analysis of *Scr10.0XbaI* has revealed three PHO-binding sites (Mihaly et al., 1998). One of these sites is located in the 1120 bp fragment

immunoprecipitated with antibodies directed against DSP1. In addition to this site, we have found other PHO-binding sites according to the consensus sequence defined by Fritsch et al. (1999) and several (GA)_n motifs in the two DNA fragments identified by ChIP experiment (1120 and 970 bp). One can envisage that binding of one or more of these factors on its DNA target results in distortion of DNA so that DSP1 recognizes preferentially these DNA regions.

Interestingly, DSP1 interacts with *Scr10.0XbaI* only at a specific developmental stage. As a matter of fact, interaction was found in imaginal tissues, but not in embryos. Actually, it is well known that Pc-G or trx-G multiprotein complexes vary in their composition during development (Otte and Kwaks, 2003). For example, PHO has been shown to be more crucial for late-larval and pupal stages when compared with the early embryonic development (Poux et al., 2001). In addition, Furuyama et al. (2003) have demonstrated that there are at least two embryonic ESC/E(Z) complexes that undergo dynamic changes during development and a third larval E(Z) complex. It is likely that different recruitment processes take place to provide the necessary variation that is needed for maintenance of transcriptional states during development at different loci. How can we explain the tissue-specific interaction of DSP1 with *Scr10.0XbaI*, knowing that DSP1 is expressed in embryos and larvae? One possibility is the intervention of a tissue-specific cofactor for DSP1. Such a factor has already been described for ASX. Dietrich et al. (2001) have isolated Tantalus, a novel ASX interacting protein that could confer tissue specificity to ASX. For DSP1, such a factor remains to be identified.

Materials and methods***Drosophila* strains and crosses**

Flies were raised on standard medium at 22°C. Isolation of the *dsp1¹* strain was described previously (Decoville et al., 2001). The P{*w⁺m*, *Scr:lacZ* = BSRN + 10Xb}II/CyO line was kindly provided by T.C. Kaufman (Department of Biology, Indiana University, Bloomington, IN, U.S.A.) (Gindhart et al., 1995).

Histochemical detection for β -galactosidase activity

Embryos were collected and dechorionated using standard methods (Ashburner, 1989). Subsequently, embryos were fixed for 15 min at room temperature (20°C) in one-third 3.7% (w/v) formaldehyde and 1 × PBS (pH 7.6) solution and two-thirds heptane. Embryos were rinsed in 1 × PBS and 1% Triton

X-100. β -Galactosidase activity was revealed by incubating the preparation in X-Gal (5-bromo-4-chloroindol-3-yl β -D-galactopyranoside) solution (1 \times PBS, pH 7.6, 4 mM K_4Fe_2 , 4 mM K_3Fe_3 , 1 mM $MgCl_2$, 1% Triton X-100 and 8 mg/ml X-Gal in DMSO) at 37°C. The staining reaction was stopped in 1 \times PBS.

Third instar larvae were dissected in 1 \times PBS and immediately fixed in PBS containing 0.5% glutaraldehyde. After 4 min, preparations were washed three times with PBS and subsequently incubated in the X-Gal solution.

In situ localization of the transposon on polytene chromosomes

Third instar larvae of the $P\{w^{+m}, Scr: lac-Z = BSRN + 10Xb\}II/CyO$ line were grown at 18°C on rich medium supplemented with yeast. Dissection of salivary glands fixation, spreading and polytene chromosome pretreatment were carried out as described by Pardue (1994). We used a specific transposon probe digoxigenin-labelled (DIG DNA labelling and detection kit; Roche, Indianapolis, IN, U.S.A.). Hybridization was performed overnight at 58°C in a humid chamber in hybridization buffer (0.6 M NaCl, 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8, 1 \times Denhardt's solution and 5 mM $MgCl_2$). Slides were washed three times with 2 \times SSC for 15 min at 53°C, twice in 1 \times PBS for 5 min at room temperature, in 1 \times PBS and 0.1% Triton X-100 for 2 min and in 1 \times PBS for 5 min. Hybridization was revealed according to the manufacturer's instructions (DIG DNA detection kit; Roche). The reaction was monitored under a Zeiss microscope and stopped in water. Chromosomes were stained with orcein/lactic acid/acetic acid.

Immunolocalization of DSP1 on polytene salivary gland chromosomes

Fixation, spreading and immunostaining of the chromosomes followed the procedures of Andrew and Scott (1994). For histochemical localization, we used the purified anti-DSP1 antibodies (1:1000) and a secondary biotin-conjugated antibody (1:1000; Sigma). The ABC reagent prepared according to the manufacturer's specifications [VECTASTAIN Elite ABC kit (Standard) PK-6100; Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A.] was applied to the preparations for 40 min. The biotin-labelled sites on the chromosomes were detected with diaminobenzidine 3',3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma). The reaction was monitored under a Zeiss microscope and stopped in PBSTBSS-azide (1 \times PBS, 0.2% BSA, 0.2% Tween 20, 25 μ M Spermine, 50 μ M Spermidine and 0.1% sodium azide) and then washed in PBSTBSS without azide. Banding pattern of polytenes was determined by treating the slides with orcein/lactic acid/acetic acid.

Immunoprecipitation of cross-linked chromatin (ChIP)

ChIP of *Drosophila* SL-2 tissue culture cells was performed by a method described previously in Orlando et al. (1997). The detailed procedure for formaldehyde cross-linking of *Drosophila* embryos is described in Orlando et al. (1998). The immunopurified DNA is used as a probe in Southern-blot analysis. Four PCR fragments of approx. 2.5 kb in length and corresponding to parts of the *Scr10.0XbaI* genomic region were amplified, ran on an agarose gel and transferred on to a hybridiza-

tion membrane (Hybond XL membrane; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, U.S.A.). Membranes were hybridized for 10 h at 65°C, washed and exposed to a phosphorimager screen.

Acknowledgements

We are grateful to A. Soulas for his excellent technical assistance. Special thanks to T. Kaufman for providing *Scr10.0XbaI* transgenic strains.

References

- Andrew, D.J. and Scott, M.P. (1994) Immunological methods for mapping protein distributions on polytene chromosomes. In *Methods in Cell Biology* (Goldstein, L.S.B. and Fyrberg, E.A., eds.), vol. 44, pp. 354–371, American Society for Cell Biology, Academic Press, London
- Ashburner, M. (1989) *Drosophila: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Plainview, NY
- 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
- Dietrich, B.H., Moore, J., Kyba, M., dosSantos, G., McCloskey, F., Milne, T.A., Brock, H.W. and Krause, H.M. (2001) Tantalus, a novel ASX-interacting protein with tissue-specific functions. *Dev. Biol.* **234**, 441–453
- Fritsch, C., Brown, J.L., Kassis, J.A. and Muller, J. (1999) The DNA-binding polycomb group protein pleiohomeotic mediates silencing of a *Drosophila* homeotic gene. *Development* **126**, 3905–3913
- Furuyama, T., Tie, F. and Harte, P.J. (2003) Polycomb group proteins ESC and E(Z) are present in multiple distinct complexes that undergo dynamic changes during development. *Genesis* **35**, 114–124
- Gindhart, Jr, J.G. and Kaufman, T.C. (1995) Identification of Polycomb and trithorax group responsive elements in the regulatory region of the *Drosophila* homeotic gene *Sex combs reduced*. *Genetics* **139**, 797–814
- Gindhart, Jr, J.G., King, A.N. and Kaufman, T.C. (1995) Characterization of the cis-regulatory region of the *Drosophila* homeotic gene *Sex combs reduced*. *Genetics* **139**, 781–795
- Hur, M.W., Laney, J.D., Jeon, S.H., Ali, J. and Biggin, M.D. (2002) Zeste maintains repression of *Ubx* transgenes: support for a new model of Polycomb repression. *Development* **129**, 1339–1343
- Kaufman, T.C., Seeger, M.A. and Olsen, G. (1990) Molecular and genetic organization of the antennapedia gene complex of *Drosophila melanogaster*. *Adv. Genet.* **27**, 309–362
- Lewis, E.B. (1993) Clusters of master control genes regulate the development of higher organisms. *Curr. Sci.* **64**, 640–649
- Lewis, E.B. (1998) The bithorax complex: the first fifty years. *Int. J. Dev. Biol.* **42**, 403–415
- Mihaly, J., Mishra, R.K. and Karch, F. (1998) A conserved sequence motif in Polycomb-response elements. *Mol. Cell* **1**, 1065–1066
- Orlando, V., Strutt, H. and Paro, R. (1997) Analysis of chromatin structure by *in vivo* formaldehyde cross-linking. *Methods* **11**, 205–214
- Orlando, V., Jane, E.P., Chinwalla, V., Harte, P.J. and Paro, R. (1998) Binding of Trithorax and Polycomb proteins to the bithorax complex: dynamic changes during early *Drosophila* embryogenesis. *EMBO J.* **17**, 5141–5150

- Otte, A.P. and Kwaks, T.H. (2003) Gene repression by Polycomb group protein complexes: a distinct complex for every occasion? *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**, 448–454
- Pardue, M.L. (1994) Looking at polytene chromosomes. In *Methods in Cell Biology* (Goldstein, L.S.B. and Fyrberg, E.A., eds.), vol. 44, pp. 334–353, American Society for Cell Biology, Academic Press, London
- Poux, S., McCabe, D. and Pirrotta, V. (2001) Recruitment of components of Polycomb group chromatin complexes in *Drosophila*. *Development* **128**, 75–85
- Saurin, A.J., Shao, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Kingston, R.E. (2001) A *Drosophila* Polycomb group complex includes Zeste and dTAFII proteins. *Nature (London)* **412**, 655–660
- Strutt, H. and Paro, R. (1999) Mapping DNA target sites of chromatin proteins *in vivo* by formaldehyde crosslinking. *Methods Mol. Biol.* **119**, 455–467
- Strutt, H., Cavalli, G. and Paro, R. (1997) Co-localization of Polycomb protein and GAGA factor on regulatory elements responsible for the maintenance of homeotic gene expression. *EMBO J.* **16**, 3621–3632

Received 4 November 2004/9 December 2004; accepted 17 December 2004

Published as Immediate Publication 17 December 2004, doi:10.1042/BC20040508

1.1.2 Résultats complémentaires

Plusieurs travaux ont montré que des séquences régulatrices du complexe *BxC* sont transcrites au cours du développement et que cette transcription est associée à l'activation stable d'un gène (Bae et al., 2002 ; Bender and Fitzgerald, 2002 ; Hogga and Karch, 2002 ; Rank et al., 2002). De tels événements n'ont jamais été étudiés sur le complexe *AntpC*. Nous avons fait l'hypothèse que les domaines régulateurs du gène *Scr* sont transcrits au cours de l'embryogenèse. Nous avons testé notre hypothèse sur le domaine *Scr10.0XbaI*. Nous montrons l'existence d'une transcription en dehors des séquences codantes du gène *Scr*. Simultanément à notre travail, Calhoun et Levine (Calhoun and Levine, 2003) ont eux aussi mis en évidence la transcription de régions de régulation du complexe *AntpC*. L'ensemble de ces résultats suggère que la transcription de régions régulatrices du complexe *AntpC* est nécessaire à la régulation de l'expression de ses gènes.

Matériel et méthode

La transcription de la région *Scr10.0XbaI* a été étudiée par des expériences d'hybridation *in situ*. Le protocole utilisé ici a été décrit par Tautz et Pfeifle (Tautz and Pfeifle, 1989). 2 fragments de 2,5 kb et recouvrant le centre de la région *Scr10.0XbaI* (figure 18A) ont été amplifiés par PCR à l'aide d'amorces spécifiques. Les produits de PCR ont été clonés dans le vecteur PCR II-TOPO (Invitrogen). Les sondes ARN sens et antisens ont été préparées et marquées à la digoxygénine à l'aide du kit DIG RNA Labeling (Boehringer Mannheim).

Résultats

Afin de montrer que les domaines régulateurs du gène *Scr* sont transcrits lors de l'embryogenèse, nous avons réalisé une série de sondes ARN marquées à la digoxygénine, à partir de fragments d'ADN issus de la région *Scr10.0XbaI*. Ces sondes ARN, sens ou antisens, ont ensuite été utilisées lors d'expériences d'hybridation *in situ* sur des embryons sauvages (figure 18B). En utilisant les sondes S2 et S3, nous avons obtenu un signal d'hybridation dans les parasegments 2 et 3 au cours de l'embryogenèse précoce et après

l'extension de la bandelette germinale (figure 18a et b). Au contraire, en utilisant les sondes AS2 et AS3, nous n'avons pas obtenu de signal. La région *Scr10.0XbaI* est donc transcrite suivant le profil d'expression spécifique du gène *Scr* lors de l'embryogenèse. Calhoun et Levine se sont également intéressés à mettre en évidence la transcription de régions intergéniques localisées entre *Scr* et *Antp* (Calhoun and Levine, 2003), et leurs résultats concernant la région *Scr10.0XbaI* sont similaires à ceux que nous présentons (Calhoun and Levine, 2003). Nous avons voulu aller plus loin en regardant l'existence de la transcription du domaine *Scr10.0XbaI* au cours des stades larvaires. Nous avons utilisé le même type d'approche sur des disques imaginaux T1. Dans ce cas, aucun signal d'hybridation n'a pu être détecté. Ceci montre que la transcription du domaine régulateur *Scr10.0XbaI* est limitée au cours du développement.

Des travaux réalisés précédemment ont montré qu'il existe un lien entre la transcription des séquences régulatrices du complexe *BxC* et la régulation de l'expression des gènes au cours de l'embryogenèse. Par exemple, Fitzgerald et Bender ont mis en évidence que la transcription forcée de *iab-2* dans le parasegment 6 altère l'inactivation normale de ce domaine et modifie le profil d'expression d'*abd-A* (Bender and Fitzgerald, 2002). Un autre exemple a été présenté par Rank et ses collaborateurs. Ces auteurs montrent que la transcription des CMM *bxd*, *MCP* et *Fab-7* altère l'activité répressive de ces CMM (Rank et al., 2002). Notre étude et celle de Calhoun et Levine montrent qu'il existe au sein du complexe *AntpC* une transcription des séquences intergéniques (Calhoun and Levine, 2003). La région *Scr10.0XbaI* est transcrite dans les parasegments 2 et 3 dès l'embryogenèse précoce. Le gène *Scr* est exprimé dans le parasegment 2 au cours de l'embryogenèse précoce et ce n'est que plus tardivement qu'il est exprimé dans le parasegment 3 (Levine et al., 1983 ; Calhoun and Levine, 2003). On peut supposer que la transcription précoce de *Scr10.0XbaI* dans le parasegment 3 est nécessaire à l'expression tardive de *Scr* au sein de ce parasegment. Ce mécanisme de régulation pourrait s'appliquer à l'ensemble des gènes du complexe *AntpC*. Aujourd'hui, l'implication exacte de la transcription des séquences intergéniques dans la régulation de l'expression des gènes reste inconnue. Il est possible que les ARN non codants soient reconnus par les protéines PcG et empêchent leur recrutement sur les CMM. De telles interactions ont été mises en évidence au niveau du chromodomaine (Akhtar et al., 2000). Il serait intéressant de tester si d'autres protéines PcG interagissent avec des ARN non codants. Les travaux de Calhoun et Levine montrent que des séquences intergéniques ne contenant pas

de CMM connus sont également transcrites. Cela suggère que cette transcription n'est pas uniquement destinée à inhiber les PcG.

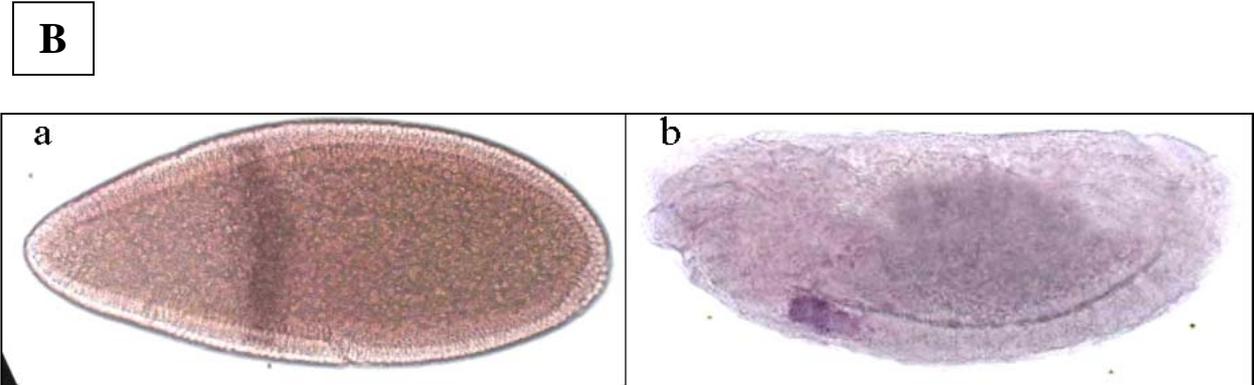
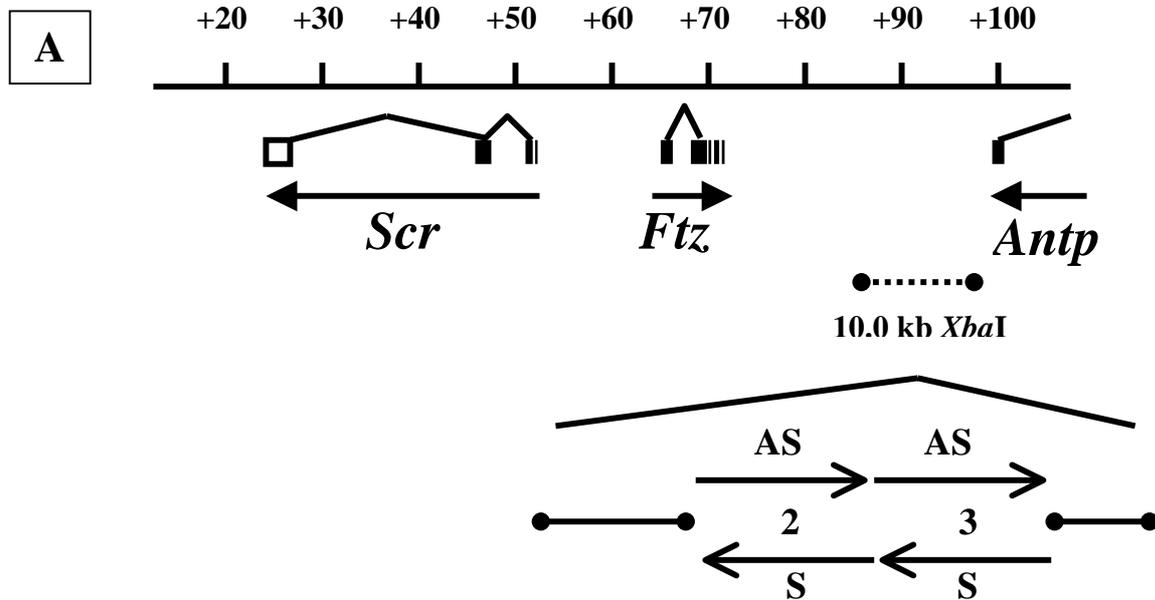


Figure 18. Transcription de la région *Scr10.0XbaI*. A) Carte moléculaire du locus *Sex combs reduced* (*Scr*). Deux fragments d'ADN de 2,5 kb (2 et 3) ont été utilisés pour préparer des sondes ARN marquées à la digoxigénine. L'orientation des flèches indique le sens des sondes (Sens ou Anti-Sens). B) Hybridation *in situ* avec la sonde 2S sur des embryons sauvages. Un signal identique est observé avec les sondes 2S et 3S au niveau des parasegments 2 et 3. Le signal apparaît dès l'embryogenèse précoce (a) et perdure après l'extension de la bandelette germinale (b).

I.1.3 Conclusion

La régulation de l'expression des gènes du complexe *AntpC* est complexe et très peu étudiée. Au cours de cette étude, nous avons travaillé plus particulièrement sur la régulation de l'expression du gène homéotique *Scr*. Nous montrons que la région régulatrice *Scr10.0XbaI* est transcrite au cours de l'embryogenèse précoce. Cela suggère un mode de régulation similaire à celui des gènes du complexe *BxC* où la transcription des séquences intergéniques est liée à l'activation des gènes. A l'heure actuelle, le fonctionnement de ces mécanismes reste à déterminer. Nous nous sommes intéressés au rôle spécifique de DSP1 dans la régulation du gène *Scr*. Au cours d'une étude précédente, il a été montré au laboratoire que l'expression de *Scr* est perturbée en absence de DSP1 (Decoville et al., 2001). Ici, nous montrons que DSP1 interagit directement avec la région régulatrice *Scr10.0XbaI* pour maintenir l'activation du gène *Scr* dans les disques imaginaux T1. DSP1 est donc nécessaire en tant que protéine du groupe TrxG à la régulation spatio-temporelle de *Scr*. Les expériences de ChIP nous ont permis d'identifier deux cibles préférentielles de DSP1 d'environ 1 kb. Notre étude ainsi que celle de Gindhart et Kaufman (Gindhart and Kaufman, 1995) montrent que la région *Scr10.0XbaI* répond aux critères d'identification des Modules de Mémoire Cellulaire (CMM). Le fait que DSP1 soit plus particulièrement associée à deux régions d'environ 1 kb permet de faire l'hypothèse que des activités régulatrices minimales pourraient être contenues au sein de ces petites régions. L'utilisation de lignées transgéniques où ces régions seraient placées en amont d'un gène rapporteur permettrait d'approfondir cette hypothèse.

1.2 Recherche des cibles de DSP1 sur le complexe Bithorax

1.2.1 Introduction

Lors de l'étude précédente, le phénotype du mutant *dsp1¹* nous a amenés à étudier un domaine régulateur particulier du complexe *AntpC*. D'autres cibles correspondant à des régions de régulation des gènes homéotiques ont été suggérées par le phénotype du mutant *dsp1¹*. Ce sont notamment les régions régulatrices *MCP*, *iab-6* ou encore *bx* (Decoville et al., 2001). Si la fixation de DSP1 sur le complexe *BxC* a été montrée par des expériences d'immunolocalisation sur les chromosomes polyténiques (Igor Zhimulev, communication personnelle) (tableau 6), ses sites de fixation au sein du complexe n'ont jamais été identifiés et caractérisés avec précision.

Afin de préciser *in vivo* les séquences cibles de DSP1 sur le complexe *BxC*, nous avons développé au laboratoire la technique de ChIP couplée à des analyses sur puces à ADN. Plusieurs études utilisant ce type d'approche ont permis d'étudier *in vivo* la distribution des PcG ou TrxG sur les 300 kb du complexe *BxC* (Strutt et al., 1997 ; Orlando et al., 1998). Ces travaux montrent que ces protéines n'ont pas une distribution homogène le long des domaines de régulation. Elles sont au contraire fortement associées à des régions de 3 à 7 kb où des séquences d'environ 1 kb apparaissent comme leurs cibles préférentielles. La majorité de ces cibles préférentielles recouvre des CMM connus ainsi que les promoteurs des gènes du complexe *BxC*. Dans le but d'optimiser notre recherche, nous avons étudié la distribution de DSP1 sur les régions cibles des protéines PcG et TrxG (Strutt et al., 1997 ; Orlando et al., 1998). Nous avons identifié 8 régions d'environ 1 kb comme des cibles préférentielles de DSP1. Ces cibles recouvrent des CMM connus ainsi que les promoteurs des gènes du complexe *BxC*. Nos résultats suggèrent de nouvelles cibles de DSP1. Des études d'interactions génétiques et de lignées transgéniques nous ont permis de vérifier *in vivo* la réalité biologique de ces nouvelles cibles et valider notre approche par la technique ChIP.

1.2.2 Matériel et méthode

Souches

Les lignées utilisées ont été élevées sur un milieu standard de drosophile à 22°C. La lignée *dsp1¹* a été décrite précédemment (Decoville et al., 2001). La lignée *iab-2^K* nous a été gracieusement fournie par le Docteur Ana Busturia (Busturia et al., 1989).

Immunoprécipitation de la chromatine pontée (ChIP)

La préparation de la chromatine pontée à partir d'embryons de drosophiles (0-14 h) a été réalisée selon le protocole décrit par Orlando et ses collaborateurs (1998) et l'immunoprécipitation selon le protocole décrit par Orlando et ses collaborateurs (1997). Brièvement, 50 µg de chromatine pontée ont été immunoprécipités en présence de 1,5 µg d'anticorps anti-DSP1 purifiés ou bien en présence de sérum pré-immun contenant une quantité équivalente en immunoglobulines. L'ADN immunoprécipité a ensuite été amplifié par PCR (Orlando et al., 1997) et utilisé comme sonde radiomarquée au cours des hybridations sur les puces à ADN.

Préparation des puces à ADN

Les 57 kb du complexe *BxC* ont été amplifiés à l'aide d'amorces spécifiques sous forme de 57 produits de PCR d'environ 1 kb. Les coordonnées des amplimères sont présentées dans le tableau 7. Ces coordonnées sont en relation avec la séquence du complexe *BxC* (DDBJ / EMBL / GenBank No U31961 ; Martin et al., 1995). Les produits de PCR (150 ng) dénaturés à la chaleur ont été déposés en triplets sur membranes de nitrocellulose (Hybond XL membrane, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) à l'aide d'un Slot Pin Replicator (VP Scientific : VP4085). Les membranes ont été hybridées 10 heures à 65°C avec l'ADN radiomarqué issu du ChIP et lavées selon le protocole décrit par Orlando et ses collaborateurs (1997). Elles ont ensuite été exposées au PhosphorImager (Molecular dynamics STORM 860). L'intensité des signaux radioactifs a été mesurée à l'aide du programme Array

Vision (Imaging Reaserch Inc). Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Docteur Jean-Charles Leple (INRA d'Ardon).

Tableau 7. Localisation des 57 produits de PCR couvrant le complexe *Bithorax*. Les coordonnées sont en relation avec la séquence du complexe. (DDBJ / EMBL / GenBank No U31961 ; Martin et al., 1995).

Domaines	Coordonnées
Promoteur γ <i>Abd-B</i> .	9504-10500 ; 10418-11504 ; 11396-12354 ; 12251-13013
<i>Fab-7</i>	79491-80540 ; 80103-81068 ; 81068-82112 ; 82000-83191 ; 82990-84065 ; 84047-85088 ; 85067-86105 ; 86041-87114 ; 87014-87988 ; 87968-89009
<i>iab-6</i>	88989-90038 ; 89951-90965 ; 90949-92004 ; 91938-93004 ; 92984-94061 ; 93934-94898 ; 94819-95885 ; 95870-96891 ; 96838-98002 ; 98011-99212
<i>MCP</i>	109697-110736 ; 110646-11772 ; 11657-112812 ; 112635-113823 ; 113605-114771 ; 114587-115675
<i>iab-4</i>	123740-124755 ; 124740-125785 ; 125731-126894 ; 126874-127942 ; 127892-128982 ; 128895-130086 ; 129980-130960 ; 130926-131985
Promoteur <i>abd-A</i>	150564-151620 ; 151599-152601 ; 152564-153576 ; 153447-154560
<i>iab-2</i>	159925-160954 ; 160936-161934 ; 161836-162974 ; 162785-163949
Promoteur <i>Ubx</i>	239185-240352 ; 240140-241186 ; 241173-242100 ; 242054-243184
<i>bx</i>	273209-274218 ; 274162-275108 ; 275043-275985

I.2.3 Résultats

Profil de fixation de DSP1 le long du complexe Bithorax

Les protéines PC et TRX sont fortement associées à des régions recouvrant de manière discontinue 57 des 300 kb du complexe *BxC* (Orlando et al., 1998). Nous avons recherché les cibles de DSP1 sur ces 57 kb par des expériences de ChIP couplées à des analyses sur puces à ADN. Les 57 kb ont été amplifiés sous forme de 57 produits de PCR d'environ 1 kb. Chaque produit a été déposé trois fois sur membrane de nitrocellulose pour tenir compte de

l'hétérogénéité de la membrane, puis hybridé avec l'ADN immunoprécipité en présence de l'anticorps dirigé contre DSP1, ou avec l'ADN immunoprécipité en présence d'anticorps contenus dans du sérum pré-immun. Dans les deux cas, les expériences d'hybridation ont été réalisées 3 fois sur des membranes différentes et en utilisant des sondes ADN issues d'expériences de ChIP indépendantes. Les résultats d'hybridation sont présentés dans la figure 19A.

L'intensité du signal radioactif associé à chaque dépôt a été mesurée à l'aide du programme Array Vision. On dispose alors de 9 valeurs d'intensité pour chacun des 57 fragments. Dans le cas des expériences spécifiques ou de contrôle, les 9 valeurs ne présentent pas de différences significatives, excepté pour un fragment du domaine *Fab-7*. Celui-ci n'a pas été pris en compte pour le reste de l'analyse. L'existence d'une telle corrélation nous a permis de tracer un profil de fixation de la protéine DSP1 le long des domaines de régulation du complexe *BxC*. Le degré d'enrichissement associé à chaque fragment correspond au rapport entre l'intensité du signal spécifique et celle du signal contrôle. Les résultats sont présentés dans la figure 19B.

Nous montrons que la distribution de DSP1 n'est pas homogène le long des domaines étudiés. Il existe donc des cibles préférentielles de cette protéine sur le complexe *BxC*. Au cours d'une étude précédente, notre équipe a montré le rôle de DSP1 en tant que facteur de remodelage de la chromatine sur le locus *MCP*. En effet, *MCP* recouvre un site d'hypersensibilité à la DNase absent chez le mutant *dsp1¹* (Decoville et al., 2001). Nous avons utilisé ce locus pour définir un seuil d'enrichissement minimal égal à 3. Seules 7 régions de 1 à 2 kb se distinguent et montrent des pics d'enrichissement supérieurs à 3 (figure 19B). Ces cibles préférentielles de DSP1 ont été caractérisées. DSP1 est associée à des fragments recouvrant les CMM des domaines *bx*, *iab-2*, *Fab-7* ; les promoteurs des gènes *Ubx*, *abd-A*, *Abd-B* ; ainsi que le domaine *iab-6*. Dans ce dernier cas, il est difficile de dire si DSP1 est associée à des régions contenant des CMM dans la mesure où le domaine *iab-6* n'a jamais fait l'objet d'études approfondies.

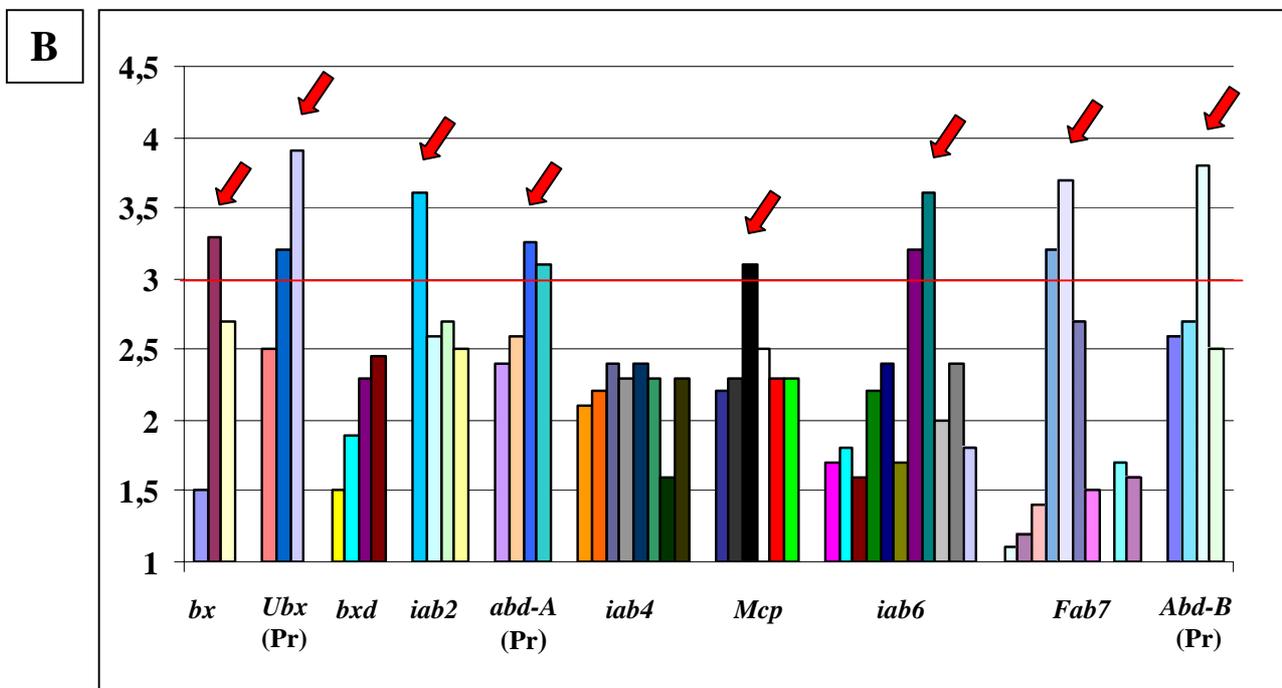
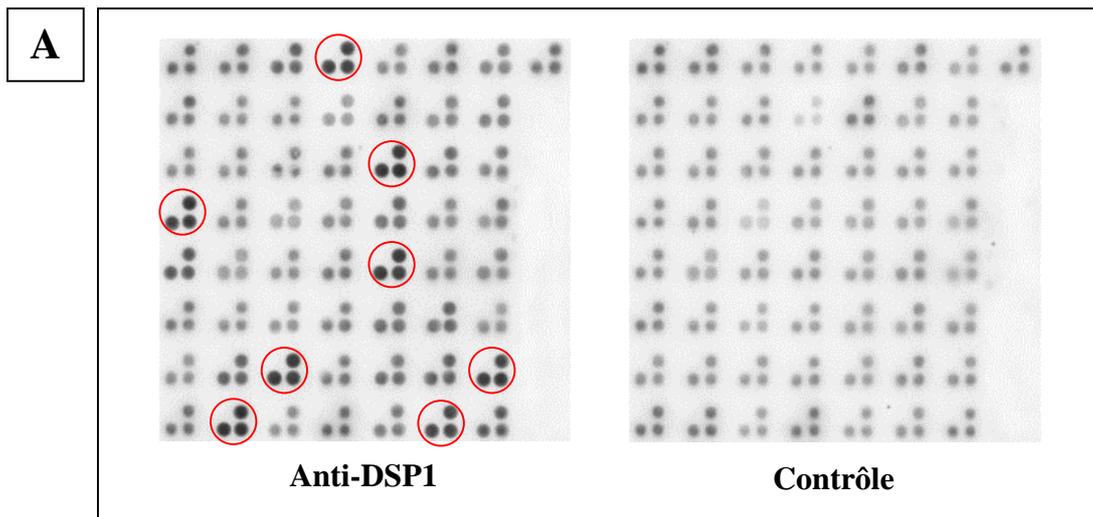


Figure 19. Fixation de la protéine DSP1 sur des domaines de régulation du complexe *Bithorax*. (A) Des domaines de régulation du complexe *Bithorax* sont déposés sur membranes de nitrocellulose sous forme de fragments de 1000 pb amplifiés par PCR. Ces fragments sont hybridés avec une sonde radiomarquée correspondant à l'ADN immunoprécipité en présence d'anticorps anti-DSP1 (Anti-DSP1) ou bien en présence de sérum pré-immun (Contrôle). Les signaux encerclés en rouge présentent les plus forts degrés d'enrichissement correspondant au rapport entre l'intensité des signaux spécifiques (Anti-DSP1) et contrôles. (B) Le graphique présente le profil de fixation de DSP1. Les domaines de régulation sont indiqués en abscisses (Pr signifie promoteur). Une barre représente un fragment de 1000 pb. Le degré d'enrichissement associé à chaque fragment est indiqué en ordonnées. Huit sites sont des cibles prédominantes de la protéine DSP1 (Flèches rouges).

DSP1 interagit avec le domaine iab-2

Nous avons voulu montrer la réalité biologique des cibles fortement enrichies lors des expériences de CHIP. Dans ce cas, si la protéine DSP1 se fixe *in vivo* sur ces domaines, elle doit alors participer à leur activité régulatrice. Trois des huit cibles préférentielles de DSP1 : *bx*, *MCP* et *iab-6* ont déjà fait l'objet d'études antérieures (Decoville et al., 2001). L'observation du mutant *dsp1¹* ainsi que des études d'interactions génétiques ont montré l'implication de DSP1 dans la régulation de ces domaines. Par la suite, nous avons voulu démontrer le rôle de DSP1 dans l'activité régulatrice des nouvelles cibles que nous proposons. Dans le cas des promoteurs *Ubx*, *abd-A*, *Abd-B*, nous ne disposons pas des outils nécessaires pour réaliser ce travail, par conséquent nous nous sommes plus particulièrement intéressés à démontrer le rôle de DSP1 dans l'activité régulatrice du domaine *iab-2*.

Le domaine *iab-2* contrôle l'expression du gène *abd-A* dans le parasegment 7 et détermine l'identité du deuxième segment abdominal. Les résultats montrant la fixation de DSP1 au niveau de ce locus régulateur nous ont amenés à rechercher chez le mutant *dsp1¹* un phénotype caractéristique d'individus mutés sur le domaine *iab-2*. Une nouvelle transformation homéotique a pu ainsi être mise en évidence. Les adultes hemizygotes pour l'allèle *dsp1¹* montrent une transformation partielle du sternite du segment abdominal A2 en sternite du segment abdominal A1. Dans ce cas, le mutant présente un nombre moyen de soies ventrales égal à 9 +/- 2 au lieu de 14 +/- 2 pour les individus sauvages (figure 20A et B). Ces données ont été comptabilisées sur 500 individus de chaque génotype. On notera que le mutant *dsp1¹* ne présente pas de transformation du côté dorsal. Ce phénotype est malgré tout caractéristique des mutants touchant le domaine régulateur *iab-2* (Busturia et al., 1989) et suggère que DSP1 contrôle l'activité de ce domaine en tant que protéine du groupe TrxG. Une étude d'interaction fonctionnelle entre DSP1 et le domaine régulateur *iab-2* a été effectuée en utilisant l'allèle hypomorphe *iab-2^K* (don du Dr Busturia). Cet allèle est dû à l'insertion de l'élément transposable gypsy (Karch et al., 1985) et fut décrit pour la première fois par Kuhn et ses collaborateurs (1981). A l'état homozygote, le mutant *iab-2^K* présente une transformation du segment A2 en A1. Du côté ventral, le sternite A2 présente un nombre de soies réduit. Du côté dorsal, la transformation se traduit par l'apparition sur le tergite A2 de soies fines et courtes caractéristiques du tergite A1. Les individus *iab-2^K/+* ne présentent pas la transformation A2 en A1. On observe chez 2% des mâles *dsp1¹/Y ; iab-2^K/+* (effectif total égal à 300), l'apparition de soies fines et courtes sur le tergite A1 (figure 20C et D). Du côté

ventral, nous n'avons pas observé d'aggravation du phénotype. L'apparition chez le double mutant $dsp1^1/Y; iab-2^K/+$ d'une transformation du tergite A2 en tergite A1 confirme que DSP1 participe à la régulation du locus *iab-2*.

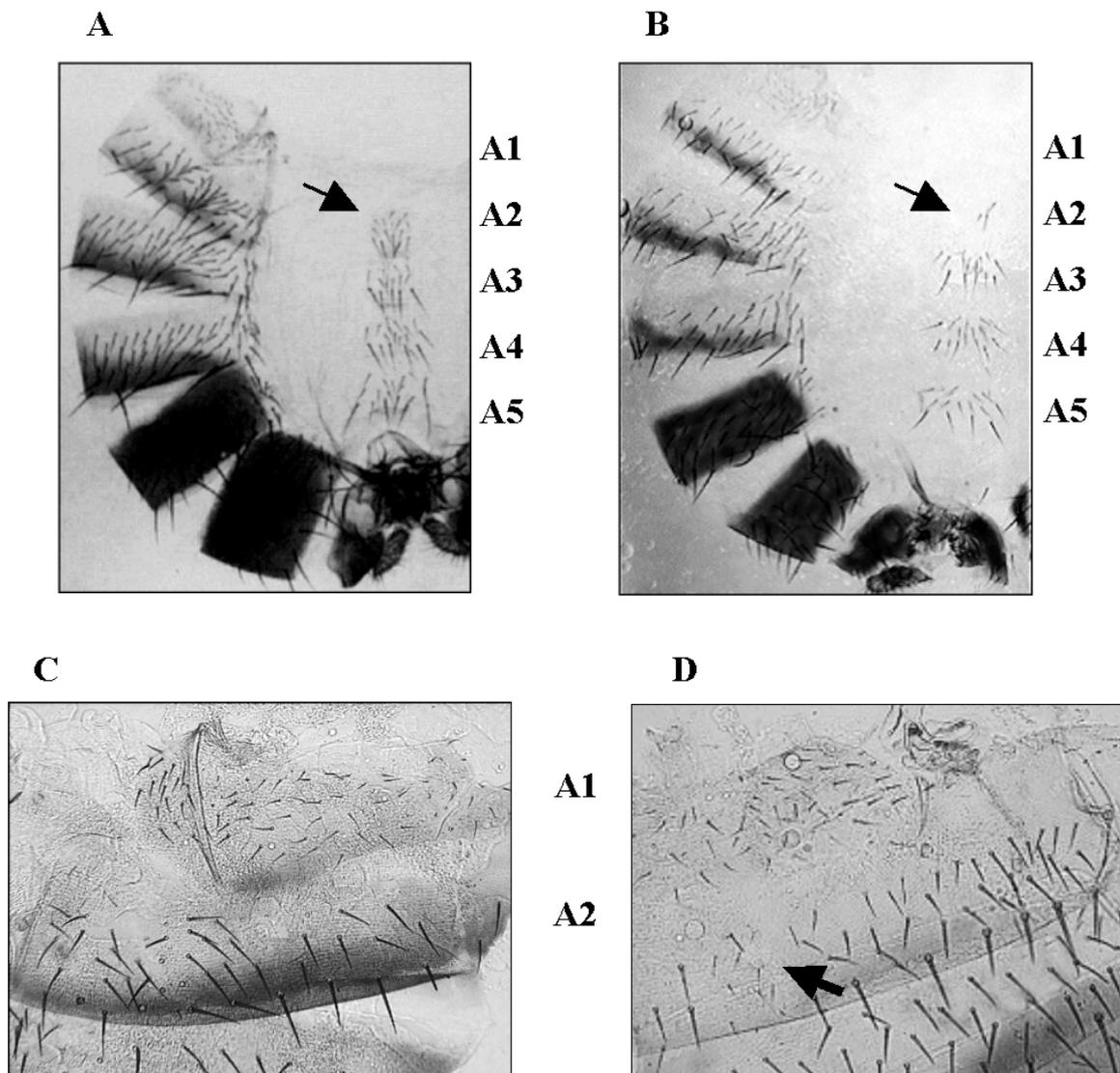


Figure 20. Transformation du segment A2 en A1 chez des adultes mâles hemizygotés *dsp1*¹ ou doubles mutants *dsp1*¹/*Y* ; *iab-2*^K/+. (A) Individu mâle sauvage. Le nombre moyen de soies ventrales sur le sternite A2 est de 14 +/- 2. (B) Individu mâle hemizygoté *dsp1*¹. Le nombre moyen de soies ventrales sur le sternite A2 est réduit à 9 +/- 2. (C) Individu mâle sauvage. Les soies du tergite A1 sont plus fines et plus courtes que celles du tergite A2. (D) Individu mâle double mutant *dsp1*¹/*Y* ; *iab-2*^K/+. Le tergite A2 est partiellement transformé en tergite A1. Ceci se caractérise par une réduction de la taille des soies (flèche).

1.2.4 Discussion

Dans le but de tracer un profil de fixation de DSP1 le long des domaines de régulation du complexe *BxC*, nous avons développé au laboratoire la technique d'immunoprécipitation de la chromatine pontée que nous avons couplée à des analyses sur puces à ADN. Cette approche a pour avantage de pouvoir étudier rapidement et à haute résolution la fixation d'une protéine d'intérêt sur de grandes régions d'ADN. Il ressort de cette étude plusieurs nouvelles cibles préférentielles de DSP1. Ce sont les promoteurs des gènes *Ubx*, *abd-A* et *Abd-B* ainsi que les domaines *iab-2* et *Fab-7*. La réalité biologique de certaines d'entre elles a été démontrée par des études génétiques. Les résultats que nous présentons ici valident notre approche et l'efficacité de la technique CHIP dans la recherche des cibles de DSP1. DSP1 est principalement associée à des régions de 1 kb contenant les CMM ou les promoteurs des gènes du complexe *BxC*. Les protéines PC, TRX ou GAF sont associées à ces mêmes régions (Strutt et al., 1997 ; Orlando et al., 1998). Précédemment, il a été montré au laboratoire que DSP1 interagit génétiquement avec les protéines PcG et TrxG (Decoville et al., 2001). L'ensemble de ces données suggère fortement que DSP1 participe à la régulation de l'expression des gènes homéotiques au sein des complexes PcG ou TrxG.

1.3 Conclusion générale

La technique CHIP nous a permis de mettre en évidence la fixation de DSP1 sur les domaines de régulation des gènes homéotiques. Nous montrons que DSP1 se fixe fortement à différentes régions régulatrices des gènes du complexe *BxC*. Par contre, nous montrons dans l'article 1 que DSP1 régule l'expression de *Scr* uniquement au cours des stades larvaires. Cela montre que l'activité de DSP1 dans la régulation de l'expression des gènes varie suivant le locus considéré. Cela indique également que les mécanismes de régulation employés au cours des stades embryonnaires sont différents de ceux employés au cours des stades larvaires. Nous montrons par des expériences complémentaires que les régions régulatrices du complexe *AntpC* sont transcrites au cours de l'embryogenèse. Auparavant, il a été montré au sein du complexe *BxC*, l'importance de la transcription de séquences non codantes. Même si l'implication moléculaire de la transcription n'est pas encore connue, nos résultats suggèrent

que la régulation des gènes du complexe *AntpC* fonctionne selon les mêmes mécanismes que ceux employés au niveau du complexe *BxC*.

II DSP1 est un recruteur des protéines du groupe Polycomb

II.1 Introduction à l'article 2

Le maintien de la répression des gènes homéotiques s'organise au cours du développement en plusieurs phases successives (initiation, transition et maintien) pendant lesquelles les protéines du groupe Polycomb sont recrutées hiérarchiquement au niveau des CMM. L'un des enjeux actuels est de comprendre comment ces protéines sont spécifiquement recrutées sur leurs cibles au moment où s'initie le maintien de la répression. Les analyses de séquences ont révélé chez la drosophile l'existence de 3 motifs consensus au sein des CMM. Ces motifs sont reconnus respectivement par les protéines PHO, GAF et Z qui sont présentes de façon ubiquitaire dans l'embryon. En conséquence, ces protéines seules sont insuffisantes au recrutement des PcG dans des régions spécifiques de l'embryon.

L'étude que nous allons présenter a pour objectif de comprendre les mécanismes mis en jeu pour recruter les PcG et initier le maintien de la répression au niveau des CMM. Pour cela, nous nous sommes intéressés à un domaine particulier de 219 pb nommé *Ab-Fab*. *Ab-Fab* est un élément régulateur minimal nécessaire et suffisant à l'activité PRE/TRE du domaine *Fab-7* (Dejardin and Cavalli, 2004). Comme de nombreux CMM, *Ab-Fab* contient des sites de fixation de PHO, GAF, et Z. Au cours de cette étude, nous avons tout d'abord mis en évidence à l'aide de lignées transgéniques, le rôle essentiel mais insuffisant des sites de fixation PHO et GAF dans l'activité répressive du CMM *Ab-Fab*. Ceci démontre que d'autres séquences indéterminées présentes dans *Ab-Fab* jouent un rôle critique dans la fonction répressive de ce domaine. Des alignements de séquences de *Ab-Fab* avec d'autres CMM connus nous ont permis de mettre en évidence la présence d'une nouvelle séquence particulière 5'-GAAAA-3' (G(A)₄), qui est régulièrement localisée à proximité d'un site de fixation PHO. Cette séquence G(A)₄ est nécessaire au recrutement des PcG et à l'activité répressive de *Ab-Fab*. Lors de nos études de ChIP, nous avons déterminé *Fab-7* comme une cible préférentielle de DSP1. DSP1 est une protéine à boîte HMG qui se fixe à l'ADN et reconnaît des structures courbées. Lors d'une étude précédente, il a été montré que DSP1 est capable de se fixer à une séquence proche de G(A)₄ (Brickman et al., 1999). DSP1 est apparue comme un candidat idéal capable de fixer le motif G(A)₄. Tout d'abord, nous avons pu

montrer au sein d'une lignée transgénique apportant le domaine *Ab-Fab* en amont du gène rapporteur *miniwhite*, une perte de l'activité répressive du CMM dans un contexte mutant pour le gène *dsp1*. Les expériences d'immunolocalisation sur les chromosomes géants des glandes salivaires montrent le recrutement de DSP1 sur le site d'insertion du transgène. Des expériences de ChIP à très forte résolution nous ont permis de confirmer *in vivo* que DSP1 se fixe précisément sur les 219 pb du domaine *Ab-Fab*. Par ailleurs, nous avons montré par des analyses de retardement sur gel que DSP1 fixe une sonde ADN contenant le motif G(A)₄. Cette séquence est indispensable au recrutement de DSP1 puisque le domaine *Ab-Fab* muté pour G(A)₄ ne recrute plus DSP1 sur les chromosomes polyténiques. Enfin, nous avons démontré que l'absence de DSP1 sur l'élément *Ab-Fab* et le CMM du locus *engrailed* altère le recrutement de protéines PcG et l'activité répressive de ces CMM. L'ensemble des résultats que nous présentons montre que DSP1 agit comme un recruteur précoce des PcG.

mix (1 mg ml⁻¹ histone H1 (Calbiochem), 2 μCi of [γ-³²P]ATP (Amersham) and 50 μM unlabelled ATP) at 30 °C for 10 min. The reaction was terminated by being boiled for 3 min with 20 μl of 2 × sample buffer, and samples were analysed by SDS-PAGE. Phosphorylation of histone H1 was detected by autoradiography and quantified with an ImageAnalyzer FLA2000 (Fuji Film).

Western blotting

Sample preparation and subsequent analysis were performed as described⁶. We used the following antibodies: anti-Cdc13p 6F at a dilution of 1:1,000 (a gift from P. Nurse), anti-Cig2p 3A11 at a dilution of 1:1,000 (a stock of H.Y.), anti-Mes1p at a dilution of 1:1,000 (this study), anti-Cdk1/Cdc2 PSTAIR at a dilution of 1:2,000 (Upstate), anti-PY15 at a dilution of 1:1,000 (New England Biolabs), monoclonal anti-HA 12CA5 at a dilution of 1:3,000 (Roche), polyclonal anti-HA Y-11 at a dilution of 1:3,000 (Santa Cruz Biotechnology), and anti-Flag M2 at a dilution of 1:3,000 (Sigma).

Immunoprecipitation and pull-down assay

To see the physical interaction between Slp1p and Mes1p *in vivo*, a strain carrying *slp1-3HA* was transformed with either vector *pFlag1* or *pFlag1-mes1*. Extracts prepared from the transformants were subjected to immunoprecipitation with anti-Flag. For the pull-down assay, GST-fused and MBP-fused proteins were produced bacterially and purified in accordance with the standard protocols. GST-fused Cdc13p trapped on glutathione beads was mixed with extracts prepared from cells expressing Slp1p-3HA, together with either MBP or MBP-Mes1p. Immunoprecipitated or pulled-down proteins were analysed by western blotting.

Synchronization of mitosis using the *cdc25-22* mutation

A *cdc25-22* strain¹⁷ was transformed with either *pREP1-mes1* or *pREP1*, and the transformants were cultured in SD medium at 25 °C to early exponential phase. They were transferred to MM medium and incubated for 15 h to derepress *mes1* expression; they were then kept at 36 °C for 3.5 h and shifted down to 25 °C to restart the cell cycle from G2. Samples were taken every 30 min from the shift-down until completion of the subsequent mitosis in the control vector-carrying cells, and subjected to analyses.

Xenopus egg extracts and cyclin destruction assay

Preparation of the extracts and assay procedures were described previously¹⁹. Fission yeast Cdc13p and Cdc13p(Δ67), an indestructible variant lacking the N-terminal 67 residues, were labelled with ³⁵S and used as substrates. Bacterially expressed and purified GST-Mes1p or GST was added to some assays.

Received 17 November 2004; accepted 27 January 2005; doi:10.1038/nature03406.

1. Watanabe, Y. Modifying sister chromatid cohesion for meiosis. *J. Cell Sci.* **117**, 4017–4023 (2004).
2. Shimoda, C., Hirata, A., Kishida, M., Hashida, T. & Tanaka, K. Characterization of meiosis-deficient mutants by electron microscopy and mapping of four essential genes in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Gen. Genet.* **200**, 252–257 (1985).
3. Mata, J., Lyne, R., Burns, G. & Bahler, J. The transcriptional program of meiosis and sporulation in fission yeast. *Nature Genet.* **32**, 143–147 (2002).
4. Kishida, M., Nagai, T., Nakaseko, Y. & Shimoda, C. Meiosis-dependent mRNA splicing of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe mes1⁺* gene. *Curr. Genet.* **25**, 497–503 (1994).
5. Decottignies, A., Zarzov, P. & Nurse, P. *In vivo* localisation of fission yeast cyclin-dependent kinase cdc2p and cyclin B cdc13p during mitosis and meiosis. *J. Cell Sci.* **114**, 2627–2640 (2001).
6. Borgne, A., Murakami, H., Ayte, J. & Nurse, P. The G1/S cyclin Cig2p during meiosis in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* **13**, 2080–2090 (2002).
7. Gould, K. L. & Nurse, P. Tyrosine phosphorylation of the fission yeast *cdc2⁺* protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature* **342**, 39–45 (1989).
8. Bueno, A. & Russell, P. Two fission yeast B-type cyclins, *cig2* and *cdc13*, have different functions in mitosis. *Mol. Cell Biol.* **13**, 2286–2297 (1993).
9. Matsumoto, T. A fission yeast homolog of CDC20/p55CDC/Fizzy is required for recovery from DNA damage and genetically interacts with p34^{cdc2}. *Mol. Cell Biol.* **17**, 742–750 (1997).
10. Visintin, R., Prinz, S. & Amon, A. *CDC20* and *CDH1*: a family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis. *Science* **278**, 460–463 (1997).
11. Fang, G., Yu, H. & Kirschner, M. W. Direct binding of CDC20 protein family members activates the anaphase-promoting complex in mitosis and G1. *Mol. Cell* **2**, 163–171 (1998).
12. Peters, J. M. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol. Cell* **9**, 931–943 (2002).
13. Burton, J. L. & Solomon, M. J. D box and KEN box motifs in budding yeast Hsl1p are required for APC-mediated degradation and direct binding to Cdc20p and Cdh1p. *Genes Dev.* **15**, 2381–2395 (2001).
14. Yamada, H. Y., Matsumoto, S. & Matsumoto, T. High dosage expression of a zinc finger protein, Grt1, suppresses a mutant of fission yeast *slp1⁺*, a homolog of CDC20/p55CDC/Fizzy. *J. Cell Sci.* **113**, 3989–3999 (2000).
15. Funabiki, H. *et al.* Cut2 proteolysis required for sister-chromatid separation in fission yeast. *Nature* **381**, 438–441 (1996).
16. He, X., Patterson, T. E. & Sazer, S. The *Schizosaccharomyces pombe* spindle checkpoint protein mad2p blocks anaphase and genetically interacts with the anaphase-promoting complex. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **94**, 7965–7970 (1997).
17. Moreno, S., Hayles, J. & Nurse, P. Regulation of p34^{cdc2} protein kinase during mitosis. *Cell* **58**, 361–372 (1989).
18. Blanco, M. A., Pelloquin, L. & Moreno, S. Fission yeast *mfr1* activates APC and coordinates meiotic nuclear division with sporulation. *J. Cell Sci.* **114**, 2135–2143 (2001).
19. Yamano, H., Gannon, J., Mahbubani, H. & Hunt, T. Cell cycle-regulated recognition of the destruction box of cyclin B by the APC/C in *Xenopus* egg extracts. *Mol. Cell* **13**, 137–147 (2004).
20. Yamano, H. *et al.* The spike of S phase cyclin Cig2 expression at the G1-S border in fission yeast requires both APC and SCF ubiquitin ligases. *Mol. Cell* **6**, 1377–1387 (2000).

21. Nakajo, N. *et al.* Absence of Wee1 ensures the meiotic cell cycle in *Xenopus* oocytes. *Genes Dev.* **14**, 328–338 (2000).
22. Iwabuchi, M., Ohsumi, K., Yamamoto, T. M., Sawada, W. & Kishimoto, T. Residual Cdc2 activity remaining at meiosis I exit is essential for meiotic M-M transition in *Xenopus* oocyte extracts. *EMBO J.* **19**, 4513–4523 (2000).
23. Kim, S. H., Lin, D. P., Matsumoto, S., Kitazono, A. & Matsumoto, T. Fission yeast Slp1: an effector of the Mad2-dependent spindle checkpoint. *Science* **279**, 1045–1047 (1998).
24. Shah, J. V. & Cleveland, D. W. Waiting for anaphase: Mad2 and the spindle assembly checkpoint. *Cell* **103**, 997–1000 (2000).
25. Reimann, J. D. *et al.* Emi1 is a mitotic regulator that interacts with Cdc20 and inhibits the anaphase promoting complex. *Cell* **105**, 645–655 (2001).
26. Reimann, J. D. & Jackson, P. K. Emi1 is required for cytostatic factor arrest in vertebrate eggs. *Nature* **416**, 850–854 (2002).
27. Ohsumi, K., Koyanagi, A., Yamamoto, T. M., Gotoh, T. & Kishimoto, T. Emi1-mediated M-phase arrest in *Xenopus* eggs is distinct from cytostatic factor arrest. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **101**, 12531–12536 (2004).
28. Reimann, J. D., Gardner, B. E., Margottin-Goguet, F. & Jackson, P. K. Emi1 regulates the anaphase-promoting complex by a different mechanism than Mad2 proteins. *Genes Dev.* **15**, 3278–3285 (2001).
29. Moreno, S., Klar, A. & Nurse, P. Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* **194**, 795–823 (1991).
30. Maundrell, K. *nmt1* of fission yeast. A highly transcribed gene completely repressed by thiamine. *J. Biol. Chem.* **265**, 10857–10864 (1990).

Acknowledgements We thank K. Tsumoto and M. Toya for technical assistance, Y. Watanabe and Y. Imai for helpful discussion, M. Yanagida for anti-Cut2p antibodies, and T. Matsumoto for the *slp1-362* strain. This work was supported by a Grant-in-Aid for Specially Promoted Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

Competing interests statement The authors declare that they have no competing financial interests.

Correspondence and requests for materials should be addressed to M.Y. (myamamot@ims.u-tokyo.ac.jp).

Recruitment of Drosophila Polycomb group proteins to chromatin by DSP1

Jérôme Déjardin¹, Aurélien Rappailles², Olivier Cuvier¹, Charlotte Grimaud¹, Martine Decoville², Daniel Locker² & Giacomo Cavalli¹

¹Institute of Human Genetics, CNRS, 141 rue de la Cardonille, F-34396 Montpellier Cedex 5, France

²Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS/Université d'Orléans, rue C. Sadron, F-45071 Orleans Cedex 2, France

Polycomb and trithorax group (PcG and trxG) proteins maintain silent and active transcriptional states, respectively, throughout development¹. In *Drosophila*, PcG and trxG proteins associate with DNA regions named Polycomb and trithorax response elements (PRE and TRE), but the mechanisms of recruitment are unknown. We previously characterized a minimal element from the regulatory region of the *Abdominal-B* gene, termed *Ab-Fab*. *Ab-Fab* contains a PRE and a TRE and is able to maintain repressed or active chromatin states during development². Here we show that the Dorsal switch protein 1 (DSP1), a *Drosophila* HMGB2 homologue, binds to a sequence present within *Ab-Fab* and in other characterized PREs. Addition of this motif to an artificial sequence containing Pleiohomeotic and GAGA factor consensus sites is sufficient for PcG protein recruitment *in vivo*. Mutations that abolish DSP1 binding to *Ab-Fab* and to a PRE from the *engrailed* locus lead to loss of PcG protein binding, loss of silencing, and switching of these PREs into constitutive TREs. The binding of DSP1 to PREs is therefore important for the recruitment of PcG proteins.

Two classes of PcG protein complexes are recruited at PREs: the PRC2 complex contains the histone methyltransferase Enhancer of

Zeste (E(Z)), whereas the PRC1 complex contains Polycomb (PC), Polyhomeotic (PH), Posterior sex combs and dRing. *Drosophila* PREs have been characterized in transgenic assays³⁻⁹. They induce a variegated silencing of the mini-*white* reporter gene. Variegation is often accompanied by a phenomenon called 'pairing-sensitive silencing' (PSS), in which the expression of the mini-*white* reporter gene is lower in homozygous individuals than in heterozygotes (that is, the eye colour is lighter in the homozygotes). Variegation and PSS are reduced or suppressed in mutant background for PcG genes¹⁰. Sequence analysis has revealed three consensus binding sites for PcG or trxG proteins. One is bound by the Pleiohomeotic (PHO) and PHO-like proteins, the only members of the PcG known to bind DNA in a sequence-specific manner. PHO induces the recruitment of E(Z), which in turn might recruit PRC1 via the methylation of Lys 27 and Lys 9 in histone H3, followed by

recognition of these marks by the PC chromodomain¹¹. A second consensus site is bound by the GAGA factor (GAF). GAF is required for PSS⁷, but its mechanism of action is unclear. The third motif is the consensus site for Zeste, a trxG protein¹². PHO and GAF motifs seem to be necessary but not sufficient for PcG recruitment at PREs^{9,13-15}, indicating that other factors might be involved.

We have recently characterized a core PRE/TRE of 219 base pairs (bp), named *Ab-Fab* (ref. 2). *Ab-Fab* is able to induce PcG-dependent PSS and PcG protein recruitment to transgenes in polytene chromosome staining assays. *Ab-Fab* contains binding sites for PHO, GAF and Zeste. Whereas mutation of the Zeste motifs selectively affects the trxG response², we found that mutations in the PHO or GAF consensus sites disrupt PSS (*AbPHO^m* or *AbGAF^m*; see Fig. 1a). Mutation of PHO sites resulted in the complete loss of

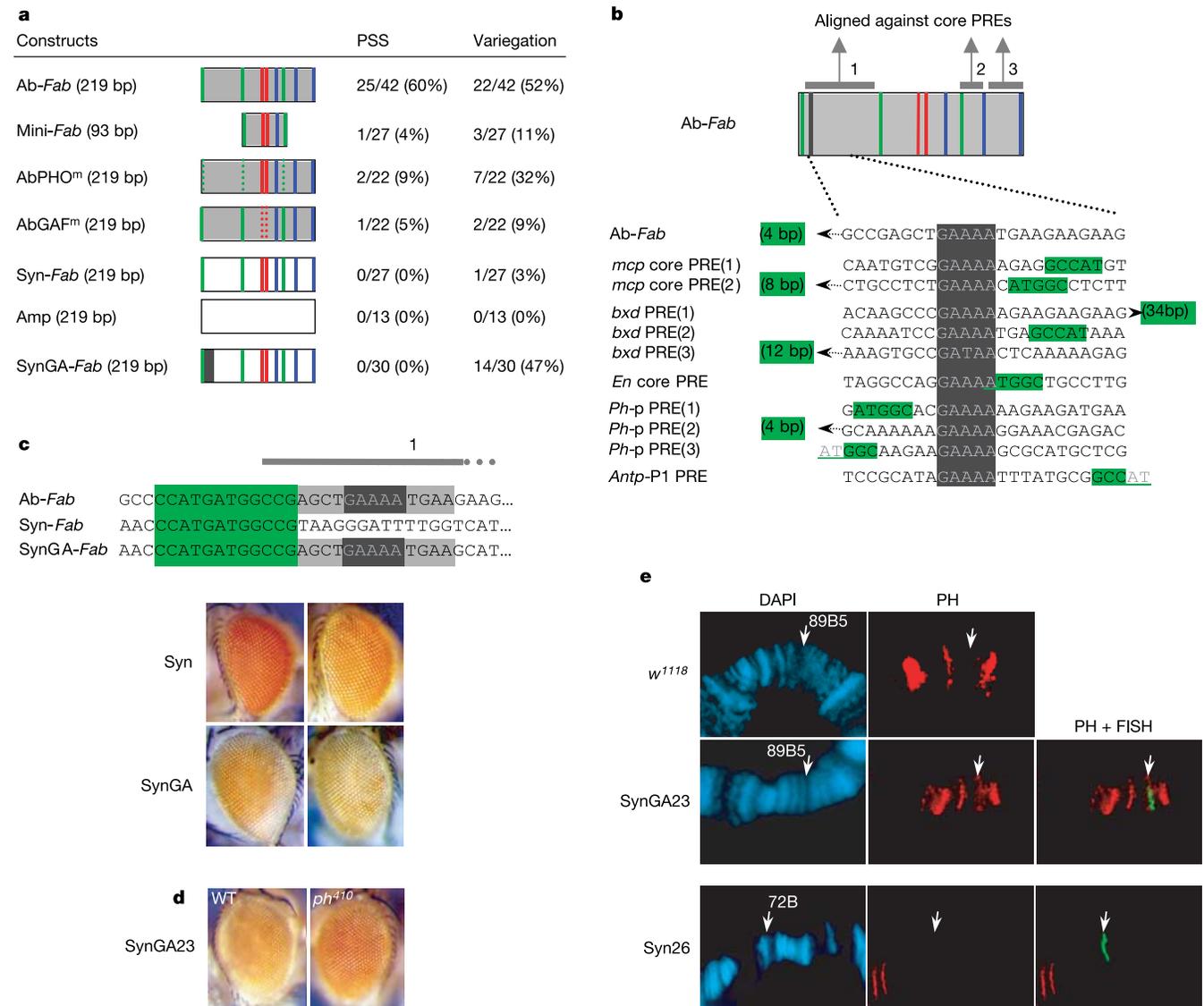


Figure 1 The G(A) motif contributes to the recruitment of PcG proteins. **a**, Fragments derived from *Ab-Fab*, and their ability to repress mini-*white* in a pairing-dependent fashion (PSS) and to display eye colour variegation. Green, red and blue bars represent binding sites for PHO, GAF and Zeste, respectively. **b**, Sequence alignments identify the G(A) motif in *Drosophila* PREs from *Ab-Fab* region 1. Arrows near the sequences indicate the distance in base pairs separating the edge of the alignment to the closest PHO

consensus site (highlighted in green). **c**, 5' sequence of *Ab-Fab*, *Syn* and *SynGA-Fab* constructs (region 1), and typical examples of mini-*white* expression produced by *Syn* or *SynGA-Fab* fragments. **d**, Effect of *ph⁴¹⁰* background on *SynGA-Fab*-mediated silencing of mini-*white*. **e**, Immuno-FISH analysis with an anti-PH antibody on polytene chromosomes from transgenic lines of *Syn26* and *SynGA23* insertions. DAPI, 4,6-diamidino-2-phenylindole.

tel-00011521, version 1 - 1 Feb 2006

PH association with the transgene on polytene chromosomes (see Supplementary Fig. 1), which is consistent with a role for PHO in PcG recruitment¹⁶. Mutation of GAF sites significantly lowered, but did not disrupt, PH recruitment (see Supplementary Fig. 1), indicating that GAF binding sites might be partly dispensable for PcG recruitment.

To determine whether these consensus sites are sufficient to define the minimal *Ab-Fab* PRE, we designed an artificial sequence named *Syn-Fab*. *Syn-Fab* contains all PHO, GAF and Zeste consensus sites in the same order, orientation and spacing as in *Ab-Fab*, but with the intervening sequences replaced by bacterial sequences devoid of these sites. As a control, we used 219bp of the same bacterial sequences (Fig. 1a, Amp construct). Neither of these elements was able to induce PSS (Fig. 1a) or eye variegation in transgenic lines. Moreover, *Syn-Fab* was unable to induce ectopic binding of the PH protein to polytene chromosomes (Fig. 1e). Together with previously published evidence¹⁵⁻¹⁷, these results strongly indicate that binding sites for PHO, GAF and Zeste are not sufficient to define a PRE.

The *Mini-Fab* construct (93 bp) was also unable to induce variegation and PSS, or to recruit PcG proteins (Fig. 1a and ref. 2). This narrowed down the additional PcG recruiter DNA motifs to three blocks of *Ab-Fab* DNA that are located outside *Mini-Fab* and are not PHO, GAF or Zeste consensus motifs (regions 1, 2 and 3; see Fig. 1b). Sequence alignment between these blocks and the known core *Drosophila* PREs allowed us to identify the

5'-GAAAA-3' candidate motif (hereafter called the G(A) motif), which is present in all molecularly characterized PREs at positions close to or overlapping PHO sites (Fig. 1b). Strikingly, the addition of a 14-bp sequence containing the G(A) site to *Syn-Fab* induced variegation of *mini-white* in 47% of the *SynGA-Fab* lines (Fig. 1a, c). Introducing the *SynGA23* transgenic flies in a *ph* mutant background (*ph*⁴¹⁰) induced derepression of *mini-white*, indicating that the variegation is PcG-dependent (Fig. 1d). Moreover, we observed recruitment of PH protein to the insertion site of the transgene in polytene chromosomes of two different *SynGA-Fab* insertions (Fig. 1e).

To analyse the mechanism by which the G(A) motif contributes to the recruitment of PcG proteins, we analysed the binding of the two known PcG recruiters, PHO and GAF. Surprisingly, although containing clusters of PHO and GAF binding sites, *Syn-Fab* does not recruit these proteins *in vivo* (see Supplementary Figs 2 and 3). Whereas the presence of the G(A) motif in *SynGA-Fab* did not induce recruitment of GAF (Supplementary Fig. 3), it induced weak but significant binding of PHO (Supplementary Fig. 2). Consistent with a role of PHO in the recruitment of E(Z) was our observation that PHO binding was paralleled by recruitment of E(Z) to *SynGA-Fab* (see Supplementary Fig. 4). Thus, the addition of the G(A) motif is sufficient to recruit the PcG proteins PHO, E(Z) and PH *in vivo* in the context of a heterologous DNA sequence, although the absence of PSS and the weaker binding observed in the synthetic PRE than in the natural *Ab-Fab* sequence indicate that other *Ab-Fab*

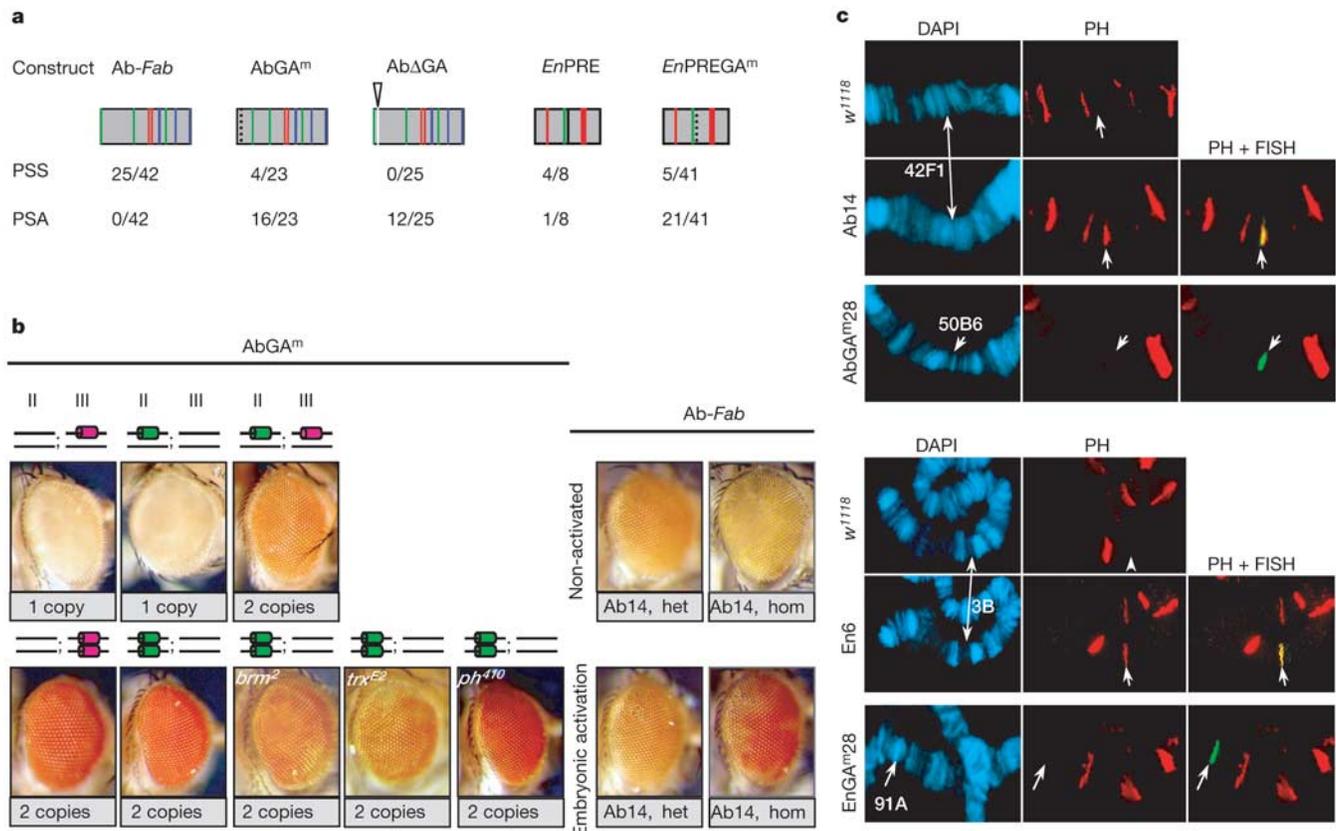


Figure 2 The G(A) motif is required for PcG-mediated silencing and for PH recruitment in natural PREs. **a**, Effect of wild-type or G(A) mutated *Ab-Fab* and *EnPRE* on PSS or PSA of *mini-white* expression. The number of lines showing each effect is indicated together with the total number of lines. **b**, Analysis of the *trxG*-dependent PSA. Left: the PSA effect on the two representative *AbGA*^m14 and *AbGA*^m28 lines. Eye pigment levels of homozygous individuals are, respectively, 13-fold and 20-fold those of their heterozygous siblings. PSA

observed in *AbGA*^m28 is lost in *trx*^{E2} or *brm*² mutant backgrounds. Right: when heterozygous, the *Ab-Fab* insertion does not maintain the memory of active chromatin states after a pulse of embryonic GAL4 activation. **c**, Immuno-FISH with an anti-PH antibody in lines carrying the *Ab-Fab*, *AbGA*^m, *EnPRE* and *EnPREGA*^m constructs. DAPI, 4,6-diamidino-2-phenylindole.

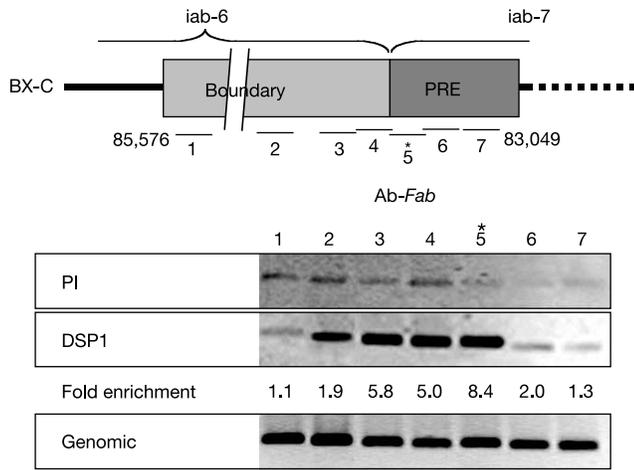


Figure 3 Binding of DSP1 in the *Fab-7* region. DSP1 ChIP performed on embryos 0–14 h old. The association of DSP1 to seven fragments of about 220 bp covering the *Fab-7* element is shown. PI indicates the preimmune serum control immunoprecipitation. Fold enrichment indicates the ratio between DSP1 and PI signals. The panel labelled ‘genomic’ shows the amplification of genomic DNA with the same primers, done as a control for the efficiency of PCR amplification. Note that, although the G(A)-containing *Ab-Fab* region is strongly bound by DSP1, a neighbouring fragment containing four G(A) motifs is weakly enriched (PCR fragment 6). This indicates that the presence of a G(A) motif is not the sole determinant of binding. The DNA sequence context might influence the strength of DSP1 binding *in vivo*, or binding might require additional DNA sequence determinants. The asterisk indicates the *Ab-Fab* fragment. *iab-6* and *iab-7* indicate two genomic regions regulating the parasegment-specific expression of the homeotic gene *Abd-B*. The endogenous *Fab-7* element is located at the border between them.

DNA sequences might contribute to robust tethering of PcG proteins and to the pairing sensitivity.

To evaluate the importance of the G(A) motif, we mutated or deleted it in two natural PREs: *Ab-Fab* and the core PRE from the *engrailed* gene (*EnPRE*)¹⁵ (constructs *AbGA^m* or *AbΔGA* and *EnPREGA^m*; Fig. 2a). These mutations disrupted PSS, and they severely reduced the recruitment of PH, PHO and E(Z) proteins to the transgenes (see Fig. 2 and Supplementary Figs 2 and 4). This shows that the G(A) motif is necessary for PcG recruitment at *Drosophila* PREs. In contrast, GAF was still able to bind the *AbGA^m-Fab* transgene (see Supplementary Fig. 3), indicating that the GAF pathway of PcG protein recruitment can be uncoupled from the PHO pathway.

In addition to loss of silencing, an unexpected phenotype was observed in about half of the lines carrying G(A) mutated transgenes: *mini-white* expression was abnormally increased when the transgenes were in the homozygous state. We call this phenotype ‘pairing-sensitive activation’ (PSA), to indicate that *mini-white* expression is synergistically activated by transgene homozygosity, resulting in eye pigment levels much higher than double the heterozygous levels (Fig. 2b). Crossing flies from two independent *AbGA^m* PSA lines results in *trans* heterozygous progeny (carrying one copy of the transgene at each of two distinct insertion sites). In this case, the two transgenes express additively instead of synergistically (Fig. 2b), indicating that, as in PSS, PSA depends on homologous pairing of the transgenes and not simply on the total transgene copy number. PSA also depends on *trxG* proteins, because it was affected in an *AbGA^m* line tested in a mutant background for the two *trxG* genes *trithorax* (*trx*) or *brahma* (*brm*). Conversely, mutation in *ph* (*ph⁴¹⁰*) did not have any effect (Fig. 2b). *Ab-Fab* has previously

been shown to mediate the *trxG*-dependent maintenance of active chromatin states after an embryonic pulse of transcriptional activation². However, we found that this maintenance can be observed only when *Ab-Fab* is in a homozygous state (Fig. 2b), indicating that somatic pairing of homologous chromosomes, a phenomenon known for its influence on homeotic gene expression in *Drosophila*¹⁸, might affect *trxG*-dependent regulation. These data indicate that mutation of the G(A) motif mimics an embryonic pulse of transcriptional activation, switching a PRE into a TRE.

The G(A) motif is specifically bound by a nuclear activity in electrophoretic mobility-shift assays (EMSA) with an 18-bp probe from *Ab-Fab* (see Supplementary Fig. 5). Among candidate proteins that might recognize this motif, we analysed DSP1, which is a *Drosophila* homologue of human HMGB2. This HMG protein has been shown to act as a transcriptional corepressor^{19,20} and to be capable of recognition of DNA motifs resembling the G(A) site²⁰. Moreover, DSP1 is required for the generation of a DNase I-hypersensitive region at the PRE-containing *MCP* element of the *BX-C²¹*, a *Drosophila* Hox gene cluster. Last, a *dsp1* mutant displays PcG and *trxG* homeotic phenotypes²¹. Despite the fact that HMGB1 and HMGB2 show weak sequence-specificity of DNA binding *in vitro*²², EMSAs indicate that recombinant DSP1 induces the same shift of the G(A) probe as that obtained with nuclear extract, whereas it binds poorly to the mutated probe (see Supplementary Fig. 5). Moreover, chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments with embryonic chromatin showed that DSP1 binds the *Fab-7* region *in vivo*. Within *Fab-7*, binding was greatest at the *Ab-Fab* region (polymerase chain reaction (PCR) fragment 5; see Fig. 3), which is consistent with the previously reported binding profile of the Polycomb protein²³. In polytene chromosomes, DSP1 binds specifically to about 200 distinct sites (Fig. 4a). In double-staining experiments, DSP1 localizes together with the PH protein at most of the PH target sites (Fig. 4a), although the absence of PH from a fraction of the DSP1 sites indicates that DSP1 has other functions in addition to PcG protein recruitment.

DSP1 was recruited to the *Ab-Fab* transgene *in vivo*, and mutation of the G(A) motif in the *AbGA^m* transgene abolished DSP1 recruitment (Fig. 4b). The *EnPRE* transgene also induced a G(A)-motif-dependent DSP1 recruitment *in vivo*, although to weaker levels than *Ab-Fab*. Together with the *in vitro* data, these results indicate that DSP1 binding to PREs induces the recruitment of PcG proteins and PcG-mediated silencing. Consistent with this hypothesis, crossing of *Ab-Fab*, *SynGA-Fab* as well as *EnPRE* transgenic flies into a *dsp1* loss-of-function mutant background (*dsp1¹*) induced strong derepression of *mini-white*, to levels similar to those of PSA lines carrying transgenes with mutated G(A) motifs (see Fig. 4c). Derepression was particularly strong in males homozygous for the transgene, whereas it was weaker in heterozygous individuals (see Supplementary Fig. 6). This paralleled a strong decrease in PH recruitment, as seen by polytene chromosome staining. Intriguingly, these effects were less pronounced in females (see Supplementary Fig. 7), indicating that other factors might partly complement for DSP1 in female flies.

The role of DSP1 might be to help establish a chromatin architecture that facilitates the binding of PHO at its cognate consensus sequences in PREs. Once bound, PHO might then recruit the PRC2 complex, as well as PRC1 components, by direct protein–protein contacts and induction of histone marks^{11,24}. The identification of a G(A) motif in a fraction of putative PRE sequences identified in a bioinformatic survey of the *Drosophila* genome¹² indicates that a DSP1-dependent mechanism might be widely used to recruit PcG proteins at their genomic targets. In contrast, GAF recruitment is independent of DSP1 and might require additional DNA sequences present within the core PRE. The findings that

SynGA-*Fab* is unable to recruit GAF and that it does not induce pairing effects indicate that GAF might contribute to pairing-dependent functions of *Drosophila* PREs. In humans, DNA repetitive sequences named 'D4Z4 repeats' repress neighbouring genes by

the recruitment of a repressive complex containing Yin-Yang-1 (the human homologue of PHO), nucleolin and HMGB2 proteins²⁵. The link between HMGB2 proteins and the PcG machinery might therefore be evolutionarily conserved. □

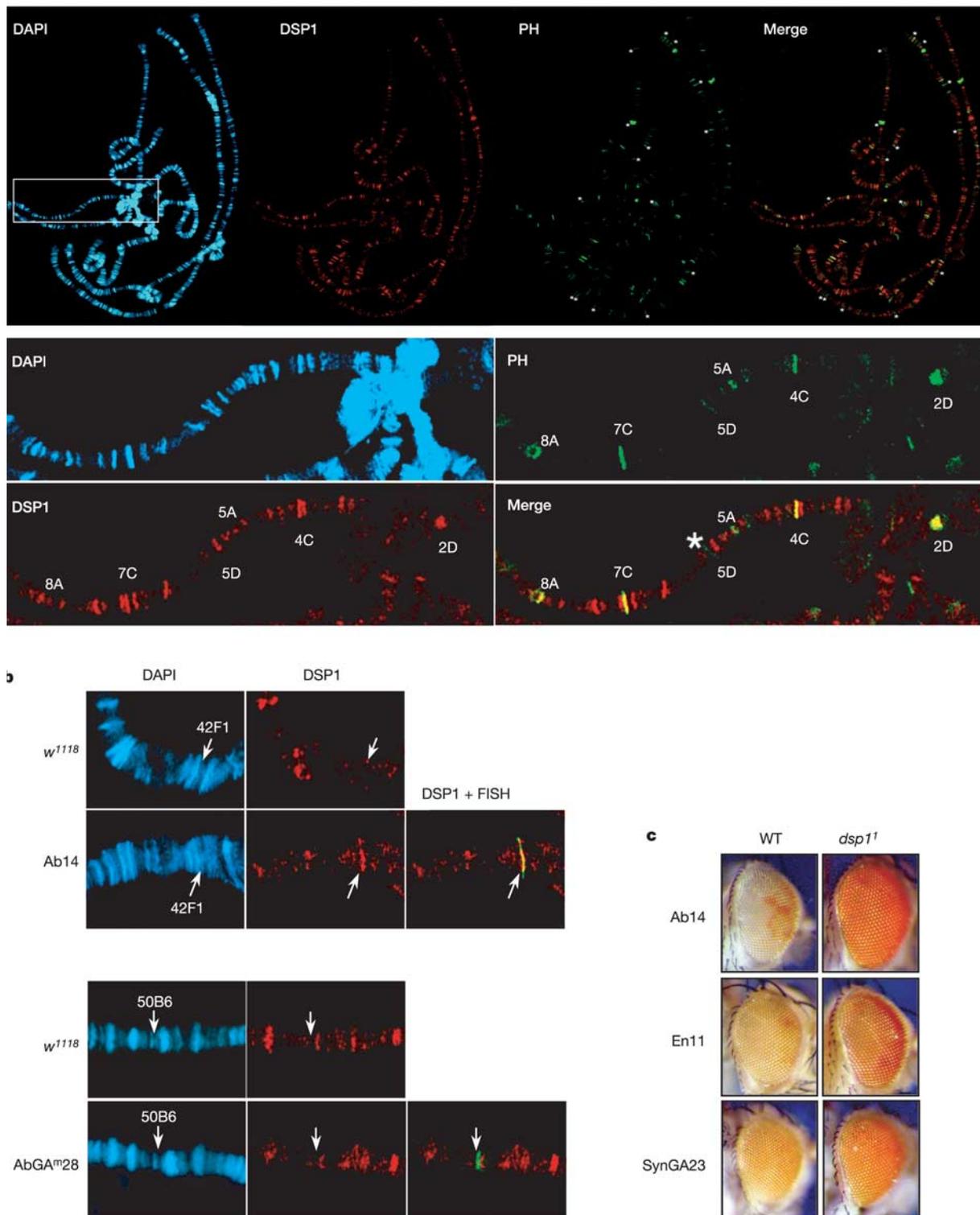


Figure 4 DSP1 participates in PcG-mediated repression. **a**, Co-localization between PH and DSP1 on polytene chromosomes from *w*¹¹¹⁸ larvae. Asterisks indicate PH sites not bound by DSP1. The bottom panel shows a magnification of the X chromosome, in which all PH sites (except 5D) are also bound by DSP1. DAPI, 4,6-diamidino-2-phenylindole.

b, *Ab-Fab*, but not *AbGA^m*, recruits DSP1 *in vivo*, as shown by DSP1 immuno-FISH on *Ab14* or *AbGA^m28* larvae. **c**, Derepression of *mini-white* in the *Ab14*, *En11* and *SynGA23* transgenic lines in a *dsp1*¹ mutant background. WT, wild type.

tel-00011521, version 1 - 1 Feb 2006

Methods

DNA cloning, synthetic *Fab* constructs and fly work

Ab-*Fab*, Mini-*Fab*, AbPHOtm, AbGAFtm, AbGAtm, AbΔGA, *EnPRE* and *EnPREGA*tm fragments were obtained by PCR with specific primers. *Syn-Fab* was constructed by primer extension by using five overlapping oligonucleotides. An additional round of PCR was performed on the resulting template. *SynGA-Fab* was obtained after PCR mutagenesis on the *Syn-Fab* template. The AbGAtm mutant bears the GACGC mutation in place of GAAAA, whereas the *EnPREGA*tm mutant bears the GCGCA motif so as to leave the PHO site intact. In AbΔGA, the GAAAA motif was deleted from Ab-*Fab*. The sequences of all primers are available from the authors on request. All inserts are cloned into the pUZ vector for transgenesis and were checked by sequencing. Insertion orientation and insert copy number were also verified by PCR. Details of crosses used to obtain transgenic lines into *trx*^{E2}, *brm*², *dsp1*¹ and *ph*⁴¹⁰ mutant backgrounds are available from the authors on request. Eye pictures were obtained using a Nikon Coolpix 990 charge-coupled device camera mounted on a MZFLIII binocular microscope (Leica). For eye colour comparison, all individuals to be compared were of the same age and were imaged in the same frame.

Immunostaining and immuno-FISH on polytene chromosomes

Both chromosome staining procedures were performed as described previously². Antibodies used in immuno-FISH (fluorescence *in situ* hybridization) were described previously^{2,26}. For DSP1/PH double immunostaining, a goat anti-PH antibody was developed with the same protocol as that for the rabbit anti-PH, and recognizes the same bands in polytene chromosomes.

Nuclear extract preparation, DSP1 purification and EMSAs

Nuclear extracts from 0–12-h embryos were prepared as described previously²⁷. Nuclear extracts obtained from *Drosophila* SL2 cells were prepared with the Active-Motif Nuclear Extract Kit, in accordance with the manufacturer's recommendations. Recombinant DSP1 protein was obtained as described previously²⁶. Probe sequences used in the bandshift assays were as follows: WT (wild type), 5'-CGAGCTGAAAATGAAGAA-3'; and Mut, 5'-CGAGCTGACGCTGAAGAA-3'. Double-stranded probes were labelled with [γ -³²P]ATP and the T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs) in accordance with the manufacturer's instructions. The mutation used is the same as that used *in vivo* into AbGAtm. Binding reactions were performed for 20 min at 4 °C with 5 μg nuclear extract and 25 fmol labelled probes (approx. 10⁴ c.p.m. per reaction), in 15 μl binding buffer (25 mM HEPES-KOH pH 7.6, 1 μg poly(dI-dC), 10 μM zinc acetate, 3 mM MgCl₂, 30 mM KCl, 2.5 mM dithiothreitol, 0.01% Tween 20, 5% glycerol). DNA-protein complexes were resolved on 6% polyacrylamide-Tris/borate/EDTA gels at 4 °C and 10 V cm⁻¹.

ChIP experiments

Cross-linked embryonic chromatin was prepared as described previously²³ and immunoprecipitations were performed by following the protocol in ref. 28. Chromatin (50 μg) was immunoprecipitated with either 1.5 μg purified anti-DSP1 antibodies or with preimmune serum. The PCR fragment coordinates correspond to the published *BX-C* sequence²⁹. Quantification was performed on the products from two independent ChIP experiments, and enrichments are expressed as the ratio between the anti-DSP1 and the preimmune serum signals. The sequence of PCR primers is available from the authors upon request.

Received 3 November 2004; accepted 25 January 2005; doi:10.1038/nature03386.

- Francis, N. J. & Kingston, R. E. Mechanisms of transcriptional memory. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 409–421 (2001).
- Déjardin, J. & Cavalli, G. Chromatin inheritance upon Zeste-mediated Brahma recruitment at a minimal cellular memory module. *EMBO J.* **23**, 857–868 (2004).
- Fauvarque, M.-O. & Dura, J.-M. *polyhomeotic* regulatory sequences induce developmental regulator-dependent variegation and targeted P-element insertions in *Drosophila*. *Genes Dev.* **7**, 1508–1520 (1993).
- Kassis, J. A. Unusual properties of regulatory DNA from the *Drosophila engrailed* gene: three 'pairing-sensitive' sites within a 1.6-kb region. *Genetics* **136**, 1025–1038 (1994).
- Chan, C. S., Rastelli, L. & Pirrotta, V. A *Polycomb* response element in the *Ubx* gene that determines an epigenetically inherited state of repression. *EMBO J.* **13**, 2553–2564 (1994).
- Zink, D. & Paro, R. *Drosophila Polycomb*-group regulated chromatin inhibits the accessibility of a *trans*-activator to its target DNA. *EMBO J.* **14**, 5660–5671 (1995).
- Hagstrom, K., Muller, M. & Schedl, P. A *Polycomb* and GAGA dependent silencer adjoins the *Fab-7* boundary in the *Drosophila* bithorax complex. *Genetics* **146**, 1365–1380 (1997).
- Shimell, M. J., Peterson, A. J., Burr, J., Simon, J. A. & O'Connor, M. B. Functional analysis of repressor

- binding sites in the *iab-2* regulatory region of the abdominal-A homeotic gene. *Dev. Biol.* **218**, 38–52 (2000).
- Mishra, R. K. *et al.* The *iab-7* polycomb response element maps to a nucleosome-free region of chromatin and requires both GAGA and Pleiohomeotic for silencing activity. *Mol. Cell Biol.* **21**, 1311–1318 (2001).
- Kassis, J. A. Pairing-sensitive silencing, polycomb group response elements, and transposon homing in *Drosophila*. *Adv. Genet.* **46**, 421–438 (2002).
- Wang, L. *et al.* Hierarchical recruitment of polycomb group silencing complexes. *Mol. Cell* **14**, 637–646 (2004).
- Ringrose, L., Rehmsmeier, M., Dura, J. M. & Paro, R. Genome wide prediction of Polycomb/Trithorax response elements in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Cell* **5**, 759–771 (2003).
- Fritsch, C., Brown, J. L., Kassis, J. A. & Muller, J. The DNA-binding polycomb group protein pleiohomeotic mediates silencing of a *Drosophila* homeotic gene. *Development* **126**, 3905–3913 (1999).
- Busturia, A. *et al.* The MCP silencer of the *Drosophila* Abd-B gene requires both Pleiohomeotic and GAGA factor for the maintenance of repression. *Development* **128**, 2163–2173 (2001).
- Americo, J. *et al.* A complex array of DNA-binding proteins required for pairing-sensitive silencing by a Polycomb group response element from the *Drosophila* engrailed gene. *Genetics* **160**, 1561–1571 (2002).
- Brown, J. L., Mucci, D., Whiteley, M., Dirksen, M.-L. & Kassis, J. A. The *Drosophila* Polycomb group gene *pleiohomeotic* encodes a DNA binding protein with homology to the transcription factor YY1. *Mol. Cell* **1**, 1057–1064 (1998).
- Brown, J. L., Fritsch, C., Mueller, J. & Kassis, J. A. The *Drosophila* pho-like gene encodes a YY1-related DNA binding protein that is redundant with pleiohomeotic in homeotic gene silencing. *Development* **130**, 285–294 (2003).
- Duncan, I. W. Transfection effects in *Drosophila*. *Annu. Rev. Genet.* **36**, 521–556 (2002).
- Lehming, N. *et al.* An HMG-like protein that can switch a transcriptional activator to a repressor. *Nature* **371**, 175–179 (1994).
- Brickman, J. M., Adam, M. & Ptashne, M. Interactions between an HMG-1 protein and members of the Rel family. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 10679–10683 (1999).
- Decoville, M., Giacomello, E., Leng, M. & Locker, D. DSP1, an HMG-like protein, is involved in the regulation of homeotic genes. *Genetics* **157**, 237–244 (2001).
- Thomas, J. O. HMG1 and 2: architectural DNA-binding proteins. *Biochem. Soc. Trans.* **29**, 395–401 (2001).
- Cavalli, G. & Paro, R. The *Drosophila Fab-7* chromosomal element conveys epigenetic inheritance during mitosis and meiosis. *Cell* **93**, 505–518 (1998).
- Mohd-Sarip, A., Venturini, F., Chalkley, G. E. & Verrijzer, C. P. Pleiohomeotic can link polycomb to DNA and mediate transcriptional repression. *Mol. Cell Biol.* **22**, 7473–7483 (2002).
- Gabellini, D., Green, M. R. & Tupler, R. Inappropriate gene activation in FSHD: a repressor complex binds a chromosomal repeat deleted in dystrophic muscle. *Cell* **110**, 339–348 (2002).
- Mosrin-Huaman, C., Canaple, L., Locker, D. & Decoville, M. DSP1 gene of *Drosophila melanogaster* encodes an HMG-domain protein that plays multiple roles in development. *Dev. Genet.* **23**, 324–334 (1998).
- Franko, A. *et al.* Polycomb and polyhomeotic are constituents of a multimeric protein complex in chromatin of *Drosophila melanogaster*. *EMBO J.* **11**, 2941–2950 (1992).
- Orlando, V., Strutt, H. & Paro, R. Analysis of chromatin structure by *in vivo* formaldehyde cross-linking. *Methods* **11**, 205–214 (1997).
- Martin, C. H. *et al.* Complete sequence of the bithorax complex of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **92**, 8398–8402 (1995).

Supplementary Information accompanies the paper on www.nature.com/nature.

Acknowledgements This paper is dedicated to N. Riccò. We thank all laboratory members for input during the course of this work and for critical reading of the manuscript; F. Juge for developing the goat anti-PH antibody; P. Atger for artwork; R. Paro for the gift of rabbit anti-PH antibody; and V. Pirrotta for the gifts of anti-PHO and anti-E(Z). J.D. and A.R. were supported by fellowships from the 'Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche' and by a grant from 'La ligue nationale contre le cancer'. O.C. is supported by an HFSP long-term fellowship. D.L. and M.D. are supported by grants from the CNRS. Research in the Cavalli laboratory is supported by grants from the CNRS, the HFSP, the 6th EU Framework Project, the 'Fondation pour la Recherche Médicale', the 'Fondation Schlumberger pour l'Éducation et la Recherche' and the 'Association pour la Recherche sur le Cancer'.

Competing interests statement The authors declare that they have no competing financial interests.

Correspondence and requests for materials should be addressed to G.C. (giacomo.cavalli@igh.cnrs.fr).

Supplementary Information Guide:

There are 7 supplementary figures accompanying this paper.

Supplementary Figure 1 (Format: Adobe pdf; Size: 260 kb)

Title: '*PH recruitment to AbGAF^m and AbPHO^m*'.

These immuno-FISH stainings of polytene chromosomes show that mutation of PHO sites completely disrupts PH recruitment, while mutation of GAF sites reduces, but does not suppress, PH recruitment.

Supplementary Figure 2 (Format: Adobe pdf; Size: 216 kb)

Title: '*PHO recruitment to Ab-Fab and derivative constructs*'.

These immuno-FISH stainings of polytene chromosomes show that the mutation of the *Ab-Fab* G(A) motif reduces PHO recruitment. In addition, while containing three PHO binding sites, PHO can not bind to *Syn-Fab*. The addition of the G(A) motif (*SynGA-Fab*) leads to a weak but reproducible recruitment of PHO.

Supplementary Figure 3 (Format: Adobe pdf; Size: 228 kb)

Title: '*Pairing sensitive effects correlate with GAF recruitment*'.

These polytene chromosome immuno-FISH stainings show that the mutation of the *Ab-Fab* G(A) motif does not abolish GAF recruitment. In addition, while containing two GAF binding sites, GAF can neither bind to *Syn-Fab* nor to *SynGA-Fab*. These data suggest a role for GAF in pairing effects observed at PRE/TRE.

Supplementary Figure 4 (Format: Adobe pdf; Size: 196 kb)

Title: '*E(Z) recruitment to Ab-Fab and derivative constructs*'.

These immuno-FISH stainings of polytene chromosomes show that the mutation of the *Ab-Fab* G(A) motif reduces E(Z) recruitment. Consistent with PHO stainings, *SynGA-Fab* can recruit weak amounts of E(Z).

Supplementary Figure 5 (Format: Adobe pdf; Size: 640 kb)

Title: '*In vitro binding of DSP1 to the G(A) motif present into Ab-Fab*'.

This is an electrophoretic mobility shift assay showing that DSP1 binds to a probe containing the G(A) motif.

Supplementary Figure 6 (Format: Adobe pdf; Size: 364 kb)

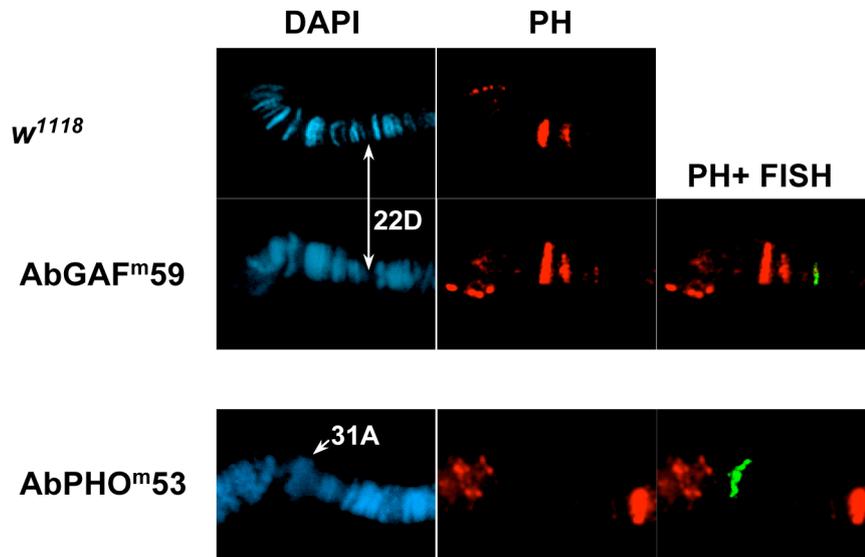
Title: '*Effects of $dsp1^1$ background on PSA*'.

This is an eye pigment quantification of *Ab-Fab* and *EnPRE* transgenic lines into a *dsp1* loss of function mutant background. This context mimics what happens when the G(A) motif is mutated in these PREs and a PSA is observed.

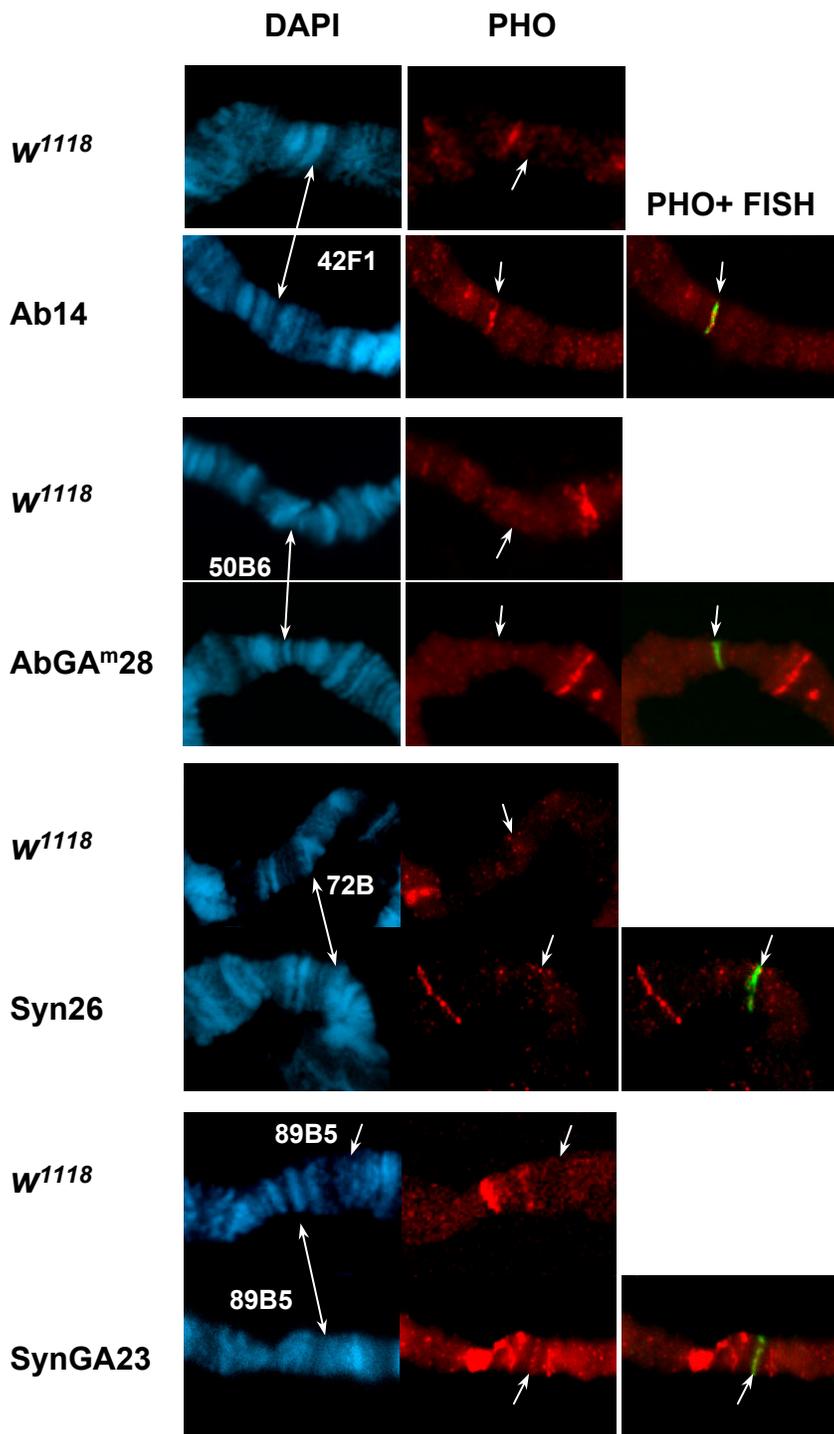
Supplementary Figure 7 (Format: Adobe pdf; Size: 164 kb)

Title: '*dsp1* mutation affects PH recruitment at *Ab-Fab*'.

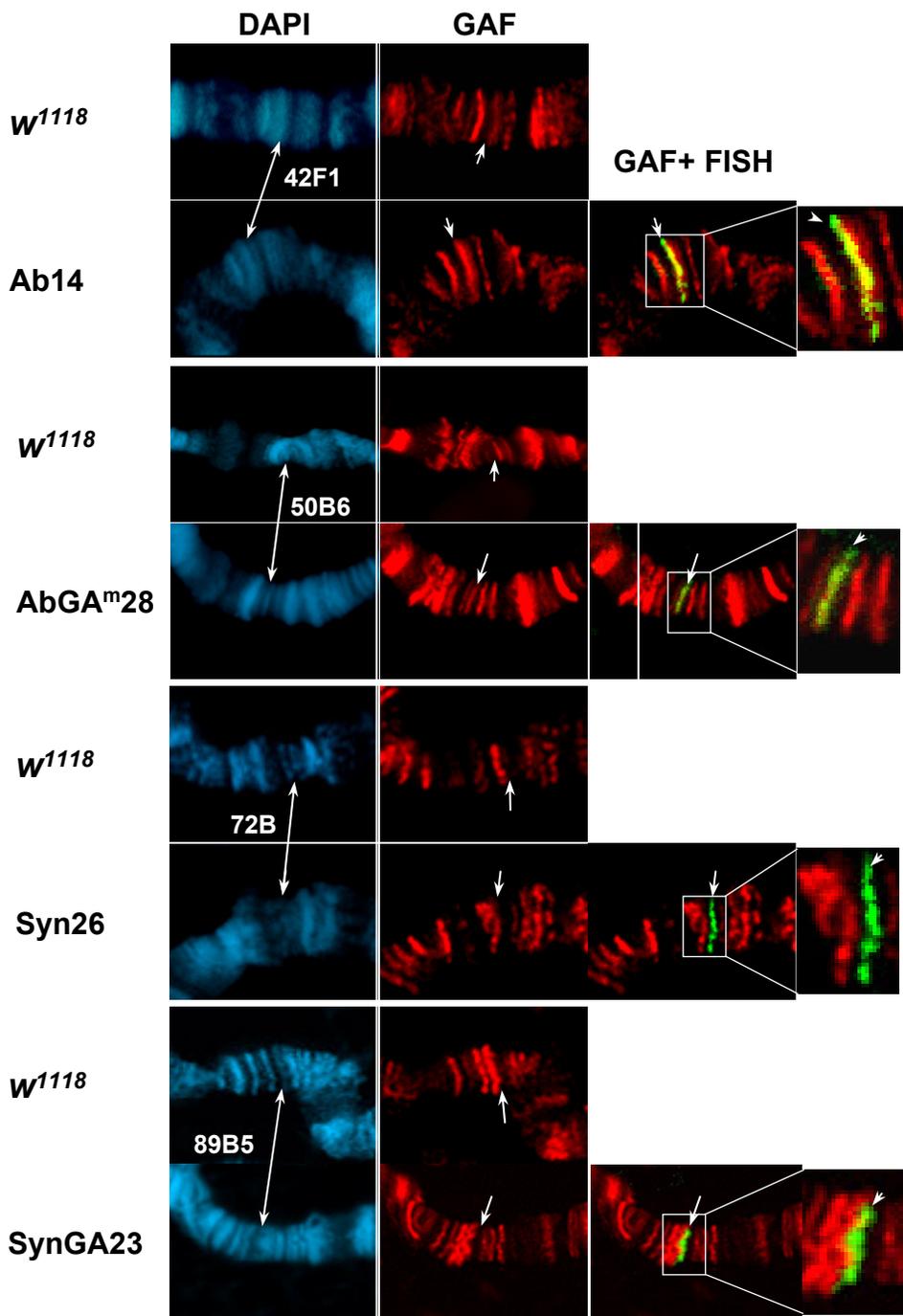
These immuno-FISH stainings of polytene chromosomes show that the mutation of the *dsp1* gene affects PH recruitment to *Ab-Fab*. This effect is seen in male chromosomes, while binding can still be observed in female chromosomes.



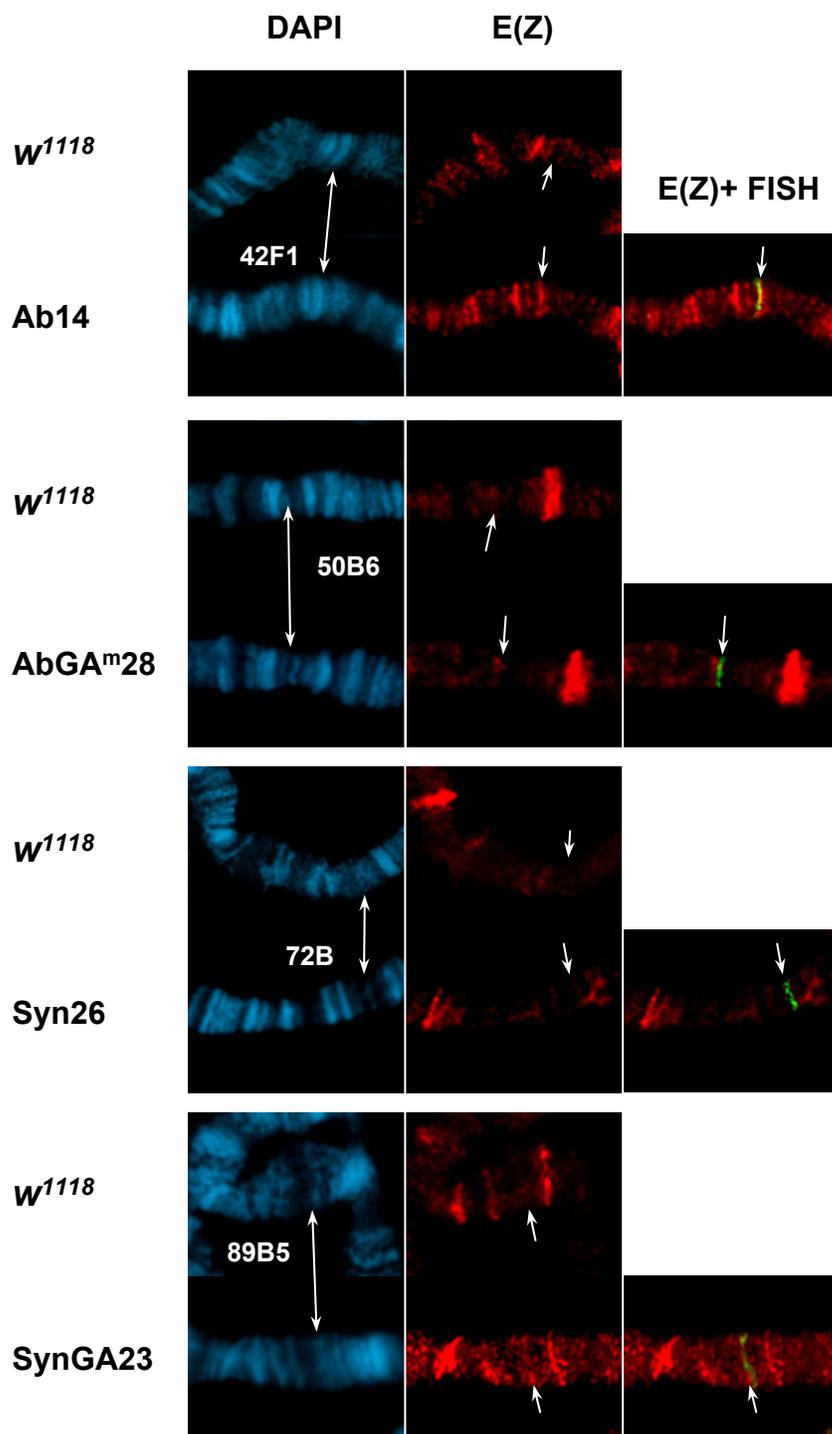
Supplementary Figure 1. *PH recruitment to AbGAF^m and AbPHO^m.* Top, the PH pattern is shown at the AbGAF^m transgene insertion site in control flies (*w¹¹¹⁸* panel) and in AbGAF^m59 transgenic flies. Bottom, the PH binding pattern is shown at the insertion site of AbPHO^m53. The names of the transgenic lines are indicated at the left of each panel row. PH binding was not detected at the AbPHO^m insertion site, while AbGAF^m can recruit weak amounts of PH.



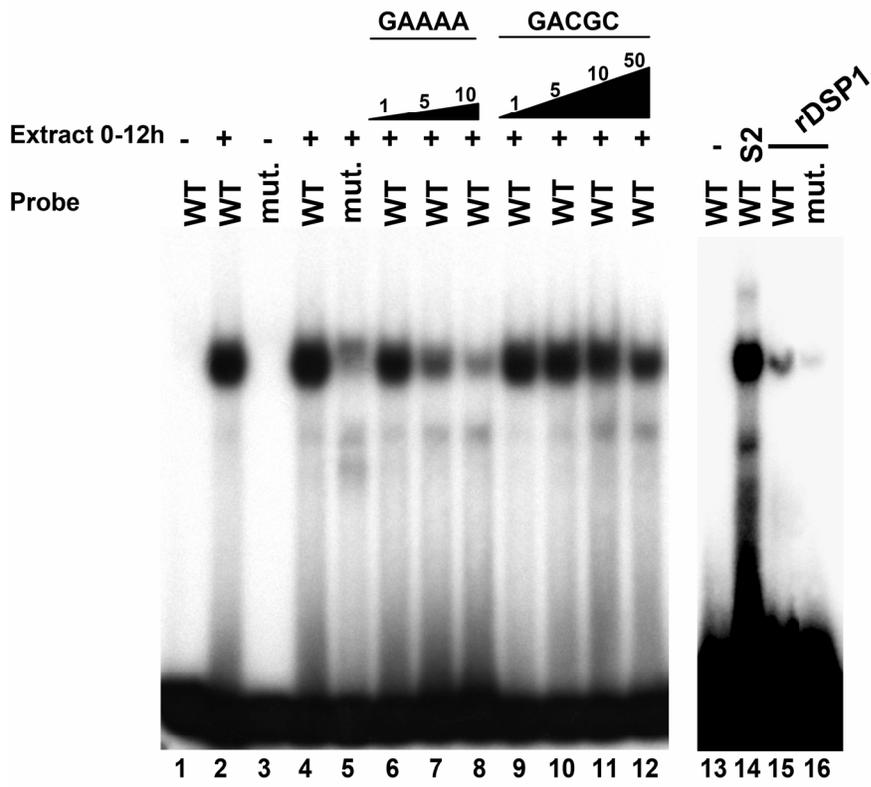
Supplementary Figure 2. *PHO* recruitment to Ab-Fab and derivative constructs. *PHO* binding patterns at the insertion sites are shown in the absence of transgenes (*w¹¹¹⁸* panels) or in the presence of different transgenes. The name of the transgenic lines are indicated at the left of each panel row. Ab-Fab recruits *PHO*, while *PHO* binding to AbGA^{m28} is strongly reduced. While three *PHO* consensus sites are present into Syn-Fab, no *PHO* recruitment is detected on this construct. The addition of the G(A) motif leads to a weak *PHO* recruitment in a fraction of the chromosomes (SynGA23 panel).



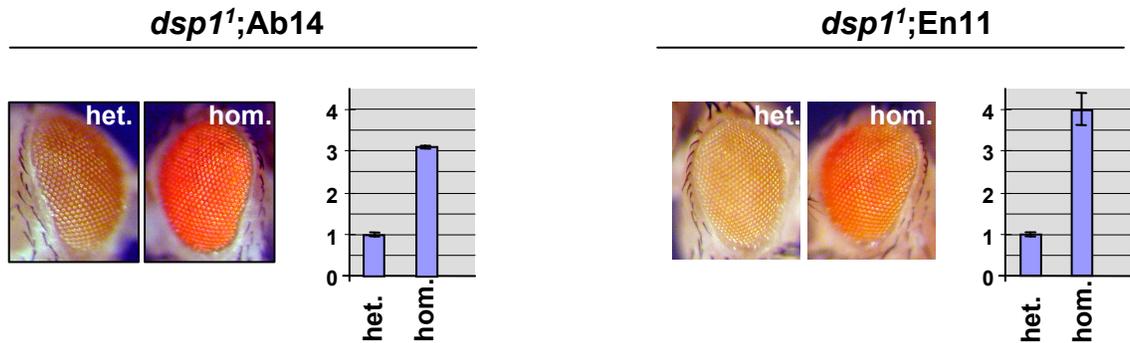
Supplementary Figure 3. *Pairing sensitive effects correlate with GAF recruitment.* GAF binding patterns at the insertion sites are shown in the absence of transgenes (w^{1118} panels) or in the presence of different transgenes. The staining pattern at the transgene site is magnified in the right panels. The name of the transgenic lines are indicated at the left of each panel row. Ab-*Fab* and AbGA^m28 recruit GAF. Surprisingly, while two GAF consensus sites are present in the Syn-*Fab* transgene, no GAF recruitment is detected. The addition of the G(A) motif has no effect on GAF recruitment. This correlates with pairing effects: Ab-*Fab* as well as AbGA^m-*Fab* show PSS and PSA respectively, and recruit GAF in both cases. Artificial constructs, unable to show these pairing effects, do not recruit GAF, even when capable of silencing like the SynGA transgene (see SynGA23 panels). Thus, the G(A) motif has no role in recruiting GAF, and GAF is likely to play a role in establishing pairing effects rather than in PcG-mediated silencing.



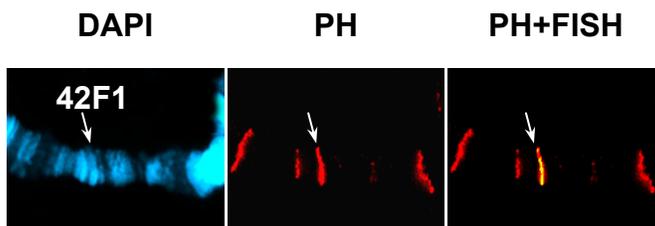
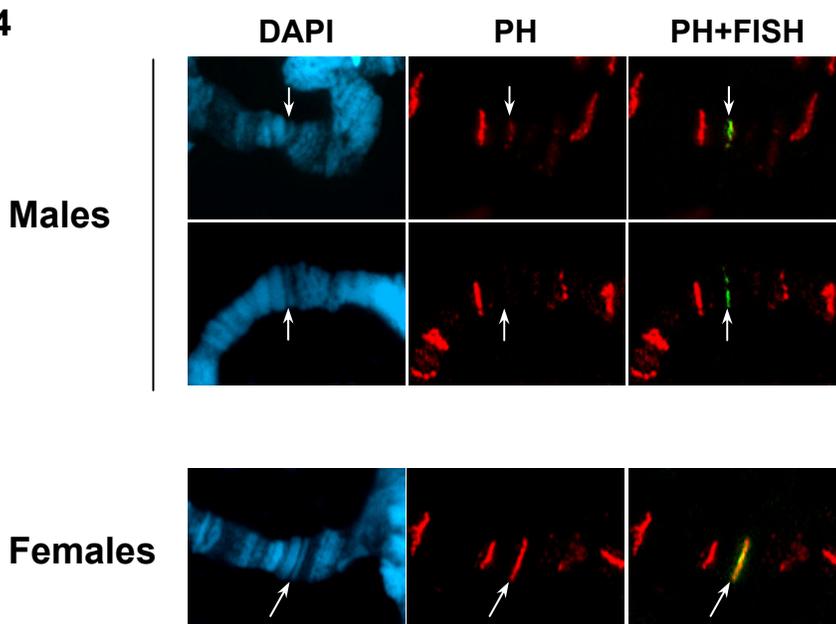
Supplementary Figure 4. *E(Z)* recruitment to Ab-Fab and derivative constructs. *E(Z)* binding patterns at the insertion sites are shown in the absence of transgenes (*w*¹¹¹⁸ panels) or in the presence of different transgenes. The name of the transgenic lines are indicated at the left of each panel row. Ab-Fab recruits *E(Z)*, while *E(Z)* binding to AbGA^{m28} is strongly reduced. No *E(Z)* recruitment is detected on Syn-Fab. The addition of the G(A) motif leads to a weak recruitment in a fraction of the chromosomes (SynGA23 panel).



Supplementary Figure 5. *In vitro* binding of DSP1 to the G(A) motif present in Ab-Fab. EMSA using embryonic nuclear extracts (lanes 1-11), Drosophila SL2 cell nuclear extracts (lane 14), or 100 ng of purified recombinant DSP1 protein (lanes 15-16). Specific competition is shown in lanes 6-8 whereas non-specific competition using the mutated cold probe is shown in lanes 9-12.



Supplementary Figure 6. *Effects of $dsp1^1$ background on PSA.* Eye colour of heterozygous versus homozygous males is shown for Ab14 and En11 transgenic lines. The eye pigment quantification indicates 3 and 4 fold increase when Ab14 and En11 are at the homozygous state, respectively. This weaker PSA effect compared to mutations of G(A) motifs in endogenous PREs is due to a detectable derepression of *mini-white* in heterozygous $dsp1^1$; Ab14 and En11 males.

Ab14***dsp1¹*;Ab14**

Supplementary Figure 7. *dsp1* mutation affects PH recruitment at Ab-Fab. Immuno-FISH experiments showing that PH recruitment at Ab-Fab is strongly reduced in *dsp1¹*;Ab14 males. Two chromosomes are shown for males. As a control, PH recruitment to Ab-Fab is shown into a wild-type background (top panels). In this situation, no difference is observed between males and females. In contrast, bottom panels show that PH can still be recruited at Ab-Fab in females. This correlates with the weaker mini-*white* derepression observed in Ab14 flies carrying the *dsp1¹* mutation (not shown).

II.2 Conclusion

L'une des questions clés concernant les mécanismes d'action des protéines PcG et TrxG est de comprendre comment peut être initié le maintien de l'expression des gènes au cours du développement. Au cours de notre étude, nous nous sommes intéressés au rôle de DSP1 dans l'activité répressive du domaine *Ab-Fab*. Nous avons montré le rôle de DSP1 en tant que recruteur des protéines PcG. DSP1 se fixe sur une séquence particulière G(A)₄ et pourrait induire un remodelage de la chromatine indispensable au recrutement de PHO sur sa séquence cible. PHO recruterait à son tour les complexes ESC-E(Z) et PRC1 par des interactions du type protéine-protéine et modification du code histone. Cependant, nous montrons que le recrutement de GAF est indépendant de DSP1. Cela suggère un système de recrutement différent pour PHO et GAF. Le fait que la séquence G(A)₄, localisée à proximité d'un site PHO, soit présente dans de nombreux CMM indique que DSP1 est largement impliquée dans le recrutement des protéines PcG.

III Cibles de DSP1 en dehors des gènes homéotiques

La souche mutante *dsp1¹* isolée au laboratoire présente un phénotype très pléiotrope qui va au-delà des transformations homéotiques. Ces résultats et ceux d'immunolocalisation sur les chromosomes géants des glandes salivaires suggèrent que DSP1 intervient dans la régulation d'autres gènes que les gènes homéotiques.

III.1 DSP1 régule l'expression de knirps

III.1.1 Introduction à l'article 3

La souche mutante *dsp1¹* présente une malformation du segment abdominal A4 à tous les stades du développement. Nous avons montré que ce type d'anomalie était dû à l'absence de la protéine DSP1 d'origine maternelle et que la fréquence d'apparition de cette malformation est dépendante de la dose en protéine DSP1 maternelle présente. Cette malformation du segment abdominal A4 est un trait phénotypique présenté par certaines mutations de gènes lacunaires régulateurs de la segmentation précoce de l'embryon, comme les gènes *kni* et *kr*. Nous avons montré par immunolocalisation des produits de ces gènes sur des embryons que le domaine d'expression du gène *kni* diminue chez le mutant *dsp1¹* par rapport à une souche sauvage. La malformation du segment abdominal A4 est donc corrélée à un défaut de l'expression du gène *kni* chez la souche mutante *dsp1¹*. Cette conclusion est renforcée par la mise en évidence par croisement d'une interaction génétique entre les gènes *kni* et *dsp1*. Il existe une forte interaction génétique entre le gène *dsp1* et un gène codant un activateur de la transcription de *kni* : le gène *bcd*. Ainsi les protéines codées par les gènes *dsp1* et *bcd* sont susceptibles d'intervenir au niveau du même mécanisme régulateur de la transcription de *kni*. Pour conforter les hypothèses formulées à partir des résultats obtenus génétiquement concernant l'interaction entre les gènes *dsp1* et *bcd*, et comprendre le rôle de DSP1 dans l'activation du gène *kni*, nous avons utilisé des techniques de biochimie et de biologie moléculaire. Dans un premier temps, nous avons recherché si les protéines BCD et DSP1 interagissent physiquement. Nous avons montré que ces deux protéines interagissent *in vitro* et ceci par deux méthodes différentes : la technique de far western et celle de résonance plasmonique de surface. Nous avons également mis en évidence que les protéines BCD et

DSP1 interagissent *in vivo* par co-immunoprécipitation des deux protéines à partir d'un extrait protéique embryonnaire. Enfin, la technique ChIP nous a permis de montrer que la protéine DSP1 est présente *in vivo* chez des embryons de drosophile, au niveau de la région régulatrice de *kni* contenant les sites de fixation de la protéine BCD. L'ensemble de ces résultats nous fournit des éléments permettant de discuter du rôle de la protéine DSP1 dans la régulation du gène de segmentation *kni* lors de l'embryogenèse précoce.

ARTICLE

DSP1 Interacts With Bicoid for *knirps* EnhancementA. Daulny,¹ A. Rappailles,¹ L. Landemarre,² D. Locker,¹ and M. Decoville^{1*}¹Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR 4301, conventionnée avec l'Université d'Orléans, Orléans, France²Agro-Bio, S.A.S., La fert  St Aubin, France

Received 5 December 2002; Accepted 13 March 2003

Summary: DSP1 is an HMG-box protein which has been implicated in the regulation of homeotic genes in *Drosophila melanogaster*. Here we report that DSP1 is also involved in the regulation of the *kni* gap gene. Analysis of the phenotype of a null mutation of *dsp1* (*dsp1*¹) reveals that the absence of maternal DSP1 results in A4 segmentation defects that are correlated with a diminution of the *kni* expression domain. Genetic interaction studies demonstrate that a *bcd* mutation enhances the A4 defect of *dsp1*¹. We present in vitro and in vivo evidences for a direct interaction between DSP1 and Bicoid, mediated by the BCD homeodomain and the HMG box of DSP1. Finally, we show by immunoprecipitation of cross-linked chromatin the association of DSP1 with the *kni*-regulating region and discuss the potential mechanism of DSP1-mediated activation of *kni*. *genesis* 36: 104–113, 2003. © 2003 Wiley-Liss, Inc.

Key words: *Drosophila melanogaster*; HMG protein; dsp1; bicoid; *knirps*

INTRODUCTION

Establishment of the pattern along the anterior–posterior axis of *Drosophila* is initiated by maternal gene products which are synthesized during oogenesis (Nusslein-Volhard *et al.*, 1987). These maternal gene products regulate the spatial expression of gap genes. These genes are expressed from the embryonic genome and their products are expressed in large overlapping domains (reviewed in Hulskamp and Tautz, 1991). The precise initiation and maintenance of a stable pattern of gap gene expression is critical for the correct patterning of the embryo.

Bicoid is a key maternal gene which directs pattern formation along the anterior–posterior axis in the developing embryo. The protein Bicoid is a transcriptional activator present in an anterior–posterior concentration gradient (Driever and Nusslein-Volhard, 1988a; Driever and Nusslein-Volhard, 1988b). It binds DNA and stimulates zygotic target genes, in particular, gap genes. Anterior regions that are exposed to high levels of BCD express a different set of genes (*buttonhead*, *orthodenticle*) than more posterior regions where the concentration of Bicoid is lower (*hb*, *Kr*). Although Bicoid is

localized in a gradient with a peak concentration at the anterior pole, it still functions as a transcriptional activator along the entire A–P axis of the *Drosophila* embryo. For example, Bicoid activates *kni*, a posterior gap gene (Rivera-Pomar *et al.*, 1995).

A number of observations also support a role for the *Pc-G* and *trx-G* genes in regulation of segmentation genes. Some *Pc-G* or *trx-G* mutants show segmentation defects in embryos derived from homozygous mothers or in adults (Adler *et al.*, 1989; Breen and Duncan, 1986; Ingham, 1984; McKeon *et al.*, 1994; Moazed and O'Farrell, 1992; Sinclair *et al.*, 1992). These two groups of genes were first identified based on their homeotic phenotypes (Kennison, 1995; Simon, 1995). Their function was to maintain a repressed or activated state of homeotic genes expression initiated by segmentation genes. It is proposed that they act in interaction with other proteins by locally remodeling the chromatin structure. The DSP1 protein, initially identified as a corepressor of Dorsal, was shown to belong to these chromatin remodeling factors. It is an HMG-box protein which is expressed maternally and zygotically in developing embryos and in larvae (Lehming *et al.*, 1994; Mosrin-Huaman *et al.*, 1998). HMG proteins are known to bind to curved or distorted DNA in a sequence-specific manner. It has also been shown that HMG box proteins are able to interact with other proteins and to enhance their activator or repressor functions (Thomas, 2001; Thomas and Travers, 2001). Recently, by analysis of the phenotype of a *dsp1* null mutant, we demonstrated that DSP1 was involved in the regulation of homeotic genes (Decoville *et al.*, 2001).

In this work, we report that *dsp1*¹ mutant shows segmentation defects in embryos and adults reminiscent of gap gene mutations. We examined the expression of various gap genes in embryos mutant for *dsp1*. In addition, we studied the genetic and physical interaction

* Correspondence to: M. Decoville, Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR 4301, conventionnée avec l'Université d'Orléans, 45071 Orléans, France.

E-mail: decovil@cnrs-orleans.fr.

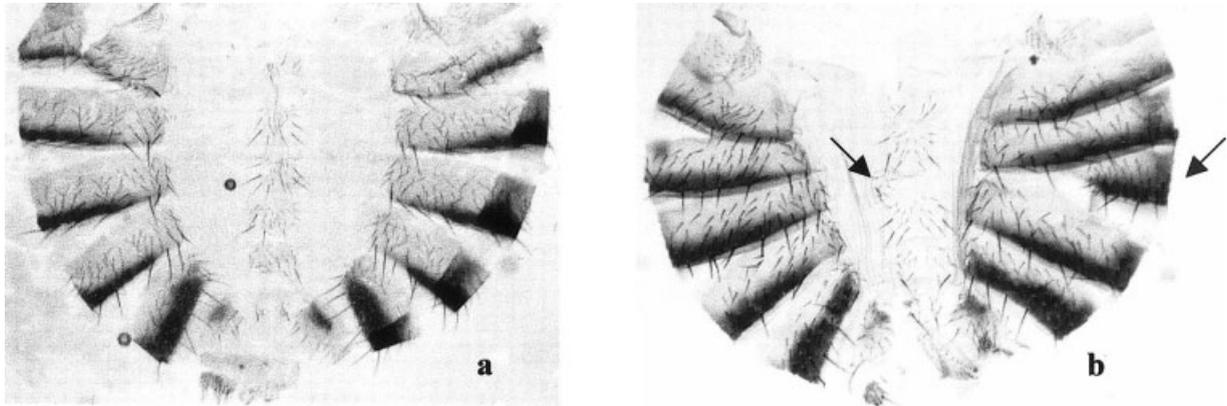


FIG. 1. Adult female phenotypes of homozygous *dsp1*¹ mutant. Whole mounts of abdominal female cuticle of wildtype (a) or *dsp1*¹ (b) are shown. Female abdomen were cut along the dorsal midline and flattened on a slide. The dorsal surface of each abdominal segment has a plate of hard cuticle called tergites. The ventral surface of abdominal segments is composed of pleura on the central midline of hard cuticle called sternites. In *dsp1*¹ females, the fourth tergite is completely or partially absent or deformed and the fourth sternite is incomplete. Arrows indicate affected sternite and tergite.

Table 1
Female Genotypes Crossed to Male Genotypes

Females	Males		
	<i>dsp1</i> ⁺ /Y	<i>dsp1</i> ¹ /Y	<i>dsp1</i> ⁺ /Y; <i>cad</i> ³ / <i>cad</i> ⁺
<i>dsp1</i> ⁺ / <i>dsp1</i> ⁺	0%	0% (120)	
<i>dsp1</i> ¹ / <i>dsp1</i> ¹	25% (1700)	24% (1068)	25% (200)
<i>dsp1</i> ⁺ / <i>dsp1</i> ¹	3.4% (506)	3% (403)	
<i>dsp1</i> ⁺ / <i>dsp1</i> ⁺ ; <i>bcd</i> ¹² /TM3	2.6% (115)	—	
<i>dsp1</i> ¹ / <i>dsp1</i> ⁺ ; <i>bcd</i> ¹² / <i>bcd</i> ⁺	—	41% (178)	
<i>dsp1</i> ¹ / <i>dsp1</i> ¹ ; <i>bcd</i> ¹² / <i>bcd</i> ⁺	—	82% (103)	
<i>dsp1</i> ⁺ / <i>dsp1</i> ⁺ ; <i>bcd</i> ¹⁰ / <i>bcd</i> ⁺	0.5% (183)	—	
<i>dsp1</i> ¹ / <i>dsp1</i> ⁺ ; <i>bcd</i> ¹⁰ / <i>bcd</i> ⁺	—	7.5% (371)	
<i>dsp1</i> ¹ / <i>dsp1</i> ⁺ ; <i>cad</i> ³ / <i>cad</i> ⁺	—	3.3% (614)	—
<i>dsp1</i> ⁺ / <i>dsp1</i> ⁺ ; <i>cad</i> ³ / <i>cad</i> ⁺	2.1% (593)	—	—

Resulting female progeny were examined for A4 segment defect. Data are presented as the percentage of flies showing A4 defects. The numbers in parentheses indicate the number of flies scored.

between *dsp1* and *bcd*. Our results support a role for DSP1 in the regulation of *kni* expression, mediated by the interaction with the Bicoid protein.

RESULTS

*dsp1*¹ Shows A4 Segment Abnormalities

The *dsp1*¹ mutant has been described in Mosrin-Huaman *et al.* (1998) and Decoville *et al.* (2001). We have shown that *dsp1*¹ mutant embryos exhibited segmentation defects, the main abnormality involving the A4 segment. Here we investigated this phenotype in more detail. Observation of *dsp1*¹/*dsp1*¹ adults revealed that they show abnormalities on the A4 segment as embryos, about 25% of females being concerned (Fig. 1). These abnormalities affected the tergites and the sternites—we observed deletion of half sternite or tergite or ectopic sternite. Larvae also exhibited this phenotype and adults arising from those larvae showed the same segmentation defect, indicating that this abnormality is not lethal.

As *dsp1* is maternally and zygotically expressed, we have studied the maternal contribution of DSP1 in the A4 segmentation defects. The F1 female progeny from two crosses: *dsp1*¹/*dsp1*¹ females × *dsp1*⁺/Y males and *dsp1*⁺/*dsp1*⁺ females × *dsp1*¹/Y males, was scored for the A4 abnormality. The two F1 female progenies have the same genotype but differ only by the mother's genotype. The female F1 progeny did not show any A4 defects when the mother has a wildtype genotype (Table 1). On the contrary, about 25% of the F1 progeny exhibited A4 abnormalities when the mother has a *dsp1* mutant genotype (Table 1). We also compared the female progeny resulting from crosses between *dsp1*¹/*dsp1*¹ females with *dsp1*⁺/Y or *dsp1*¹/Y males. The genotype of the F1 female is different, but the genotype of the mothers is the same. Whatever the paternal genotype, the F1 female progeny showed A4 defects with a similar frequency (Table 1). These results clearly show that the A4 segmentation defect results from the lack of maternal DSP1 and cannot be rescued by a paternal wildtype *dsp1* allele. Interestingly, the F1 female progeny from het-

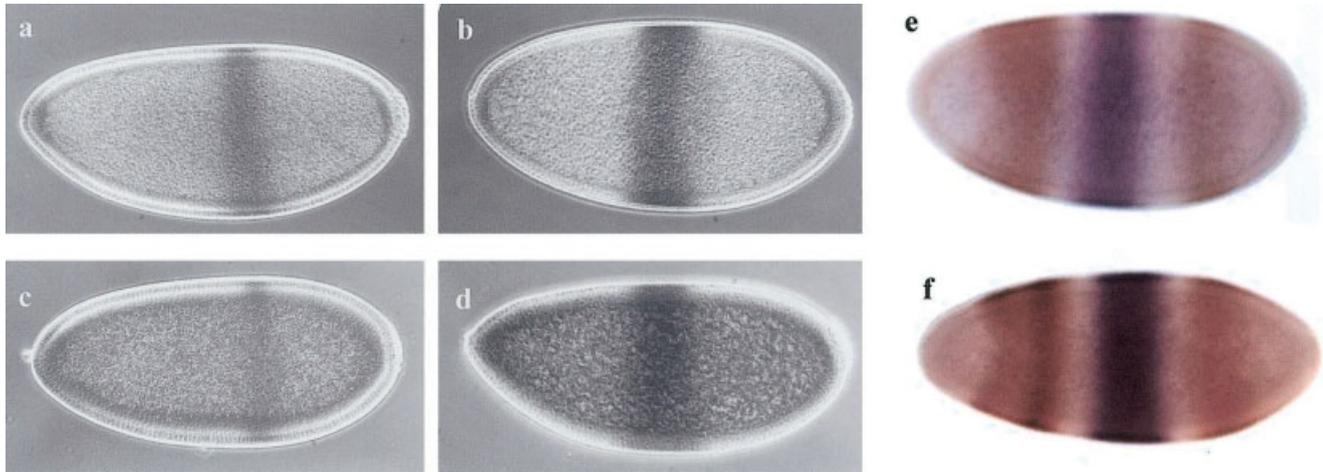


FIG. 2. Lack of DSP1 affects expression of gap genes. Whole-mount antibody staining of wildtype (**a,b,e**) and *dsp1*¹ (**c,d,f**) embryos. Embryos from females of each genotype were collected and stained with either anti-Kni, anti-Kr, or anti-Gt antibodies. In *dsp1*¹ embryos, the domain of *Kr* expression is expanded (cf. **b** versus **d**) and the domain of *kni* expression is reduced (cf. **a,c**). Wildtype and *dsp1*¹ were double-labeled with anti-Gt (brown) and anti-Kr (blue) to visualize the localization of *Kr* domain expression extension. The domain expression of *Kr* is expanded posteriorly (cf. **e,f**). Anterior is to the left.

erozygous *dsp1*¹/*dsp1*⁺ females exhibited A4 segmentation defects but with a much lower frequency (3% versus 25%), indicating that this phenotype is dependent on the *dsp1* dosage.

***knirps* and *Krüppel* Expression Is Modified in *dsp1*¹ Mutant**

The phenotype analysis suggests that *dsp1* could be implicated in the expression of genes involved in the correct determination of the A-P axis and particularly in the expression of gap genes, which are those activated by maternal products. We have focused our attention on the expression of two gap genes: *Krüppel* and *knirps*, which are expressed in a domain encompassing the A4 segment. In addition, the A4 segment is very sensitive to dosage of *knirps* product and the phenotype we observed is very similar to the phenotype heterozygous for a *knirps* mutation.

We compared the expression in situ of these two gap genes in wildtype and *dsp1*¹ embryos. About 25% of the inspected embryos showed an alteration of *Kr* and *kni* expression. The *Kr* expression domain was much larger in *dsp1*¹ embryos as compared to wildtype (Fig. 2b,d). A double-labeling experiment with antibodies directed against *Kr* and *Gt* revealed that the *Kr* expression domain is extended only in the posterior part (Fig. 2e,f). In contrast, the expression of *knirps* was significantly reduced in *dsp1*¹ embryos, as compared with wildtype embryos (Fig. 2a,c). *kni* is first detected after the 11th division in a broad posterior band, soon after *kni* is also observed at the anterior tip (Rothe *et al.*, 1989). The reduction of *kni* expression in *dsp1*¹ embryos affected only the posterior domain. (As a control, we showed that the two main activators of *kni*, *bcd*, and *cad* are correctly expressed in *dsp1*¹ embryos (data not shown).)

***dsp1* and *bcd* Interact Genetically**

Our results show that the absence of maternal DSP1 leads to a decrease in *kni* expression. *kni* is a gap gene which is first activated by two maternal products, Bicoid and Caudal. We raised the question whether DSP1 could be involved in *kni* activation by Bcd or Cad or the two of them. First, we studied the genetic interaction between *dsp1*¹ mutation and *bcd* mutations. Two different *bcd* alleles were used: *bcd*¹², a strong allele with a stop codon at amino acid position 153, and *bcd*¹⁰, a hypomorph allele with a stop codon at amino acid position 259. Females homozygous or heterozygous for *dsp1*¹ and heterozygous for *bcd*¹² or *bcd*¹⁰ were obtained and the embryo or adult progeny were compared for the A4 segmentation defect with the progeny of homozygous or heterozygous females for *dsp1*¹ (Table 1). The same results were obtained for embryos and adults. When mothers are heterozygous for *dsp1*¹ and *bcd*¹², we observed a strong enhancement of the frequency of A4 defects (41% for double heterozygous versus 3% for single *dsp1*¹ heterozygous). We observed a similar effect with the weaker *bcd*¹⁰ allele, but the enhancement is less significant (7% versus 3%). When mothers are homozygous for *dsp1*¹ and heterozygous for *bcd*¹², we observed a dramatic enhancement of the A4 defect: about 80% of embryos or adults are affected and, in addition, the phenotype is more severe, with the A4 segment completely missing. It is worth noting that the enhancement of the A4 phenotype is more significant when mothers are homozygous for *dsp1*¹, confirming that the maternal DSP1 functions in a concentration-dependent manner.

Second, we looked for a genetic interaction between the *dsp1*¹ mutation and *cad* mutation. In this experiment

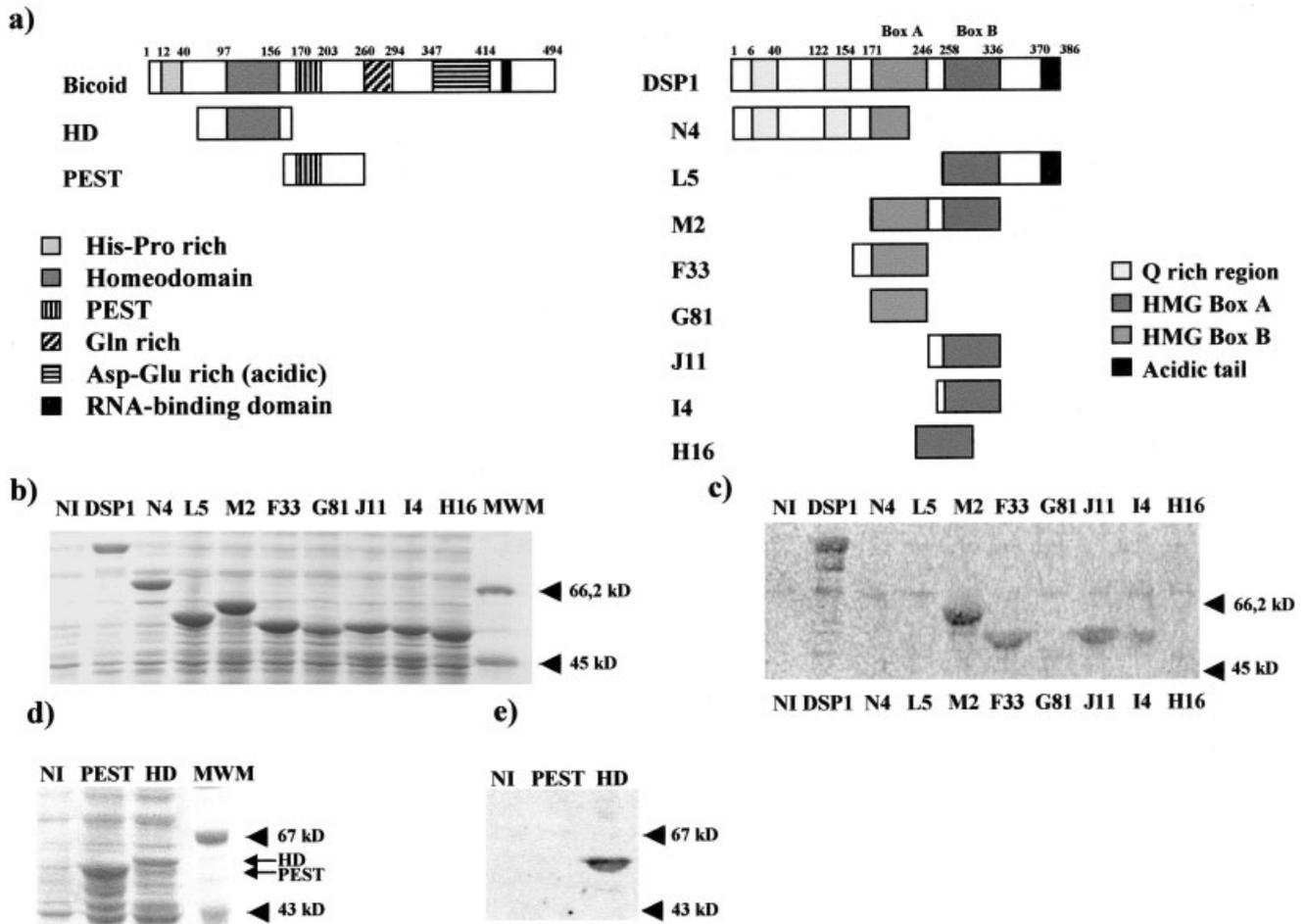


FIG. 3. Interaction between DSP1 and Bicoid proteins monitored by far-Western blotting. **a:** Schematic representation of the full-length or truncated proteins used. **b,d:** Coomassie-stained SDS-PAGE of the lysates obtained from *E. coli* transformed with pMal-c2 vectors containing full-length or truncated DSP1, BCD HD (amino acids 55–170), or BCD PEST (amino acids 155–255) cDNA. **c,e:** Phosphorimager scan of the membrane after the transfer of the proteins and incubation with radiolabeled full-length BCD (**c**), or radiolabeled full-length DSP1 (**e**). The positions of molecular size markers are indicated by arrowheads. NI: lysate of noninduced bacterial cells, MWM: molecular weight marker.

we used only one *cad* allele: *cad*³, which is classified as a null one. We first studied the effect of a diminution of zygotic *cad* product on the A4 phenotype in the progeny of homozygous *dsp1*¹ females. Females *dsp1*¹/*dsp1*¹ were crossed with males *cad*³/*cad*⁺ and the adult progeny scored for the A4 segmentation defect. The results are shown in Table 1. The frequency of the A4 phenotype was not affected when zygotes have only a half dose of *cad*. The same result was observed when the progeny of females heterozygous for *dsp1*¹ and *cad*³ is analyzed (Table 1). These results clearly indicate that there is no genetic interaction between *cad* and *dsp1*.

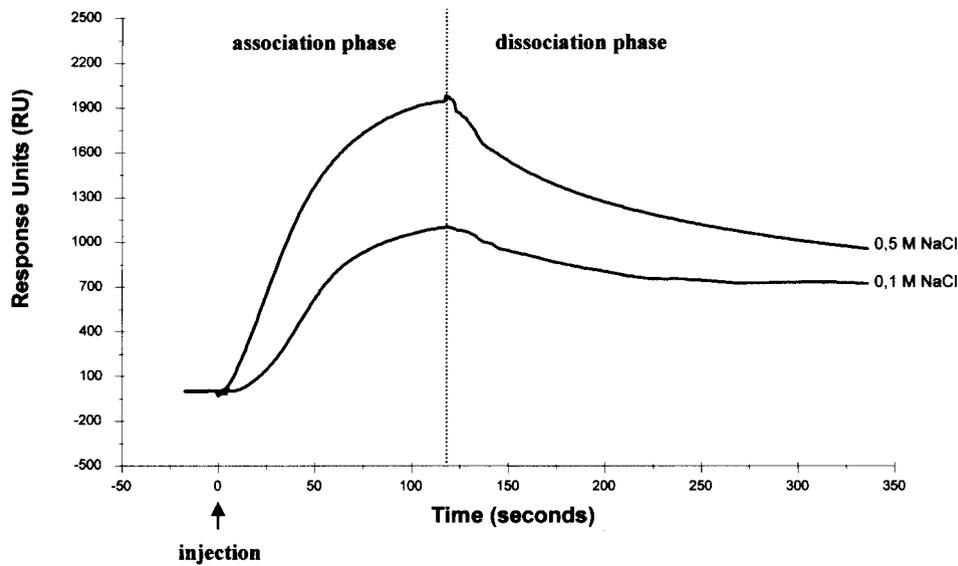
DSP1 and BCD Interact In Vitro

The results of genetic interaction raise the possibility that DSP1 and BCD may interact directly. To visualize such an interaction we used far-Western experiments and surface plasmon resonance (SPR). As illustrated in

Figure 3c, an interaction does take place between radiolabeled full-length BCD and DSP1. It appears that the homeodomain of Bicoid was sufficient to ensure the interaction with DSP1 (Fig. 3d,e). This interaction was further studied by SPR. The SPR measurements were done at two different NaCl concentrations (0.1 M and 0.5 M). The binding curves (sensorgrams) are shown in Figure 4a. The variation of RU observed for the two ionic strengths between the time of injection (0 sec) and the dissociation phase (320 sec) showed that BCD and DSP1 are interacting, confirming the results obtained by far-Western experiments. The higher association peak observed at 0.5 M NaCl results from a 3-fold decrease of the nonspecific binding on Fc2 (Fig. 4b). As expected, the dissociation of the interaction was faster at high ionic strength.

In order to investigate the domain(s) of interaction in DSP1 protein, we used several truncated forms of DSP1

a)



b)

Buffer ionic strength	Time (seconds)	Ligand surface response (RU) Fc1	Control surface response (RU) Fc2	Specific response (RU) Fc1-Fc2
NaCl 0,1M	0 sec (start injection)	0	0	0
	120 sec (end injection)	2087.5	975.2	1112.3
	320 sec	1261.3	516.6	744.7
NaCl 0,5 M	0 sec (start injection)	0	0	0
	120 sec (end injection)	2255.4	283.4	1972
	320 sec	1220.9	243.5	977.4

FIG. 4. Interaction between DSP1 and Bicoid proteins monitored by SPR. **a:** Overlaid sensorgrams of BCD HD flowed over the DSP1 surface at two different ionic strengths. The first part of the sensorgram (from 0–120 s) corresponds to the association phase. After 120 s the BCD flow is stopped and replaced by running buffer flow, leading to the dissociation part of the sensorgram. **b:** Table detailing the signals obtained on the DSP1 surface (Fc1) or the control surface (Fc2) at different times. The difference between Fc1 and Fc2 gives the value of the specific binding.

(Fig. 3a) and analyzed their binding to BCD by far-Western blotting (Fig. 3c). As a control for the amount of protein, a Coomassie-stained SDS-PAGE gel of the lysates is shown in Figure 3b. Deletion of the runs of glutamine did not alter BCD binding (Fig. 3c, proteins M2 and F33),

suggesting that this N-terminal part of DSP1 is dispensable for the interaction. The C-terminal part of DSP1 which contains the acidic tail is not essential for recognition, as no difference was observed between proteins DSP1 and M2. It appears that the HMG box is necessary



FIG. 5. DSP1 and BCD co-immunoprecipitate. Wildtype embryonic extract was incubated in the absence (lanes 2 and 5) or presence (lane 6) of EtdBr with purified polyclonal anti-DSP1 antibodies coupled to sepharose. A control was performed with IgG coupled to sepharose (lanes 3, 7). The presence of DSP1 (a) or BCD (b) was examined by immunoblotting. Lane 1: 30 µg of embryonic extract to show the mobility of DSP1; lane 4: 100 µg of embryonic extract to show the mobility of BCD. Lanes 2, 3, 5, 6, and 7: Material eluted from the beads after immunoprecipitation. The positions of molecular size markers are indicated by arrowheads. BCD appears as several migrating bands corresponding to different levels of phosphorylation (Ronchi *et al.*, 1993; Janody *et al.*, 2000).

but not sufficient for binding to BCD (no interaction with protein N4, which lacks one-third of the HMG box). Flanking sequences at the N-terminus of each box are necessary to ensure the binding to BCD (Fig. 3c, proteins F33 and G81, proteins J11, I4 and H16). The same results were obtained with the radiolabeled BCD HD (data not shown).

DSP1 and BCD Interact Physically In Vivo

In order to ascertain the physical interaction between DSP1 and BCD *in vivo*, we performed a co-immunoprecipitation (co-IP) assay. Extracts from 0–3-h embryos were incubated with sepharose covalently linked to purified antibodies directed against DSP1. Bound proteins were eluted and analyzed by Western blotting. As shown in Figure 5, BCD was present in the eluted fractions when using antibodies directed against DSP1 and not in the control experiment (IgG from preimmune serum). The percentage of co-IP BCD appears to be low; however, this can reflect a poor capacity of anti-DSP1 antibodies to immunoprecipitate the complexes containing DSP1. Indeed, the percentage of DSP1 recovered in eluted fractions after IP is very low as compared with the input. This can be explained if DSP1 is not fully accessible in the complex. In addition, it is quite likely that only a small fraction of BCD is stably associated with DSP1. The same result was obtained when ethidium bromide was added to extracts to alleviate protein–DNA interactions (Lai and Herr, 1992), indicating that the interaction between DSP1 and BCD is not due to indirect interactions via DNA.

DSP1 Interacts With the Regulatory Region of *knirps*

Our results suggest that DSP1 could be involved in the activation of *knirps* in association with BCD. If this is the case, DSP1 has to interact with the regulation region of *knirps*. To investigate this possibility, we immunoprecipitated formaldehyde cross-linked chromatin isolated from 0–3-h embryos with purified antibodies directed against DSP1. Antibody–chromatin complexes were isolated using Protein A-coated beads and the bound chro-

matin was eluted. After removal of proteins, the immunoprecipitated DNA was analyzed by slot blot using a probe encompassing the *kni* upstream sequence (Fig. 6). Pankratz *et al.* (1989) have shown that a 4.4 kb upstream sequence of *kni* directs the expression of a reporter gene in a region corresponding to the endogenous *kni* transcripts. We focused our attention on a region of about 2,600 bp which directs the posterior expression domain of *kni* and which contains the Bicoid and Caudal binding sites (Rivera-Pomar *et al.*, 1995). As shown in Figure 6, the *kni* regulation region was highly enriched in the chromatin sample treated with anti-DSP1, while it was practically absent in the control. As a control, the membrane was stripped and reused in a hybridization experiment with an unrelated probe (without BCD sites). No enriched hybridization signal was observed (Fig. 6), indicating that the signal obtained with the *kni* 2.6 kb was not due to nonspecific background hybridization.

DISCUSSION

Effects of DSP1 on Segmentation Gene Expression

A detailed analysis of the phenotype of a *dsp1* null mutant reveals abnormalities in the cuticular pattern of embryos, especially in the region corresponding to the A4 segment (Mosrin-Huaman *et al.*, 1998). These defects are also observed in adults, which often exhibit deletion of half sternite or tergite. Such a phenotype suggests an alteration of the pattern of development along the A-P axis and is reminiscent of alteration of the expression of segmentation genes. This phenotype is strongly dependent on maternal DSP1, as it cannot be rescued by paternal DSP1 product. These data strongly suggest that DSP1 could be implicated in the regulation of gap genes, which are those activated by maternal products. In particular, the A4 segment is very sensitive to the dosage of *knirps* product, and heterozygous for hypomorph *kni* alleles show the same kind of phenotype (Lehman, 1988). Lack of *caudal* product may also result in absence of the fourth abdominal segment. Using antibodies di-

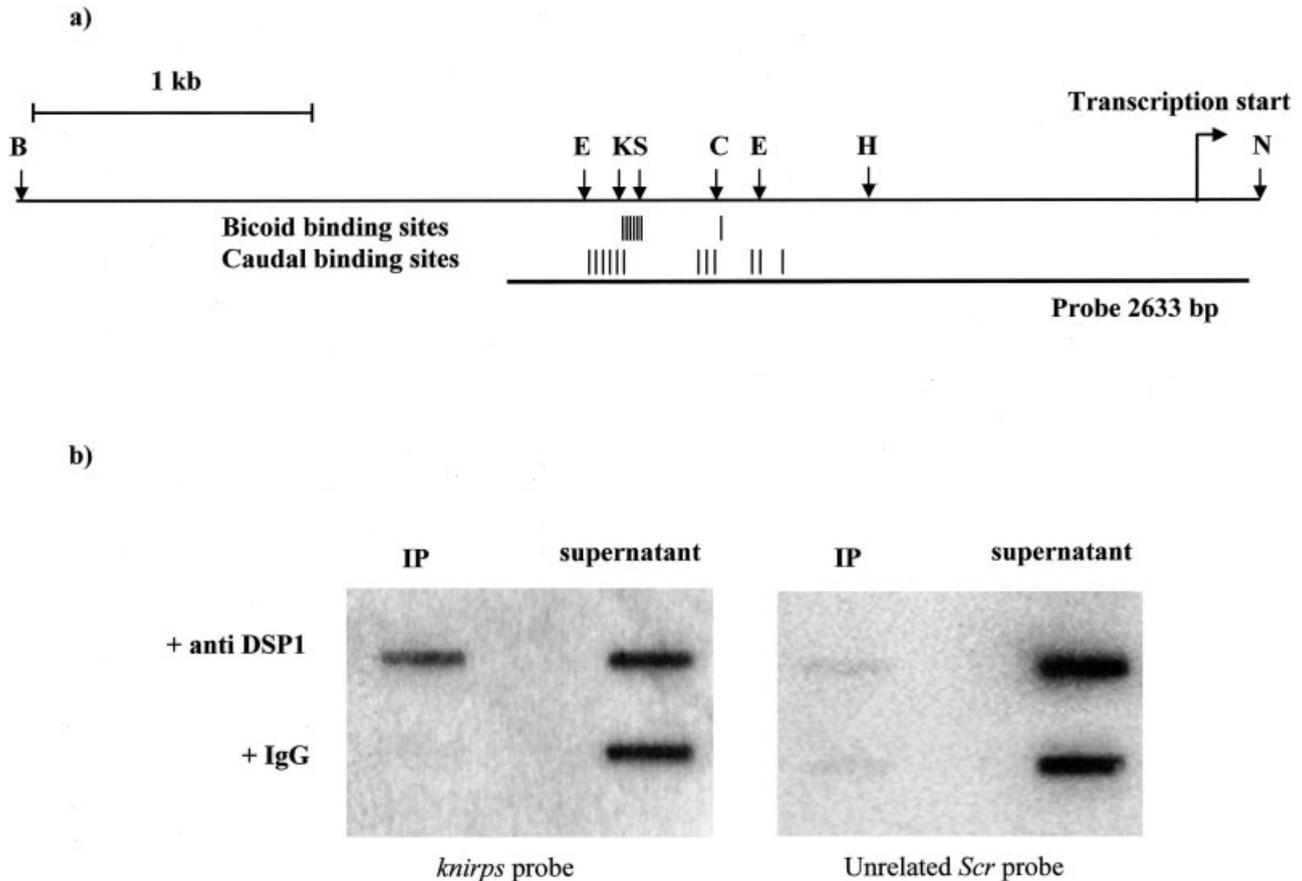


FIG. 6. DSP1 interacts with the *kni*-regulating region. **a:** Schematic representation of the 4.4 kb *kni* control region. The probe used in the experiment is indicated by a dark rectangle below the map and the Bicoid and Caudal binding sites by solid rectangles. B, *Bam*HI; C, *Cl*al; E, *Eco*RI; H, *Hin*clI; K, *Kpn*I; N, *Nru*I; S, *Sty*I. **b:** Slot blot analysis of the DNA obtained from immunoprecipitation of cross-linked chromatin. (IP) DNA from immunoprecipitation with (+ anti DSP1) and without (+ IgG) anti-DSP1 antibodies was hybridized with a *kni* probe. After stripping, the membrane was hybridized with an unrelated probe (*Scr* probe) without BCD binding sites. An aliquot (1/10) of the supernatant (supernatant) from the same immunoprecipitations was loaded as a control.

rected against various maternal or gap gene products, we studied the expression of several genes involved in early embryonic development and show that *kni* expression is strongly reduced in *dsp1*¹ mutant embryos as compared to wildtype embryos. By contrast, the *Kr* expression domain is extended in the posterior part, on the *kni* domain's side. This can be explained by the fact that *Kni* acts as a repressor of *Kr*, and a diminution of *kni* product will result in an extension of the *Kr* domain. A simple explanation for these observations is that DSP1 is only involved in the activation of *kni*. The two maternal genes studied, *bcd* and *cad*, do not show any difference, indicating that the maternal function of DSP1 is not upstream of these genes. Other segmentation genes (*hb*, *gt*) have been studied in *dsp1*¹ embryos and do not show any difference with wildtype embryos (data not shown). Thus, it appears that the maternal function of DSP1 is restricted to one gap gene. DSP1 was previously shown to be a chromatin remodeling factor acting as a Pc-G or trx-G protein, depending of the locus studied (Decoville

et al., 2001). It is a novel example of Pc-G or trx-G protein involved in segmentation gene regulation. These proteins have been first identified as regulators of homeotic genes. Pc-G proteins maintain a repression state of homeotic genes, and trx-G proteins maintain an activated state. These two groups of proteins act by locally modifying the chromatin structure. However, mutations in several Pc-G genes cause maternal-effect or zygotic segmentation defects, suggesting that these genes are also involved in the regulation of the segmentation genes (Adler *et al.*, 1989; Breen and Duncan, 1986; Ingham, 1984; McKeon *et al.*, 1994; Moazed and O'Farrell, 1992; Sinclair *et al.*, 1992). In particular, Pelegri and Lehmann (1994) have shown that *E(z)* is required for maintaining the expression domain of *kni* initiated by Hb gradient. *trx-G* genes are also involved in the maintenance of segmentation gene expression, as demonstrated for *trx* mutations which alter *en* expression (Breen *et al.*, 1995) or *kis* mutations which mimic mutations in pair-rule genes (Daubresse *et al.*, 1999).

DSP1 and BCD Interact Genetically and Physically

We have shown that expression of *kni* is reduced in embryos lacking maternal DSP1. Two main activators of *kni* have been described: Bicoid and caudal, and we have hypothesized that DSP1 could potentiate one or the two activators. First, we have shown that lowering the maternal *bcd* product in *dsp1*¹ heterozygous or homozygous females strongly enhances the A4 phenotype. The enhancement appears to be dependent on *dsp1* dosage, which suggests that DSP1 and BCD could interact physically. On the contrary, no interaction was observed with the *cad* mutation. Diminution of the *cad* product in mothers does not enhance the A4 phenotype nor the diminution of *cad* product in the zygote.

The physical interaction between DSP1 and BCD has been shown in vitro and in vivo. In vitro we have shown by far-Western experiments and by SPR the interaction between the two proteins. The interaction involves the HD domain of BCD and the HMG box of DSP1. This agrees with previous observations on HMG proteins. Zappavigna *et al.* (1996) have shown that in vitro rat HMG1 interacts with HOX proteins and enhances *in vivo* their transcriptional activation. This interaction is also mediated by the HOX homeodomain and the HMG box domain. However, interaction between BCD and DSP1 is the first interaction between a homeodomain protein and an HMG protein observed in vivo. In addition, we have shown by immunoprecipitation of cross-linked chromatin that DSP1 was associated in vivo with the *kni* enhancer.

These results suggest that DSP1 could be involved in association with BCD in initiation or maintenance of *kni* expression. Initiation of *kni* expression is ensured by BCD, which forms an anterior-posterior gradient in the embryo, with a high concentration at the anterior end and a low concentration at the posterior end. It has been proposed that the extent along the A-P axis to which a BCD target gene is expressed will depend on the affinity of BCD for its enhancer (gradient model). Such a model suggests that the *kni* enhancer should have a strong affinity for BCD, as *kni* is expressed posteriorly in the embryo. However, Burz *et al.* (1998) have shown that BCD does not have a higher affinity for *kni* than more anteriorly expressed genes such as *hb*. This suggests that a mechanism other than DNA binding affinity is involved in the expression of some BCD target genes along the A-P axis. Recently, Torigoi *et al.* (2000) have shown, by studying genetic interaction between *Chip* and *bcd* mutations, that these two proteins interact in embryos. In addition they have shown, in yeast, that Chip potentiates the transcriptional activity of Bicoid. They proposed that Chip help binding of BCD to sites between the enhancer and the promoter and in the enhancer, which could bring the enhancer and the promoter closer together.

As Chip, DSP1 could enhance BCD activity when present in low amounts. Such a function has been suggested for DSP1 in the dorsoventral axis of developing embryos (Decoville *et al.*, 2000). It has been shown in

vitro that DSP1 enhances the binding of Dorsal on its sites. In general, HMG proteins have been demonstrated to facilitate the activation of transcription factors in vitro or *ex vivo*. This hypothesis would result in an increasing affinity of Bicoid for its sites. Preliminary results obtained by gel retardation assays do not demonstrate any enhancement of the fixation of BCD on the *kni*⁶⁴ element, which contains the BCD fixation sites. Furthermore, we have determined that the interaction between DSP1 and BCD is ethidium bromide-insensitive in the immunoprecipitation assay, which may reflect a DNA-independent association of the two proteins.

Another hypothesis is that DSP1 is not involved in the fixation of BCD and in the initiation of *kni* expression, but rather is necessary to maintain an activated state of *kni* initiated by BCD. As DSP1 does not show any DNA sequence specificity, BCD might tether DSP1 to the *kni*⁶⁴ element of the *kni* enhancer. DSP1 could be a link between activation of *kni* by BCD and *trx-G* or *Pc-G* proteins. This suggests that BCD is able to interact with multiprotein complexes that remodel the chromatin. Recently, Zhu *et al.* (2001) have shown that BCD interacts with dSAP18, resulting in an inhibition of BCD activity in the most anterior region of embryos. dSAP18 is a member of the Sin3/Rpd3 histone deacetylase complex which exhibited interaction with E(Z) and GAGA factor, two *Pc-G* and *trx-G* proteins (Wang *et al.*, 2002; Espinas *et al.*, 2002).

If *trx-G* and *Pc-G* genes are involved in gap gene regulation, the mechanism involved is not clearly known. The effect of *Pc-G* or *trx-G* mutations on homeotic gene regulation is enhanced when these mutations are transheterozygous, indicating that these products are involved in a common process. However, the absence of enhancement of the maternal effect of *msx* mutations on gap gene regulation by other *Pc-G* mutations has lead Saget *et al.* (1998) to propose that the nature of this regulation differs from that of homeotic genes. It would be interesting in the case of *dsp1* to investigate the effect of a *dsp1* mutation in trans with a *trx-G* or *Pc-G* mutation on *kni* gene regulation and to identify the protein partners of DSP1 involved in this regulation.

MATERIALS AND METHODS

Drosophila Strains and Crosses

Flies were raised on standard medium at 22°C. All mutations and chromosome aberrations are described in Lindsley and Zimm (1992) unless otherwise noted. Isolation of the *dsp1*¹ was described previously (Decoville *et al.*, 2001; Mosrin-Huaman *et al.*, 1998). *bcd*¹²*p*⁰/*TM3* *Sb*¹ was obtained from the Umea *Drosophila* Stock Center. *b*¹*pr*¹*cad*³/*In(2LR)Gla wg*^{gla-1}, *bcd*¹⁰/*TM3* *Sb*¹ were obtained from the Bloomington Fly Stock Center. Oregon-R was used as the wildtype reference strain.

Immunostaining of Embryos

Embryo fixation and staining was performed using standard procedures. Antibodies directed against Bicoid were a generous gift from Dr. G. Struhl; antibodies directed against Hunchback, Krüppel, Knirps, Giant, and Caudal were kindly provided by Dr. D. Kosman.

Plasmid Constructs

RNA was extracted from wildtype ovaries using the SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison WI) and *bicoid* cDNAs were produced by RT-PCR using the Access RT-PCR System (Promega). The RT-PCR products were cloned into pGEM3Zf(+) (Promega), pMAL-c2 (New England Biolabs, Beverly, MA), or pET-14b (Novagen, Madison, WI) vector. The construction of the vectors expressing full-length and truncated DSP1 proteins has been previously described (Decoville *et al.*, 2000).

Far-Western

The far-Western experiments were performed as described in Decoville *et al.* (2000). Synthesis of radiolabeled Bicoid and DSP1 proteins was performed using pGEM3Zf(+) clones as templates and the TNT coupled reticulocyte lysate system (Promega) in the presence of [³⁵S]methionine.

Surface Plasmon Resonance (SPR)

A 6xHis-tagged BCD (HD) protein was purified under denaturing conditions (8 M urea) using Ni²⁺ affinity chromatography (Qiagen, Chatsworth, CA), according to the manufacturer's guidelines. The protein was dialyzed to remove urea in the presence of 0.2 M L-arginine to prevent the aggregation of the protein and was finally purified on a UNO Q-1 column (Bio-Rad, Hercules, CA). The SPR measurements were performed at 25°C with a BIACORE J (BIACORE AB, Uppsala, Sweden) in the SPR running buffer (Hepes 20 mM pH 8, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, PMSF 0,2 mM, Arg 0,2 M) containing 0.1 M or 0.5 M NaCl. DSP1 (100 µg/ml) was covalently immobilized on a CM5 sensor chip as described by the manufacturer. Then the CM5 sensor chip was stabilized with 1 M ethanolamine, resulting in a mean signal of 4,898 resonance units (RU) on flow cell 1 (Fc1). The second flow cell (Fc2), used as a control for nonspecific binding and bulk effects, received the same treatment except that DSP1 was omitted. The recombinant BCD HD sample (1.66 µM) was diluted in the SPR running buffer containing either 0,1 M or 0,5 M NaCl, injected at a flow rate of 45 µl/min for 2 min. The background (Fc2) was subtracted prior to analysis, using Biaviewer software.

Coimmunoprecipitation Assays

Drosophila embryonic extracts were prepared as described in Bernstein *et al.* (2001), except that the IP buffer was 10 mM Hepes pH 8, 100 mM NaCl, 10% glycerol, 0,05% Tween 20, 100 µg/ml PMSF, protease inhibitors cocktail from Sigma (St. Louis, MO). About 7 mg of embryonic extracts were incubated with 400 µg

of anti-DSP1 affinity purified antibodies (Agro-bio) coupled to sepharose beads overnight at 4°C, either in the absence or presence of EtdBr at 50 µg/ml. Following washing with IP buffer containing 200 mM NaCl, bound materials were eluted with glycine 50 mM pH 2 and neutralized with 1/30 volume of NaP buffer 1 M, pH 8. DSP1 and Bicoid proteins were analyzed by Western blotting. The control experiment was performed using IgG from preimmune serum from the same animal.

Cross-Linked Immunoprecipitation Assays

Cross-linked chromatin was prepared using formaldehyde from staged embryos (0–3 h). One gram of embryos was dechorionated and then treated with 1.8% formaldehyde in the presence of n-heptane for 15 min with vigorous shaking. The chromatin was then extracted and purified following a standard procedure described in Strutt and Paro (2000). Immunoprecipitation was performed using about 50 µg of chromatin and 1.5 µg of purified anti-DSP1 antibodies. Immunoprecipitated DNA was purified by treatment with proteinase K, denatured by boiling, then loaded in the slots of a minifold apparatus containing a hybridization membrane (Hybond-XL membrane, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). The membrane was hybridized by standard procedures with a *knirps* probe overnight, washed, and exposed to a Phosphorimager screen. The membrane was stripped as described by the manufacturer and the removal of the probe was checked using Phosphorimager apparatus. Then the membrane was rehybridized with a second unrelated probe which does not contain BCD binding sites, corresponding to a 1 kb region of *Scr*.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank A. Soulas and M. Martineau for excellent technical assistance. We thank the Bloomington Stock Center and Umea Stock Center for supplying mutant strains used in this analysis. We thank J. Hautin for help in *Drosophila* medium preparation.

LITERATURE CITED

- Adler PN, Charlton J, Brunk B. 1989. Genetic interactions of the suppressor 2 of zeste region genes. *Dev Genet* 10:249–260.
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409:363–366.
- Breen TR, Duncan IM. 1986. Maternal expression of genes that regulate the bithorax complex of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 118: 442–456.
- Breen TR, Chinwalla V, Harte PJ. 1995. Trithorax is required to maintain engrailed expression in a subset of engrailed-expressing cells. *Mech Dev* 52:89–98.
- Burz DS, Rivera-Pomar R, Jackle H, Hanes SD. 1998. Cooperative DNA-binding by Bicoid provides a mechanism for threshold-dependent gene activation in the *Drosophila* embryo. *EMBO J* 17: 5998–6009.
- Daubresse G, Deuring R, Moore L, Papoulas O, Zakrajsek I, Waldrip WR, Scott MP, Kennison JA, Tamkun JW. 1999. The *Drosophila* *kismet* gene is related to chromatin-remodeling factors and is

- required for both segmentation and segment identity. *Development* 126:1175-1187.
- Decoville M., Giraud-Panis MJ, Mosrin-Huaman C, Leng M, Locker D. 2000. HMG boxes of DSP1 protein interact with the rel homology domain of transcription factors. *Nucleic Acids Res* 28:454-462.
- Decoville M, Giacomello E, Leng M, Locker D. 2001. DSP1, an HMG-like protein, is involved in the regulation of homeotic genes. *Genetics* 157:237-244.
- Driever W, Nusslein-Volhard C. 1988a. The bicoid protein determines position in the *Drosophila* embryo in a concentration-dependent manner. *Cell* 54:95-104.
- Driever W, Nusslein-Volhard C. 1988b. A gradient of bicoid protein in *Drosophila* embryos. *Cell* 54:83-93.
- Espinas ML, Canudas S, Fanti L, Pimpinelli S, Casanova J, Azorin F. 2002. The GAGA factor of *Drosophila* interacts with SAP18, a Sin3-associated polypeptide. *EMBO Rep* 1:253-259.
- Hulskamp M, Tautz D. 1991. Gap genes and gradients—the logic behind the gaps. *Bioessays* 13:261-268.
- Ingham PW. 1984. A gene that regulates the bithorax complex differentially in larval and adult cells of *Drosophila*. *Cell* 37:815-823.
- Janody F, Sturny R, Catala F, Desplan C, Dostatni N. 2000. Phosphorylation of bicoid on MAP-kinase sites: contribution to its interaction with the torso pathway. *Development* 127:279-289.
- Kennison JA. 1995. The Polycomb and trithorax group proteins of *Drosophila*: trans-regulators of homeotic gene function. *Annu Rev Genet* 29:289-303.
- Lai JS, Herr W. 1992. Ethidium bromide provides a simple tool for identifying genuine DNA-independent protein associations. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:958-962.
- Lehman R. 1988. Phenotypic comparison between maternal and zygotic genes controlling the segmental pattern of the *Drosophila* embryo. *Development* 104(Suppl):7-27.
- Lehming N, Thanos D, Brickman JM, Ma J, Maniatis T. 1994. An HMG-like protein that can switch a transcriptional activator to a repressor. *Nature* 371:175-179.
- Lindsley DL, Zimm GG. 1992. The genome of *Drosophila melanogaster*. San Diego: Academic Press.
- McKeon J, Slade E, Sinclair DA, Cheng N, Couling M. 1994. Mutations in some Polycomb group genes of *Drosophila* interfere with regulation of segmentation genes. *Mol Gen Genet* 244:474-483.
- Moazed D, O'Farrell PH. 1992. Maintenance of the engrailed expression pattern by Polycomb group genes in *Drosophila*. *Development* 116:805-810.
- Mosrin-Huaman C, Canaple L, Locker D, Decoville M. 1998. DSP1 gene of *Drosophila melanogaster* encodes an HMG-domain protein that plays multiple roles in development. *Dev Genet* 23:324-334.
- Nusslein-Volhard C, Frohnhof HG, Lehmann R. 1987. Determination of anteroposterior polarity in *Drosophila*. *Science* 238:1675-1681.
- Pankratz J, Hoch M, Seifert E, Jäckle H. 1989. *Krüppel* requirement for *knirps* enhancement reflects overlapping gap gene activities in the *Drosophila* embryo. *Nature* 341:337-340.
- Pelegri F, Lehmann R. 1994. A role of polycomb group genes in the regulation of gap gene expression in *Drosophila*. *Genetics* 136:1341-1353.
- Rivera-Pomar R, Lu X, Perrimon N, Taubert H, Jackle H. 1995. Activation of posterior gap gene expression in the *Drosophila* blastoderm. *Nature* 376:253-256.
- Ronchi E, Treisman J, Dostatni N, Struhl G, Desplan C. 1993. Down regulation of the *Drosophila* morphogen bicoid by the torso receptor-mediated signal transduction cascade. *Cell* 74:347-355.
- Rothe M, Nauber U, Jackle H. 1989. Three hormone receptor-like *Drosophila* genes encode an identical DNA-binding finger. *EMBO J* 8:3087-3094.
- Saget O, Forquignon F, Santamaria P, Randsholt NB. 1998. Needs and targets for the multi sex combs gene product in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 149:1823-1838.
- Simon J. 1995. Locking in stable states of gene expression: transcriptional control during *Drosophila* development. *Curr Opin Cell Biol* 7:376-385.
- Sinclair DA, Campbell RB, Nicholls F, Slade E, Brock HW. 1992. Genetic analysis of the additional sex combs locus of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 130:817-825.
- Strutt H, Paro R. 2000. Mapping DNA target sites of chromatin proteins in vivo by formaldehyde crosslinking. *Methods Mol Biol* 119:455-467.
- Thomas JO. 2001. HMG1 and 2: architectural DNA-binding proteins. *Biochem Soc Trans* 29:395-401.
- Thomas JO, Travers AA. 2001. HMG1 and 2, and related 'architectural' DNA-binding proteins. *Trends Biochem Sci* 26:167-174.
- Torigoi E, Bennani-Baiti IM, Rosen C, Gonzalez K, Morcillo P, Ptashne M, Dorsett D. 2000. Chip interacts with diverse homeodomain proteins and potentiates bicoid activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:2686-2691.
- Wang L, Ding L, Jones CA, Jones RS. 2002. *Drosophila* enhancer of zest protein interacts with dSAP18. *Gene* 285:119-125.
- Zappavigna V, Falciola L, Helmer-Citterich M, Mavilio F, Bianchi ME. 1996. HMG1 interacts with HOX proteins and enhances their DNA binding and transcriptional activation. *EMBO J* 15:4981-4991.
- Zhu W, Foehr M, Jaynes JB, Hanes SD. 2001. *Drosophila* SAP18, a member of the Sin3/Rpd3 histone deacetylase complex, interacts with Bicoid and inhibits its activity. *Dev Genes Evol* 211:109-117.

III.1.2 Conclusion

Les résultats présentés dans l'article 3 montrent que la protéine DSP1 n'est pas uniquement impliquée dans la régulation des gènes homéotiques. En effet, elle participe à la régulation d'un gène lacunaire impliqué dans le développement antéro-postérieur de la drosophile : le gène *kni*. Nos résultats démontrent que DSP1 interagit avec BCD afin d'initier ou maintenir l'expression de ce gène. DSP1 est donc un nouvel exemple de protéine PcG/TrxG nécessaire à la régulation d'un gène de segmentation. Aujourd'hui, le mode d'action des PcG et TrxG dans la régulation de l'expression des gènes de segmentation reste mal connu. Saget et ses collaborateurs (Saget et al., 1998) proposent que la nature de ces régulations est différente de celle des gènes homéotiques. Il serait donc intéressant de déterminer au sein des PcG et TrxG, d'éventuels partenaires protéiques de DSP1 nécessaires à la régulation du gène *kni*.

III.2 Nouvelles cibles de DSP1

III.2.1 Introduction

Les cibles que nous avons caractérisées jusqu'à présent ont été suggérées par des analyses phénotypiques du mutant *dsp1¹*. Malheureusement, ces analyses n'évoquent à l'heure actuelle que quelques cibles potentielles de la protéine. Au contraire, les expériences à faible résolution d'immunolocalisation sur les chromosomes polyténiques montrent que DSP1 se fixe au moins sur cent cinquante loci (Igor Zhimulev, communication personnelle) (tableau 6). Ce type d'approche suggère un nombre de gènes cibles potentiels de DSP1 important.

Dans le cadre d'une étude systématique, nous avons utilisé la technique ChIP pour préciser les cibles préférentielles de DSP1 le long de ces grandes régions d'ADN. Les expériences de ChIP ont été couplées à des analyses par southern blot et pour la première fois à notre connaissance, des Chromosomes Artificiels de Bactéries (BAC) ont été utilisés dans ce type d'approche. Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à 3 régions : 2C/D, 50E/51A et 69C/D. Ces régions ont été sélectionnées parce qu'elles présentent de forts signaux de fixation de la protéine DSP1 sur les

chromosomes polyténiques et parce qu'elles sont recouvertes par plusieurs contigs inclus dans des BAC. Ce travail nous a permis d'isoler plusieurs cibles préférentielles de DSP1 et de proposer différents gènes dont l'expression pourrait être régulée par cette protéine. L'un des gènes proposés est *ph-d*. Une étude plus résolutive de ce locus nous a permis de montrer que DSP1 interagit physiquement avec deux régions d'environ 1,5 kb dont l'une est localisée à proximité des séquences promotrices de *ph-d*.

III.2.2 Matériel et méthode

Immunoprécipitation de la chromatine pontée (ChIP)

La préparation de la chromatine pontée à partir d'embryons de drosophiles (0-14 h) a été réalisée selon le protocole décrit par [Orlando et ses collaborateurs \(1998\)](#) et l'immunoprécipitation selon le protocole décrit par [Orlando et ses collaborateurs \(1997\)](#). Brièvement, 50 µg de chromatine pontée ont été immunoprécipités en présence de 1,5 µg d'anticorps anti-DSP1 purifiés ou bien en présence de sérum pré-immun contenant une quantité équivalente en immunoglobulines. L'ADN immunoprécipité a ensuite été amplifié par PCR ([Orlando et al., 1997](#)) et utilisé comme sonde radiomarquée au cours des analyses par southern blot.

Préparation des Chromosomes Artificiels de Bactéries (BAC)

L'ensemble des BAC utilisés sont distribués par le centre de ressources BACPAC (Children's Hospital Oakland Research Institute, Oakland, Californie, USA). La nomenclature utilisée correspond à celle décrite par NCBI. Les séquences génomiques insérées dans ces BAC et leur localisation sont disponibles à partir du site Internet NCBI. L'extraction des BAC a été réalisée à l'aide du kit NucleoBomb BAC Maxi Kit (Machery-Nagel). Chaque BAC a été digéré pendant 24 heures. Les produits de digestion de grandes tailles (30 à 3,5 kb) ont été séparés sur gel d'agarose 0,7%. Les produits de digestion de petites tailles (3,5 à 0,5 kb) ont été séparés sur gel d'agarose 1,5%. L'ADN a ensuite été transféré sur membranes de nitrocellulose (Hybond XL membrane, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Les membranes ont été hybridées 10 heures à 65°C avec l'ADN radiomarké issu du ChIP et

lavées selon le protocole décrit par [Orlando et ses collaborateurs \(1997\)](#). Elles ont ensuite été exposées au PhosphorImager (Molecular dynamics STORM 860).

III.2.3 Résultats

Profil de fixation de DSP1 le long des régions 2C/D, 50E/51A et 69C/D

Afin de déterminer le profil de fixation de DSP1 le long des régions 2C/D, 50E/51A et 69C/D, nous avons utilisé la technique ChIP couplée à des analyses par southern blot. Pour ce faire, nous avons utilisé des Chromosomes Artificiels de Bactéries (BAC) recouvrant les différentes régions chromosomiques. Chaque région est recouverte par 3 BAC (figure 21).

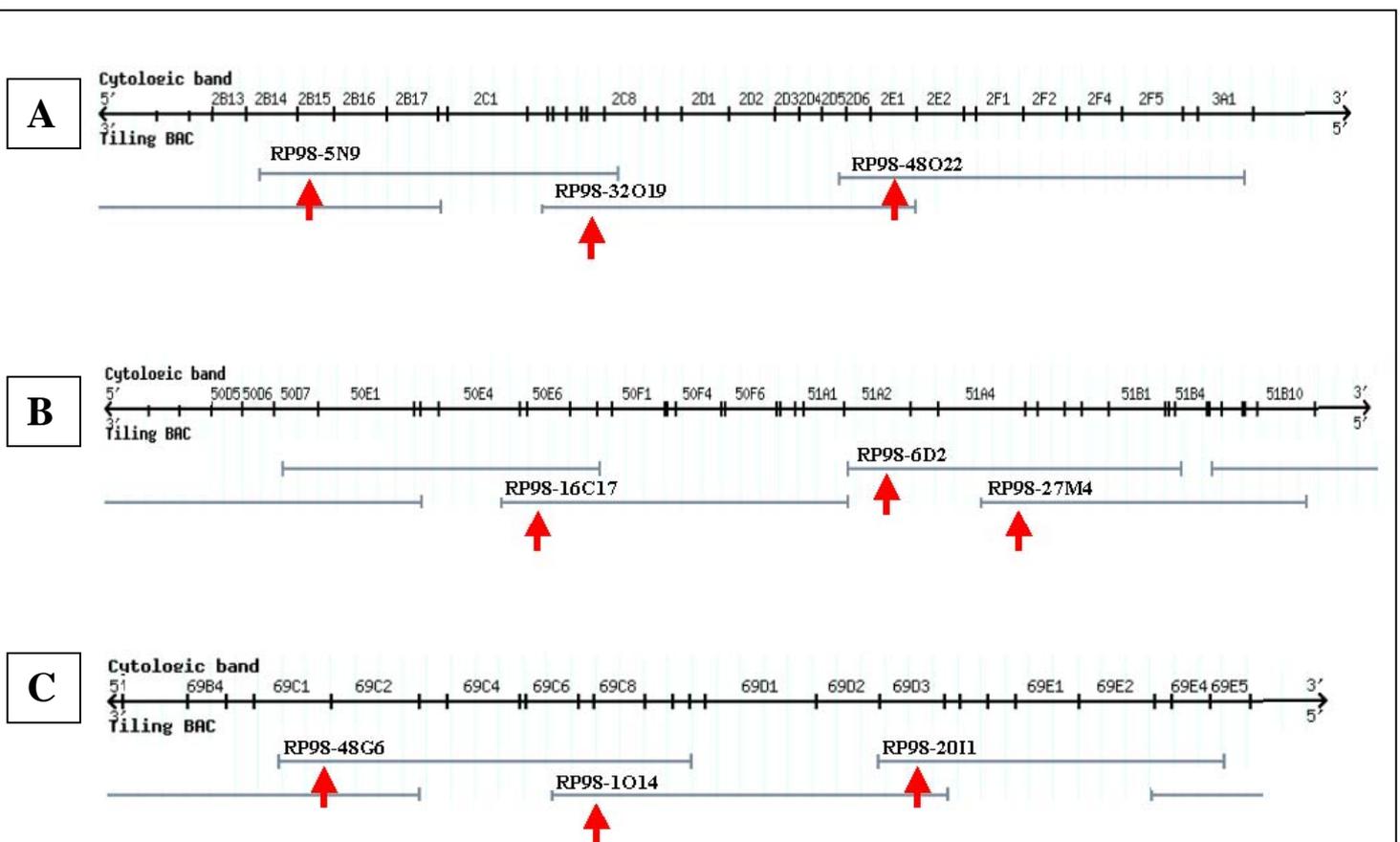


Figure 21. Présentation des Chromosomes Artificiels de Bactéries. Organisation des régions 2C/D (A), 51A (B) et 69C/D (C). Les BAC utilisés sont indiqués par des flèches rouges. (D'après FlyBase <http://flybase.bio.indiana.edu>).

Dans le but de préciser rapidement le profil de fixation de DSP1, nous avons réalisé 2 digestions de ces grands fragments d'ADN par 2 enzymes différentes. Les produits de digestion ont été séparés sur gel d'agarose puis transférés sur membranes de nitrocellulose. L'ADN issu des expériences de CHIP a ensuite été analysé en servant de sonde radiomarquée lors des expériences d'hybridation. Les résultats sont présentés dans la figure 22.

- 1 : RP98-5N9
- 2 : RP98-32O19
- 3 : RP98-48O22
- 4 : RP98-16C17
- 5 : RP98-6D2
- 6 : RP98-27M04
- 7 : RP98-48G6
- 8 : RP98-01O14
- 9 : RP98-20I1
- 10 : Témoin négatif *Scr 4*
- 11 : Témoin positif *Ab-Fab*

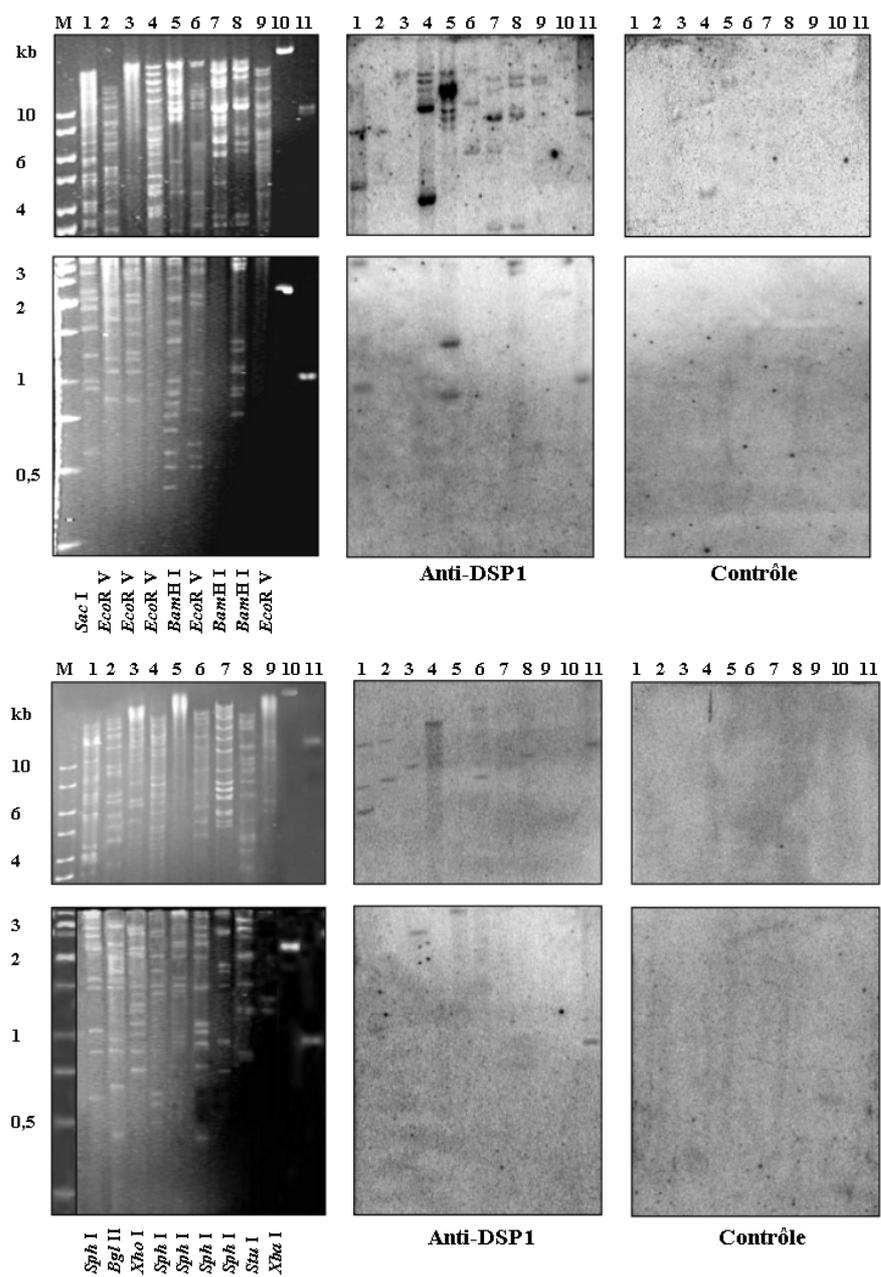


Figure 22. Hybridation de l'ADN issu des expériences de CHIP sur les régions chromosomiques 2C/D, 50E/51A et 69C/D. Des quantités équivalentes de BAC recouvrant les régions d'intérêt ont été analysées. Après digestion par des enzymes de restriction, les produits de digestion de grandes tailles (30 à 3,5 kb) ont été séparés sur un gel d'agarose 0,7%. Les produits de digestion de petites tailles (3,5 à 0,5 kb) ont été séparés sur un gel d'agarose 1,5%. L'ordre de chargement des BAC est indiqué dans le cadre à gauche. L'ADN a été transféré sur membranes de nitrocellulose puis hybridé avec l'ADN immunoprécipité en présence de l'anticorps anti-DSP1 (Anti-DSP1) ou avec l'ADN immunoprécipité en présence de sérum pré-immun (Contrôle).

tel-00011521, version 1 - 1 Feb 2006

Quelques forts signaux d'enrichissement ont été observés au sein de l'ADN immunoprécipité par les anticorps anti-DSP1. Au contraire, de très faibles signaux apparaissent au cours des expériences de contrôle. Chaque signal d'enrichissement a pu être associé à un produit de digestion. Le recouplement de l'ensemble des données obtenues nous a permis d'isoler 8 domaines (3 à 10 kb) enrichis suite à l'immunoprécipitation de la chromatine pontée par les anticorps dirigés contre DSP1. Une étude bioinformatique a révélé que 3 de ces domaines recouvrent les éléments transposables « opus 21 », « Doc 827 » et « roo828 ». Quatre des autres régions isolées recouvrent ou sont localisées à proximité des régions promotrices de séquences codantes. La dernière séquence recouvre quant à elle une série de promoteurs putatifs. Ces informations sont résumées dans le tableau suivant :

Localisation cytologique	BAC	Taille du fragment (pb)	Gène cible potentiel
2C	RP98-5N9	6392	<i>east</i>
2C	RP98-5N09 – RP98-32O19	4710	<i>CG4322, Actn</i>
2D	RP98-48O22	6972	<i>ph-d</i>
51A	RP98-6D2 – RP98-27M04	9923	<i>cpsf, Asx</i>
69C	RP98-48G06 – RP98-1O14	3341	?

Profil de fixation de DSP1 le long du locus *ph-d*

Les expériences réalisées précédemment montrent que DSP1 est associée à des régions de 3 à 10 kb localisées sur ou à proximité de séquences promotrices. Ces résultats nous ont permis de proposer plusieurs gènes cibles dont l'expression pourrait être régulée par DSP1. Au cours de cette dernière étude, nous nous sommes intéressés à préciser la fixation de DSP1 sur l'une de ces cibles potentielles montrant un signal d'enrichissement fort : le locus *ph-d*. Trois fragments de 2,2 à 2,7 kb et recouvrant la région de 6972 pb ont été produits par PCR (figure 23A), puis hybridés en présence d'ADN immunoprécipité en présence d'anticorps anti-DSP1 ou bien en présence de sérum pré-immun (figure 23B). Un faible signal d'hybridation est observé au cours des expériences de contrôle. Au contraire, les fragments 2 et 3 présentent de nets signaux d'enrichissement. Nous avons voulu préciser la fixation de

DSP1 sur ces deux fragments. Pour cela nous les avons découpés par digestion enzymatique afin d'obtenir des produits de 600 à 1500 pb (figure 23C). Après hybridation, deux régions de 1,2 et 1,5 kb montrent un enrichissement au sein de l'ADN immunoprécipité en présence de l'anticorps anti-DSP1. Nous montrons la présence de DSP1 à proximité de la région promotrice du gène *ph-d* (fragment 1,5 kb) et au niveau de la séquence codante de ce gène.

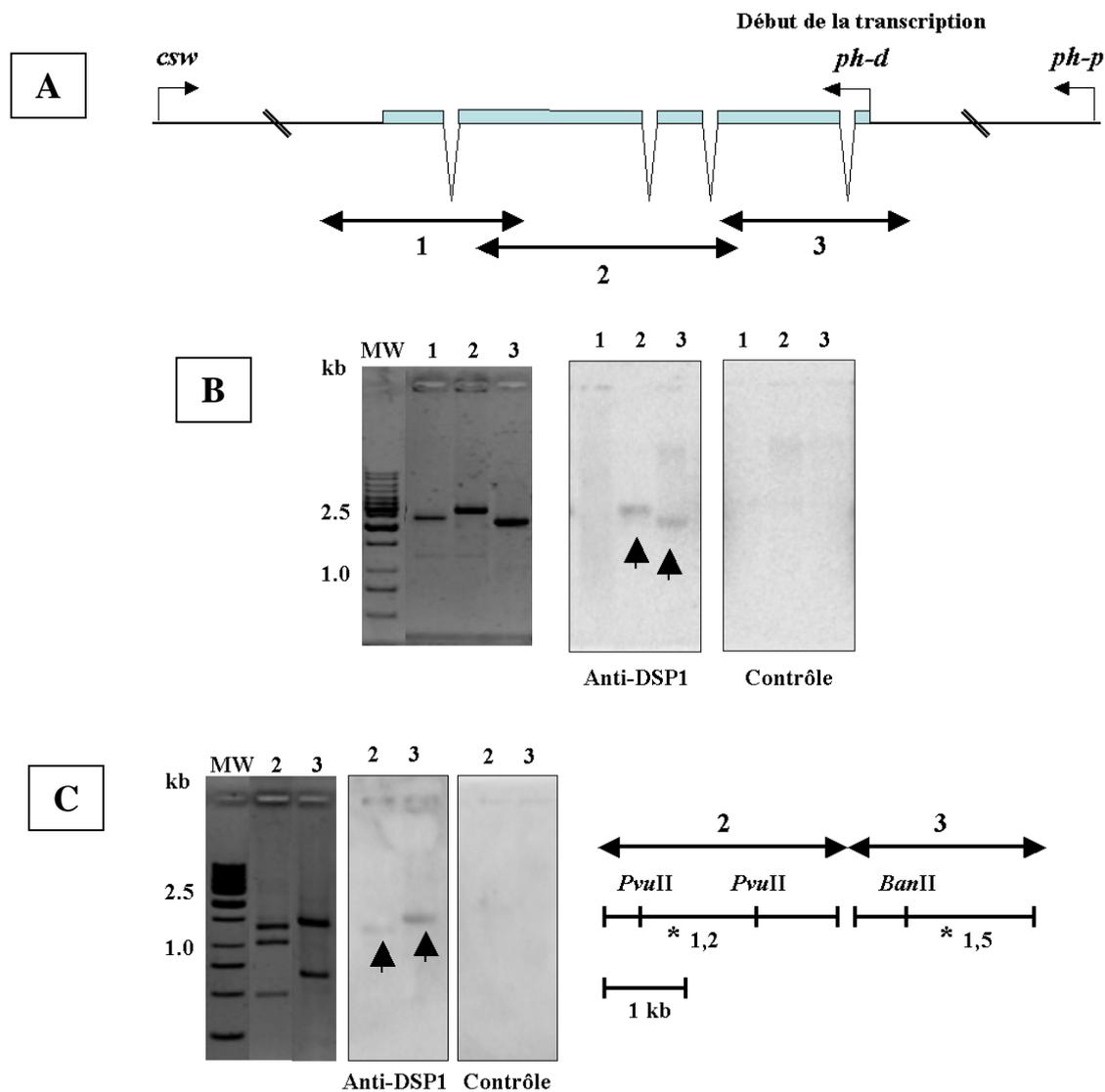


Figure 23. Fixation de DSP1 sur le locus *ph-d*. (A) Carte moléculaire du locus *ph-d*. 3 fragments de PCR d'environ 2,5 kb (1, 2, 3) couvrent le locus *ph-d*. (B) Résultats des expériences de ChIP réalisées à partir d'embryons de drosophile âgés de 0 à 14 heures. L'ADN immunoprécipité en présence d'anticorps dirigés contre DSP1 a été hybridé avec les 3 produits de PCR (Anti-DSP1). Le contrôle correspond à l'hybridation avec l'ADN immunoprécipité en présence de sérum pré-immun. Les flèches indiquent les signaux correspondant aux fragments enrichis au sein de l'ADN immunoprécipité en présence d'anticorps dirigés contre DSP1. (C) Fixation de DSP1 sur les produits de digestion des fragments 2 et 3. La carte de restriction est représentée à droite. Les fragments enrichis au sein de l'ADN immunoprécipité en présence d'anticorps dirigés contre DSP1 sont indiqués par des flèches et des astérisques

III.2.4 Discussion

Au cours d'une étude précédente, nous avons mis au point et validé la recherche des cibles de DSP1 sur le complexe *BxC* par la technique CHIP couplée à des analyses sur puces à ADN. Au cours de ce dernier travail, nous avons débuté une étude systématique visant à identifier les cibles de DSP1 sur l'ensemble du génome. Nous avons utilisé la technique CHIP couplée à des analyses sur des Chromosomes Artificiels de Bactéries. Ces BAC nous ont permis de travailler rapidement sur des régions d'environ 300 kb. Ce travail révèle 8 nouvelles cibles de DSP1 sur les régions 2C/D, 51A et 69C. DSP1 est associée à des éléments transposables et à des régions de 3 à 10 kb localisées sur ou proche de séquences promotrices. Les gènes correspondant *east*, *CG4322*, *Actn*, *ph-d*, *cpsf* et *Asx* apparaissent donc comme des cibles potentielles de DSP1. Dans le cas de *ph-d*, nous avons obtenu des signaux d'enrichissements forts. Nous avons donc réalisé une étude plus précise de la fixation de DSP1 sur ce locus. Nos résultats montrent que DSP1 se fixe préférentiellement sur une région de 1,5 kb localisée à proximité des séquences promotrices ainsi que sur une région de 1,2 kb située sur la séquence codante. Afin de valider *in vivo* la réalité biologique des cibles potentielles de DSP1 que nous proposons, plusieurs approches sont possibles. Nous envisageons tout d'abord d'utiliser des lignées transgéniques dans lesquelles les séquences régulatrices des gènes cibles seront insérées en amont d'un gène rapporteur. Dans ce cas, un changement d'activité du gène rapporteur en contexte mutant *dsp1¹* sera la preuve *in vivo* du rôle de DSP1 dans la régulation du gène considéré. Nous envisageons également d'étudier le niveau de transcription des gènes cibles en contexte sauvage et mutant *dsp1¹*. Ce type d'approche a déjà été utilisée par Ali et Bender (Ali and Bender, 2004) et a permis d'étudier les mécanismes de régulation croisée au sein des protéines PcG. Enfin, nous envisageons de rechercher les cibles de DSP1 à plus grande échelle. Pour cela, nous utiliserons une approche de « CHIP on chip » où la technique CHIP sera couplée à une analyse sur des micropuces qui recouvriront l'ensemble du génome de la drosophile.

Discussion

Depuis la caractérisation de la protéine DSP1 chez *Drosophila melanogaster*, notre équipe s'attache à mettre en évidence l'étendue de ses rôles biologiques. L'étude du phénotype du mutant *dsp1¹* a révélé l'implication de la protéine dans la régulation des gènes du développement. Un travail important réalisé au laboratoire a montré que DSP1 se comporte selon le gène cible comme une protéine TrxG ou PcG. DSP1 appartient donc à la classe des protéines ETP. Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à déterminer les gènes dont l'expression est contrôlée par DSP1. Grâce à la technique CHIP et différents types d'analyses, nous avons pu identifier et caractériser certaines de ces cibles. Nous avons également déterminé le rôle de DSP1 sur certaines d'entre elles.

I DSP1 participe directement à la régulation de nombreux gènes

Les gènes homéotiques. Au cours des études précédentes, il a été montré au laboratoire que des cibles évidentes de la protéine DSP1 sont les gènes homéotiques. Par exemple, on observe une perte d'expression du gène *Scr* dans les disques imaginaux du premier segment thoracique en contexte mutant *dsp1¹* (Decoville et al., 2001). Cependant, l'implication directe de DSP1 dans la régulation transcriptionnelle de ces gènes n'a jamais été démontrée. Au cours de l'article 1, nous avons pu vérifier le rôle direct de DSP1 sur l'activité régulatrice de l'élément *Scr10.OXbaI* impliqué dans la régulation de *Scr*. Nous avons pu identifier deux régions d'environ 1 kb capables d'interagir avec DSP1. Une plus large étude menée sur des domaines de régulation du complexe *Bithorax* nous a permis d'identifier 8 régions de 1 kb interagissant avec DSP1. Certaines d'entre elles étaient suggérées par le phénotype du mutant *dsp1¹* : ce sont les domaines régulateurs *bx*, *MCP* et *iab-6* (Decoville et al., 2001). Grâce à cette étude, nous avons pu proposer de nouvelles cibles de DSP1. Ce sont les domaines de régulation *iab-2* et *Fab-7*. Dans ces cas précis, des retours *in vivo* chez l'animal nous ont permis de vérifier la réalité biologique de ces cibles (article 2 + résultats complémentaires). L'ensemble des résultats obtenus indique que DSP1 participe directement à la régulation des gènes homéotiques en tant que protéine du groupe PcG ou TrxG suivant le locus considéré.

Les autres gènes. La protéine DSP1 se fixe sur plus d'une centaine de bandes discrètes lors des expériences d'immunolocalisation sur les chromosomes géants des glandes salivaires et le mutant *dsp1¹* présente un phénotype très pléiotrope. L'ensemble de ces données montre que DSP1 comme d'autres protéines PcG ou TrxG, régule l'expression de nombreux gènes en dehors des gènes homéotiques. Ici, nous avons pu mettre en évidence l'implication de DSP1 à un stade plus précoce du développement : la segmentation embryonnaire. En effet, cette protéine interagit avec BCD pour activer l'expression du gène lacunaire *kni* (article 3). Un travail plus systématique nous a permis de proposer de nouvelles cibles potentielles de DSP1. La réalité biologique de celles-ci reste à démontrer. On trouve parmi ces cibles deux gènes impliqués dans le développement : *ph-d* et *Asx*. Ces résultats ne sont pas surprenants puisque Ali et Bender ont mis en évidence un système de régulation croisée au sein des gènes du groupe *Polycomb* (Ali and Bender, 2004). Dans le cas de *ph-d*, nous avons montré que DSP1 se fixe plus particulièrement à proximité des séquences promotrices du gène, ce qui est cohérent avec la fixation des PcG et TrxG au niveau des CMM et des promoteurs des gènes qu'elles régulent. Enfin, plusieurs arguments étayent l'idée que DSP1 régule l'expression du gène *en*. Un premier argument est que DSP1 se fixe sur le locus *en* lors des expériences d'immunolocalisation sur les chromosomes polytènes. Un deuxième argument est que DSP1 est impliquée dans l'activité répressive du CMM *en* (article 2).

II DSP1 participe à l'initiation et au maintien de l'expression de gènes

L'activation de l'expression des gènes se déroule en deux étapes. La première étape correspond à l'établissement de l'expression et la seconde correspond à son maintien au cours du temps. Les résultats présentés dans l'article 3 suggèrent que DSP1 joue ce double rôle au cours du développement. En dehors de son activité de maintien de l'état transcriptionnel des gènes, DSP1 pourrait en association avec BCD participer à la mise en place de l'expression de *kni*.

La conséquence fonctionnelle de l'interaction entre une protéine HMGB et un facteur de transcription est souvent une augmentation de la fixation du facteur de transcription sur sa séquence cible et de son activité transcriptionnelle (Zappavigna et al., 1996 ; Zwillig et al., 1995). Par exemple, il a été montré au laboratoire que la protéine DSP1 est capable de stimuler la fixation de la protéine Dorsal à sa séquence cible (Decoville et al., 2000). Nous avons recherché si DSP1 possède la propriété d'augmenter la fixation de l'homéodomaine de BCD sur sa séquence cible (*kni64*) de la région régulatrice de *kni* (figure 24) par des expériences de retardement sur gel. Cette technique a déjà permis de mettre en évidence une augmentation de la fixation de l'homéodomaine de HOXD9 sur sa séquence cible en présence de la protéine HMGB1 (Zappavigna et al., 1996), ainsi que la stimulation de fixation du domaine POU des facteurs de transcription octamériques Oct-1, Oct-2 et Oct-6 sur l'ADN en présence de la protéine HMGB2 (Zwillig et al., 1995). Nous n'avons pas pu mettre en évidence un effet de DSP1 sur la fixation de l'homéodomaine de BCD sur la région *kni64* (Thèse A. Daulny). Cependant lors de nos essais de retardement sur gel, nous travaillons certainement sur un système trop réducteur pour visualiser l'effet de DSP1. En effet il est possible que la protéine DSP1 agisse en modifiant la conformation de la région régulatrice sur un plus large domaine que les 64 pb de la séquence *kni64*. Il serait donc utile de travailler avec un ADN plus grand. Il est également probable que d'autres facteurs protéiques aident BCD et DSP1 à activer l'expression du gène *kni*.

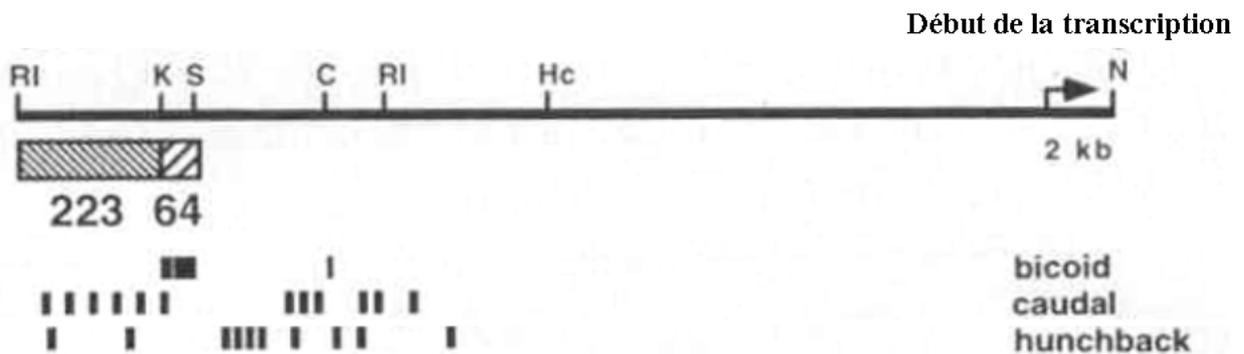


Figure 24. Représentation schématique de la région régulatrice de *kni*. Le domaine *kni64* est représenté par le carré hachuré. Le domaine *kni64* et un domaine adjacent de 223 pb représenté par le rectangle hachuré composent une région régulatrice de 300 pb. Les sites de fixation des protéines BCD, CAD et HB sont indiqués par des traits verticaux. RI, K, S, C, Hc et N indiquent des sites de restriction (RI, *EcoRI* ; N, *Nrul* ; K, *KpnI* ; S, *StyI* ; C, *Clal* ; Hc, *HincII*). (D'après Rivera-Pomar et al., 1995).

Une autre hypothèse est que DSP1 participe au maintien de l'expression de *kni* comme dans le cas des gènes homéotiques. Pelegri et Lehmann ont montré par des études de transgénèse qu'une courte séquence régulatrice d'environ 300 pb et qui recouvre la séquence *kni64* (figure 24) réprime l'expression de *kni* dans la région antérieure de l'embryon via la fixation de HB et E(Z) (Pelegri and Lehmann, 1994). Au contraire, la fixation de BCD et CAD est associée à l'activation du gène dans la partie postérieure (Rivera-Pomar et al., 1995). D'après ces auteurs, la protéine HB maternelle initie la répression de *kni* et la maintient en recrutant précocement les protéines PcG. Ainsi l'état réprimé perdure au cours des divisions mitotiques après la disparition de la protéine HB. Si les protéines PcG sont impliquées dans le maintien de la répression du gène *kni* dans la partie antérieure de l'embryon, on peut s'attendre à ce que les protéines TrxG maintiennent l'activation de *kni* dans la partie postérieure de l'embryon. DSP1 pourrait être directement recrutée par BCD pour maintenir l'expression de *kni*. Cette idée est étayée par le fait que DSP1 interagit physiquement avec BCD (article 3) et que la protéine BCD recrute, au niveau des gènes *hb* et *orthodenticle* (*otd*), des complexes de remodelage de la chromatine (Ronchi et al., 1993).

III Comment DSP1 reconnaît ses gènes cibles ?

III.1 Nécessité d'une séquence particulière

Une étude bioinformatique menée sur différents CMM de *Drosophila* nous a permis d'identifier une séquence 5'-GAAAA-3' (G(A)₄) régulièrement placée à proximité du motif de fixation de PHO. Au cours de notre étude (article 2), nous avons montré que cette séquence G(A)₄ est nécessaire à la fixation de DSP1 sur le CMM *Fab-7*. Les protéine HMGB se fixent sur des structures de l'ADN et non sur des enchaînements spécifiques de nucléotides. Le motif G(A)₄ doit donc induire une topologie particulière de l'ADN nécessaire à la fixation de DSP1. Toutefois, la probabilité de retrouver le motif G(A)₄ sur le génome est importante, il paraît donc évident qu'*in vivo* DSP1 ne s'y fixe pas systématiquement. Nous envisageons deux possibilités non exclusives pour expliquer la fixation de DSP1 sur ce motif. Une première possibilité est que les séquences adjacentes au motif G(A)₄ et qui sont spécifiques du locus considéré sont essentielles à la formation d'une superstructure particulière de l'ADN nécessaire à la fixation de DSP1. La deuxième possibilité est que la fixation de DSP1 est facilitée par d'autres facteurs protéiques. Ces facteurs peuvent être des complexes précoces de remodelage de la chromatine qui contrôlent la topologie du motif G(A)₄.

III.2 Evolution des cibles de DSP1 en fonction du stade de développement

Nous avons mis en évidence le rôle de DSP1 dans la régulation spatio-temporelle du gène *Scr* (article 1). Plus précisément, nous montrons que DSP1 régule directement l'activité de maintenance du locus *Scr10.0XbaI* dans les disques imaginaux T1 au cours des stades larvaires. DSP1 étant exprimée aussi bien dans l'embryon que dans la larve, comment est assuré le recrutement tardif de la protéine sur le locus *Scr* ? Une possibilité est que la fixation de DSP1 est facilitée par l'intervention de facteurs de remodelage de la chromatine tissus spécifiques. L'exemple de la protéine Tantalus qui confère une spécificité de tissu à la protéine ASX (Dietrich et al., 2001) est un argument en faveur de cette hypothèse.

IV Modèle d'action de DSP1

IV.1 DSP1 et le recrutement des protéines Polycomb et Trithorax

Nous avons montré que DSP1 est nécessaire au recrutement de PHO. Quel est le mode d'action de DSP1 pour recruter les PcG ? Travers ([Travers, 2003](#)) propose que les protéines HMGB favorisent le remodelage des nucléosomes. Dans ce cas, une protéine HMGB, en se liant à l'ADN à l'entrée du nucléosome, déforme l'ADN et le rend accessible à d'autres facteurs de transcription et aux complexes de remodelage de la chromatine (figure 25A). On peut imaginer que DSP1 recrutée sur *Ab-Fab* induit un remodelage de la structure chromatinienne qui permet à PHO de se fixer sur sa séquence cible (figure 25B). Une fois fixée, PHO recruterait à son tour les complexes PRC1 et ESC-E(Z) suite à des interactions directes et un marquage épigénétique ([Mohd-Sarip et al., 2002](#) ; [Wang et al., 2004a](#) ; [Wang et al., 2004b](#)).

A l'instar de ce que nous avons montré dans l'article 2, DSP1 pourrait être un recruteur des protéines TrxG. L'une des possibilités est que DSP1 recrute le complexe TAC1 (TRX, dCBP, Sbf1). Cette hypothèse est soutenue par plusieurs arguments. Tout d'abord, les résultats génétiques obtenus au laboratoire montrent que les gènes *dsp1* et *trx* interagissent génétiquement pour réguler les gènes homéotiques ([Decoville et al., 2001](#)). Ceci indique que DSP1 et TRX sont impliquées dans les mêmes mécanismes moléculaires. De plus, il a été montré que la protéine dCBP interagit *in vitro* avec les domaines HMG des protéines dTCF et LEF-1 murine ([Waltzer and Bienz, 1998](#)). Grâce à l'une de ses boîtes HMG, DSP1 pourrait interagir avec dCBP. Il serait donc intéressant de purifier les complexes protéiques contenant DSP1. En conclusion, DSP1 pourrait faciliter l'interaction entre le complexe TAC1 et la machinerie transcriptionnelle afin de maintenir l'expression de certains gènes puisque TAC1 semble faciliter l'élongation transcriptionnelle au niveau du promoteur *hsp70* ([Smith et al., 2004](#)) et les protéines HMGB activent et stabilisent *in vitro* le complexe promoteur-TFIID-TFIIA ([Shykind et al., 1995](#)).

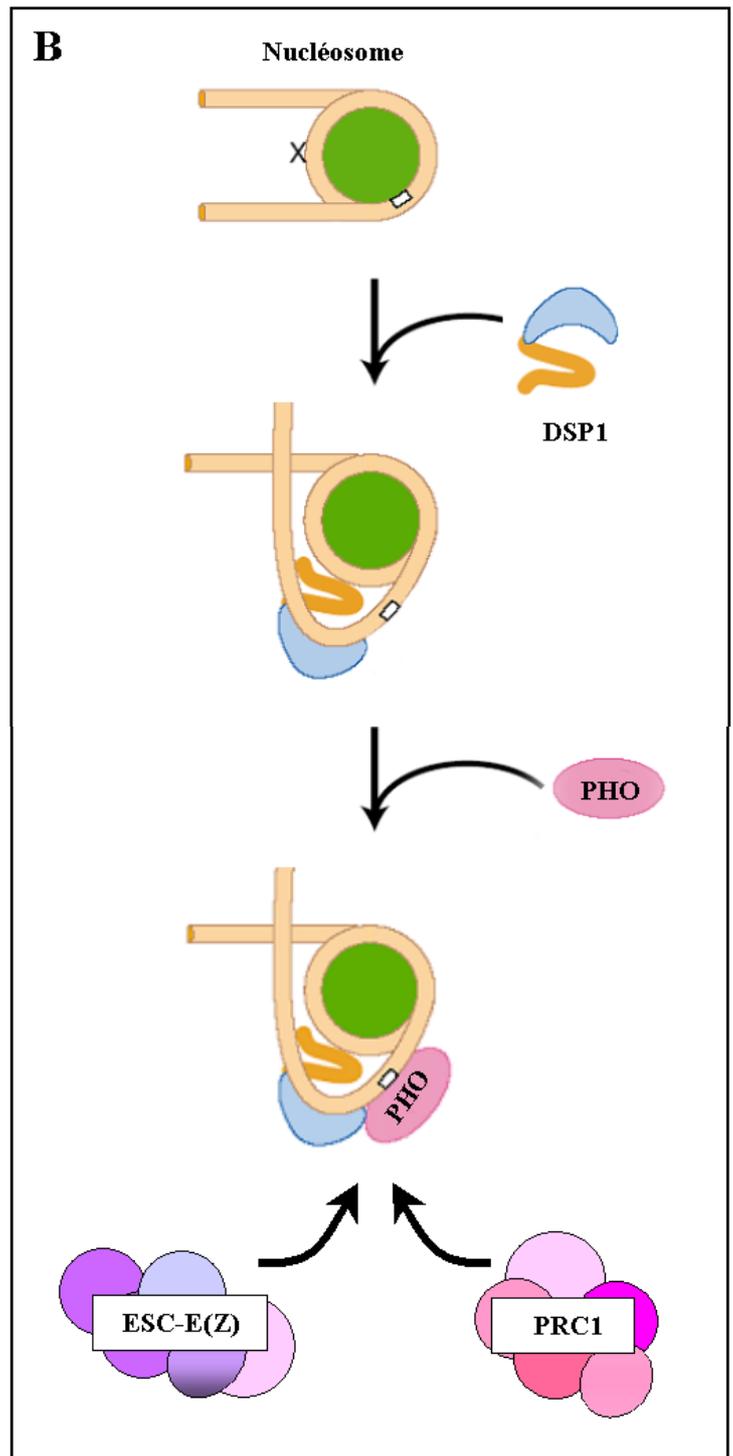
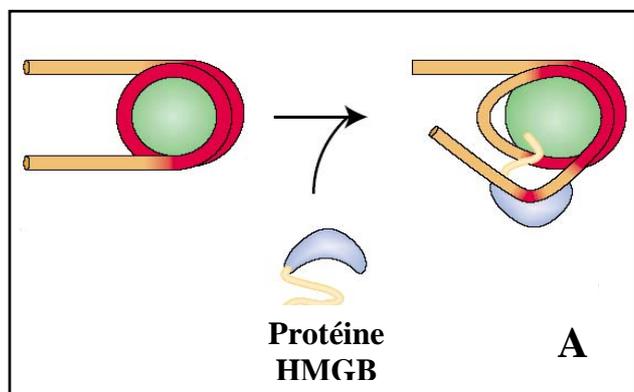


Figure 25. Modèle d'action des protéines HMGB et de DSP1. A) Remodelage de la chromatine par une protéine du type HMGB. En se fixant à l'entrée du nucléosome, les protéines HMGB déplacent le nucléosome (d'après Travers, 2003). B) En se fixant à l'ADN, DSP1 déplacerait le nucléosome. Le remodelage de la chromatine faciliterait la fixation de PHO sur sa séquence cibles. Une fois fixée, PHO pourrait à son tour recruter les complexes PRC1 et ESC-E(Z).

IV.2 Modèle de rapprochement des séquences régulatrices et des promoteurs

Les CMM sont dans de nombreux cas localisés à plusieurs dizaines de kilobases des promoteurs. Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer l'action des CMM sur les promoteurs. Une première hypothèse est que les CMM agissent comme des sites de nucléation à partir desquels la structure de la chromatine pourrait s'étendre jusqu'aux promoteurs le long de l'ADN. Une seconde hypothèse est que les CMM et les promoteurs sont mis en contact par un système de boucles d'ADN identique à celui proposé pour les activateurs de la transcription. Plusieurs arguments sont en faveur de cette seconde hypothèse. Différentes études ont mis en évidence la présence des TAF et TBP dans le complexe PRC1 au niveau de promoteurs inactifs (Saurin et al., 2001 ; Breiling et al., 2001). Un deuxième argument est que les protéines PcG et TrxG ne se fixent pas de façon homogène sur l'ensemble du génome. Au contraire ces protéines se fixent préférentiellement sur les CMM et les promoteurs. Un nouveau système nommé Capturing Chromosome Conformation (Dekker et al., 2002) a été utilisé pour démontrer une telle interaction entre des activateurs et des gènes (Tolhuis et al., 2002). Il serait intéressant d'utiliser cette technique pour mettre en évidence l'interaction possible entre les promoteurs et les CMM.

Les protéines à boîte HMG facilitent et stabilisent la communication entre des séquences régulatrices distantes par la formation de boucles d'ADN (Giese et al., 1995). Par conséquent DSP1 pourrait participer à ce type de mécanisme afin d'étendre une structure ouverte ou fermée de la chromatine suivant le locus considéré. La fixation préférentielle de DSP1 sur les promoteurs et les séquences régulatrices distantes est un argument en faveur de cette idée. Dans ce cas, DSP1 faciliterait et stabiliserait le rapprochement par la formation de dimères (figure 26). En effet, les protéines HMGB ont 2 boîtes qui permettent des interactions protéine-protéine et de récents travaux réalisés au laboratoire montrent *in vitro* que DSP1 peut former des dimères.

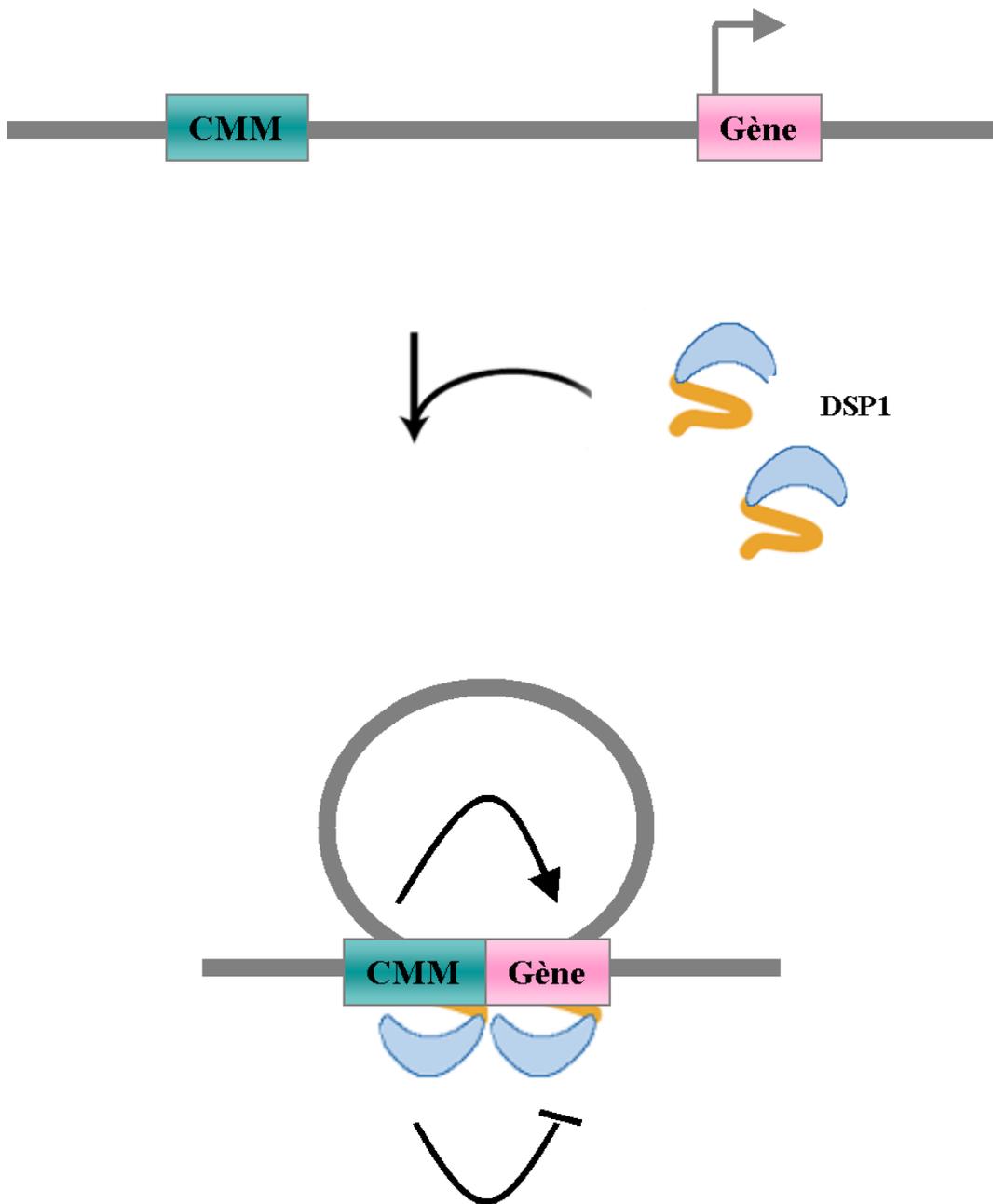


Figure 26. Modèle de rapprochement d'un CMM et d'un promoteur. La formation d'un dimère de la protéine DSP1 et sa fixation sur le CMM ainsi que sur le promoteur assureraient le rapprochement des deux domaines. Ce mécanisme permettrait à la structure chromatinienne ouverte ou fermée de s'étendre du CMM au promoteur.

Bibliographie

A

Aagaard L, Laible G, Selenko P, Schmid M, Dorn R, Schotta G, Kuhfittig S, Wolf A, Lebersorger A, Singh PB, Reuter G, Jenuwein T. Functional mammalian homologues of the *Drosophila* PEV-modifier *Su(var)3-9* encode centromere-associated proteins which complex with the heterochromatin component M31. *EMBO J.* (1999) 18: 1923-1938.

Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF, George RA, Lewis SE, Richards S, Ashburner M, Henderson SN, Sutton GG, Wortman JR, Yandell MD, Zhang Q, Chen LX, Brandon RC, Rogers YH, Blazej RG, Champe M, Pfeiffer BD, Wan KH, Doyle C, Baxter EG, Helt G, Nelson CR, Gabor GL, Abril JF, Agbayani A, An HJ, Andrews-Pfannkoch C, Baldwin D, Ballew RM, Basu A, Baxendale J, Bayraktaroglu L, Beasley EM, Beeson KY, Benos PV, Berman BP, Bhandari D, Bolshakov S, Borkova D, Botchan MR, Bouck J, Brokstein P, Brottier P, Burtis KC, Busam DA, Butler H, Cadieu E, Center A, Chandra I, Cherry JM, Cawley S, Dahlke C, Davenport LB, Davies P, de Pablos B, Delcher A, Deng Z, Mays AD, Dew I, Dietz SM, Dodson K, Doup LE, Downes M, Dugan-Rocha S, Dunkov BC, Dunn P, Durbin KJ, Evangelista CC, Ferraz C, Ferriera S, Fleischmann W, Fosler C, Gabrielian AE, Garg NS, Gelbart WM, Glasser K, Glodek A, Gong F, Gorrell JH, Gu Z, Guan P, Harris M, Harris NL, Harvey D, Heiman TJ, Hernandez JR, Houck J, Hostin D, Houston KA, Howland TJ, Wei MH, Ibegwam C, Jalali M, Kalush F, Karpen GH, Ke Z, Kennison JA, Ketchum KA, Kimmel BE, Kodira CD, Kraft C, Kravitz S, Kulp D, Lai Z, Lasko P, Lei Y, Levitsky AA, Li J, Li Z, Liang Y, Lin X, Liu X, Mattei B, McIntosh TC, McLeod MP, McPherson D, Merkulov G, Milshina NV, Mobarry C, Morris J, Moshrefi A, Mount SM, Moy M, Murphy B, Murphy L, Muzny DM, Nelson DL, Nelson DR, Nelson KA, Nixon K, Nusskern DR, Pacleb JM, Palazzolo M, Pittman GS, Pan S, Pollard J, Puri V, Reese MG, Reinert K, Remington K, Saunders RD, Scheeler F, Shen H, Shue BC, Siden-Kiamos I, Simpson M, Skupski MP, Smith T, Spier E, Spradling AC, Stapleton M, Strong R, Sun E, Svirskas R, Tector C, Turner R, Venter E, Wang AH, Wang X, Wang ZY, Wassarman DA, Weinstock GM, Weissenbach J, Williams SM, Woodage T, Worley KC, Wu D, Yang S, Yao QA, Ye J, Yeh RF, Zaveri JS, Zhan M, Zhang G, Zhao Q, Zheng L, Zheng XH, Zhong FN, Zhong W, Zhou X, Zhu S, Zhu X, Smith HO, Gibbs RA, Myers EW, Rubin GM, Venter JC. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science.* (2000) 287: 2185-2195.

Adamson AL, Shearn A. Molecular genetic analysis of *Drosophila ash2*, a member of the trithorax group required for imaginal disc pattern formation. *Genetics.* (1996) 144: 621-633.

Adler PN, Charlton J, Brunk B. Genetic interactions of the suppressor 2 of zeste region genes. *Dev Genet.* (1989) 10: 249-260.

Akhtar A, Zink D, Becker PB. Chromodomains are protein-RNA interaction modules. *Nature.* (2000) 407: 405-409.

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

Ali JY, Bender W. Cross-regulation among the polycomb group genes in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol*. (2004) 24: 7737-7747.

Allain FH, Yen YM, Masse JE, Schultze P, Dieckmann T, Johnson RC, Feigon J. Solution structure of the HMG protein NHP6A and its interaction with DNA reveals the structural determinants for non-sequence-specific binding. *EMBO J*. (1999) 18: 2563-2579.

Allan J, Mitchell T, Harborne N, Bohm L, Crane-Robinson C. Roles of H1 domains in determining higher order chromatin structure and H1 location. *J Mol Biol*. (1986) 20: 591-560.

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

B

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

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

Bannister AJ, Schneider R, Kouzarides T. Histone methylation: dynamic or static? *Cell*. (2002) 109: 801-806.

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

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

Baxevanis AD, Landsman D. The HMG-1 box protein family: classification and functional relationships. *Nucleic Acids Res*. (1995) 23: 1604-1613.

Becker PB, Horz W. ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu Rev Biochem*. (2002) 71: 247-273.

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

Bender W, Fitzgerald DP. Transcription activates repressed domains in the *Drosophila* bithorax complex. *Development*. (2002) 29: 4923-4930.

Bernstein BE, Humphrey EL, Erlich RL, Schneider R, Bouman P, Liu JS, Kouzarides T, Schreiber SL. Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2002) 99: 8695-8700.

Bhat MA, Philp AV, Glover DM, Bellen HJ. Chromatid segregation at anaphase requires the barren product, a novel chromosome-associated protein that interacts with Topoisomerase II. *Cell.* (1996) 87: 1103-1114.

Bianchi ME, Beltrame M. Upwardly mobile proteins. Workshop: the role of HMG proteins in chromatin structure, gene expression and neoplasia. *EMBO Rep.* (2000) 1: 109-114.

Bianchi ME, Beltrame M, Paonessa G. Specific recognition of cruciform DNA by nuclear protein HMG1. *Science.* (1989) 243: 1056-1059.

Bianchi ME, Falciola L, Ferrari S, Lilley DM. The DNA binding site of HMG1 protein is composed of two similar segments (HMG boxes), both of which have counterparts in other eukaryotic regulatory proteins. *Embo J.* (1992) 11: 1055-1063.

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

Botas J. Control of morphogenesis and differentiation by HOM/Hox genes. *Curr Opin Cell Biol.* (1993) 5: 1015-1022.

Boulet AM, Lloyd A, Sakonju S. Molecular definition of the morphogenetic and regulatory functions and the cis-regulatory elements of the *Drosophila* Abd-B homeotic gene. *Development.* (1991) 111: 393-405.

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

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

Brickman JM, Adam M, Ptashne M. Interactions between an HMG-1 protein and members of the Rel family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1999) 96: 10679-10683.

Broadhurst RW, Hardman CH, Thomas JO, Laue ED. Backbone dynamics of the A domain of HMG1 as studied by ¹⁵N NMR spectroscopy. *Biochemistry.* (1995) 34: 16608-16617.

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

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

Brunner E, Peter O, Schweizer L, Basler K. pangolin encodes a Lef-1 homologue that acts downstream of Armadillo to transduce the Wiggless signal in *Drosophila*. *Nature*. (1997) 385: 829-833.

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

Bulger M, Groudine M. Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation. *Genes Dev*. (1999) 13: 2465-2477.

Bustin M. Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the highmobility-group chromosomal proteins. *Mol cell boil*. (1999) 19: 5237-5246.

Busturia A, Casanova J, Sanchez-Herrero E, Gonzalez R, Morata G. Genetic structure of the *abd-A* gene of *Drosophila*. *Development*. (1989) 107: 575-583.

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

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

C

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

Calhoun VC, Levine M. Long-range enhancer-promoter interactions in the *Scr-Antp* interval of the *Drosophila Antennapedia* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2003) 100: 9878-9883.

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

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

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

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

Celniker SE, Sharma S, Keelan DJ, Lewis EB. The molecular genetics of the bithorax complex of *Drosophila*: cis-regulation in the Abdominal-B domain. *EMBO J.* (1990) 9: 4277-4286.

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

Chiang A, O'Connor MB, Paro R, Simon J, Bender W. Discrete Polycomb-binding sites in each parasegmental domain of the bithorax complex. *Development.* (1995) 121: 1681-1689.

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

Collins RT, Treisman JE. Osa-containing Brahma chromatin remodeling complexes are required for the repression of wingless target genes. *Genes Dev.* (2000) 14: 3140-3152.

Cosma, M.P., Tanaka, T. and Nasmyth, K. Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter. *Cell.* (1999) 97: 299-311.

Crosby, M.A., Miller, C., Alon, T., Watson, K.L., Verrijzer, C.P., Goldman-Levi, R. and Zak, N.B. The trithorax group gene moira encodes a brahma-associated putative chromatin-remodeling factor in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol.* (1999) 19: 1159-1170.

Cryderman DE, Morris EJ, Biessmann H, Elgin SCR, Wallrath LL. Silencing at *Drosophila* telomeres: nuclear organization and chromatin structure play critical roles, *EMBO J.* (1999a) 18: 3724-3735.

Cryderman DE, Tang H, Bell C, Gilmour DS, Wallrath LL. Heterochromatic silencing of *Drosophila* heat shock genes acts at the level of promoter potentiation. *Nucleic Acids Res.* (1999b) 27: 3364-3370.

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

D

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

Daulny A. Implication de la protéine DSP1 dans le contrôle génétique du développement embryonnaire précoce de *Drosophila melanogaster*. (2003) Th : Aspect Moléculaire et Cellulaire en Biologie. Centre de Biophysique Moléculaire. Université d'Orléans, France.

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

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

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

Dekker J, Rippe K, Dekker M, Kleckner N. Capturing chromosome conformation. *Science*. (2002) 295: 1306-1311.

Dietrich BH, Moore J, Kyba M, dosSantos G, McCloskey F, Milne TA, Brock HW, Krause HM. Tantalus, a novel ASX-interacting protein with tissue-specific functions. *Dev Biol*. (2001) 234: 441-453.

Dietzel S, Niemann H, Bruckner B, Maurange C, Paro R. The nuclear distribution of Polycomb during *Drosophila melanogaster* development shown with a GFP fusion protein. *Chromosoma*. (1999) 108: 83-94.

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

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

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

E

Elfring LK, Deuring R, McCallum CM, Peterson CL, Tamkun JW. Identification and characterization of *Drosophila* relatives of the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Mol Cell Biol*. (1994) 14: 2225-2234.

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

F

Falciola L, Murchie AI, Lilley DM, Bianchi M. Mutational analysis of the DNA binding domain A of chromosomal protein HMG1. *Nucleic Acids Res*. (1994) 22: 285-292.

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

Faucheux, M., Roignant, J.Y., Netter, S., Charollais, J., Antoniewski, C. and Theodore, L. batman Interacts with Polycomb and trithorax Group Genes and Encodes a BTB/POZ Protein That Is Included in a Complex Containing GAGA Factor. *Mol Cell Biol*. (2003) 23: 1181-1195.

Fauvarque MO, Dura JM. polyhomeotic regulatory sequences induce developmental regulator-dependent variegation and targeted P-element insertions in Drosophila. *Genes Dev*. (1993) 7: 1508-15820.

Felsenfeld G, Groudine M. Controlling the double helix. *Nature*. (2003) 421: 448-453.

Fitzgerald DP, Bender W. Polycomb group repression reduces DNA accessibility. *Mol Cell Biol*. (2001) 21: 6585-6597.

Francis NJ, Kingston RE. Mechanisms of transcriptional memory. *Nat Rev Mol Cell Biol*. (2001) 2: 409-421.

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

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

Fritsch, C., Brown, J.L., Kassis, J.A. and Muller, J. The DNA-binding polycomb group protein pleiohomeotic mediates silencing of a Drosophila homeotic gene. *Development*. (1999) 126: 3905-3913.

G

Garcia-Bellido A, Ripoll P, Morata G. Developmental compartmentalisation of the wing disk of Drosophila. *Nat New Biol*. (1973) 245: 251-253.

Georgiev PG, Gerasimova TI. Novel genes influencing the expression of the yellow locus and mdg4 (gypsy) in Drosophila melanogaster. *Mol Gen Genet*. (1989) 220: 121-126.

Giese K, Kingsley C, Kirshner JR, Grosschedl R. Assembly and function of a TCR alpha enhancer complex is dependent on LEF-1-induced DNA bending and multiple protein-protein interactions. *Genes Dev*. (1995) 9: 995-1008.

Gilbert SF. *Biologie du Développement*, p 561. (1996). Ed DeBoeck-Université.

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

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

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

Girton JR, Jeon SH. Novel embryonic and adult homeotic phenotypes are produced by pleiohomeotic mutations in *Drosophila*. *Dev Biol*. (1994) 161: 393-407.

Grewal SI, Elgin SC. Heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure. *Curr Opin Genet Dev*. (2002) 12: 178-187.

Grosschedl R, Giese K, Pagel J. HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures. *Trends Genet*. (1994) 10: 94-100.

Gunster MJ, Satijn DP, Hamer KM, den Blaauwen JL, de Bruijn D, Alkema MJ, van Lohuizen M, van Driel R, Otte AP. Identification and characterization of interactions between the vertebrate polycomb-group protein BMI1 and human homologs of polyhomeotic. *Mol Cell Biol*. (1997) 17: 2326-2335.

Gurley LR, Walters RA, Tobey RA. Histone phosphorylation in late interphase and mitosis. *Biochem Biophys Res Commun*. (1973) 50: 744-750.

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

H

Hagstrom K, Muller M, Schedl P. A Polycomb and GAGA dependent silencer adjoins the *Fab-7* boundary in the *Drosophila* bithorax complex. *Genetics*. (1997) 146: 1365-1380.

Hirano T. Evolutionary insights into chromosome condensation. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*. (1999) 44 (12 Suppl): 1698-1702

Hodgson JW, Argiropoulos B, Brock HW. Site-specific recognition of a 70-base-pair element containing d(GA)(n) repeats mediates bithoraxoid polycomb group response element-dependent silencing. *Mol Cell Biol*. (2001) 21: 4528-4543.

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

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

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

Hsieh TF, Hakim O, Ohad N, Fischer RL. From flour to flower: how Polycomb group proteins influence multiple aspects of plant development. *Trends Plant Sci.* (2003) 8: 439-445.

Huang DH, Chang YL. Isolation and characterization of CHRASCH, a polycomb-containing silencing complex. *Methods Enzymol.* (2004) 377: 267-282.

Huang DH, Chang YL, Yang CC, Pan IC, King B. Pipsqueak encodes a factor essential for sequence-specific targeting of a polycomb group protein complex. *Mol Cell Biol.* (2002) 22: 6261-6271.

Hughes EN, Engelsberg BN, Billings PC. Purification of nuclear proteins that bind to cisplatin-damaged DNA. Identity with high mobility group proteins 1 and 2. *J Biol Chem.* (1992) 267: 13520-13527.

I

Ingham PW, Whittle JRS. Trithorax: a new homoeotic mutation of *Drosophila melanogaster* causing transformations of abdominal and thoracic imaginal segments. 1. Putative role during embryogenesis. *Mol. Gen. Genet.* (1980) 179: 607-614

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

J

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

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

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

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

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

K

- Kal, A.J., Mahmoudi, T., Zak, N.B. and Verrijzer, C.P. (2000) The *Drosophila* brahma complex is an essential coactivator for the trithorax group protein zeste. *Genes Dev.* (2000) 14: 1058-1071.
- Karch F, Galloni M, Sipos L, Gausz J, Gyurkovics H, Schedl P. Mcp and Fab-7: molecular analysis of putative boundaries of cis-regulatory domains in the bithorax complex of *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res.* (1994) 22: 3138-3146.
- Karch F, Weiffenbach B, Peifer M, Bender W, Duncan I, Celniker S, Crosby M, Lewis EB. The abdominal region of the bithorax complex. *Cell.* (1985) 43: 81-96
- Kassis JA. Unusual properties of regulatory DNA from the *Drosophila* engrailed gene: three "pairing-sensitive" sites within a 1.6-kb region. *Genetics.* (1994) 136: 1025-1038
- Kawamura A, Yokota S, Yamada K, Inoue H, Inohaya K, Yamazaki K, Yasumasu I, Higashinakagawa T. Pc1 and PSC1, zebrafish homologs of *Drosophila* Polycomb and Posterior sex combs, encode nuclear proteins capable of complex interactions. *Biochem Biophys Res Commun.* (2002) 294: 456-463.
- Kehle J, Beuchle D, Treuheit S, Christen B, Kennison JA, Bienz M, Muller J. dMi-2, a hunchback-interacting protein that functions in polycomb repression. *Science.* (1998) 282: 1897-1900.
- Kennison JA, Tamkun JW. Dosage-dependent modifiers of polycomb and antennapedia mutations in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1988) 85: 8136-8140.
- Kingston RE, Narlikar GJ. ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev.* (1999) 13: 2339-2352.
- Kinoshita T, Harada JJ, Goldberg RB, Fischer RL. Polycomb repression of flowering during early plant development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2001) 98: 14156-14161.
- Klymenko T, Muller J. The histone methyltransferases Trithorax and Ash1 prevent transcriptional silencing by Polycomb group proteins. *EMBO Rep.* (2004) 5: 373-377.
- Kodjabachian L, Delaage M, Maurel C, Miassod R, Jacq B, Rosset R. Mutations in ccf, a novel *Drosophila* gene encoding a chromosomal factor, affect progression through mitosis and interact with Pc-G mutations. *EMBO J.* (1998) 17: 1063-1075.
- Korf I, Fan Y, Strome S. The Polycomb group in *Caenorhabditis elegans* and maternal control of germline development. *Development.* (1998) 125: 2469-2478.
- Krebs, J.E., Kuo, M.H., Allis, C.D. and Peterson, C.L. Cell cycle-regulated histone acetylation required for expression of the yeast HO gene. *Genes Dev.* (1999) 13: 1412-1421.
- Kuhn DT, Woods DF, Cook JL. Analysis of new homeotic mutation (*iab-2*) within the bithorax complex in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.* (1981) 181: 82-86.

Kurenova E, Champion L, Biessmann H, Mason JM. Directional gene silencing induced by a complex subtelomeric satellite from *Drosophila*. *Chromosoma*. (1998) 107: 311-320.

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

Kuzmichev A, Nishioka K, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D. Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes Dev*. (2002) 16: 2893-2905.

L

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

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

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

Levine M, Hafen E, Garber RL, Gehring WJ. Spatial distribution of *Antennapedia* transcripts during *Drosophila* development. *EMBO J*. (1983) 2: 2037-2046.

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

Lewis PH. New mutants report. *Drosophila Information Service*. (1947) 21: 69.

Lonie A, D'Andrea R, Paro R, Saint R. Molecular characterisation of the *Polycomblike* gene of *Drosophila melanogaster*, a trans-acting negative regulator of homeotic gene expression. *Development*. (1994) 120: 2629-2636.

Luger K. Structure and dynamic behavior of nucleosomes. *Curr Opin Genet Dev*. (2003) 13: 127-135.

Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. (1997) 389: 251-260.

Lupo R, Breiling A, Bianchi ME, Orlando V. *Drosophila* chromosome condensation proteins Topoisomerase II and Barren colocalize with Polycomb and maintain Fab-7 PRE silencing. *Mol Cell*. (2001) 7: 127-136.

M

Mahadevan LC, Willis AC, Barratt MJ. Rapid histone H3 phosphorylation in response to growth factors, phorbol esters, okadaic acid, and protein synthesis inhibitors. *Cell*. (1991) 65: 775-783.

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

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

Margueron R, Trojer P, Reinberg D. The key to development: interpreting the histone code? *Curr Opin Genet Dev*. (2005) 15: 163-176.

Martin CH, Mayeda CA, Davis CA, Ericsson CL, Knafels JD, Mathog DR, Celniker SE, Lewis EB, Palazzolo MJ. Complete sequence of the bithorax complex of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (1995) 92: 8398-83402.

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

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

McKeon J, Brock HW. Interactions of the Polycomb group of genes with homeotic loci of *Drosophila*. *Dev. Biol*. (1991) 199: 387-396.

Mihaly J, Mishra RK, Karch F. A conserved sequence motif in Polycomb-response elements. *Mol Cell*. (1998) 1: 1065-1066.

Mishra K, Chopra VS, Srinivasan A, Mishra RK. Trl-GAGA directly interacts with lola like and both are part of the repressive complex of Polycomb group of genes. *Mech Dev*. (2003) 120: 681-689.

Mishra RK, Mihaly J, Barges S, Spierer A, Karch F, Hagstrom K, Schweinsberg SE, Schedl P. The *iab-7* polycomb response element maps to a nucleosome-free region of chromatin and requires both GAGA and pleiohomeotic for silencing activity. *Mol Cell Biol*. (2001) 21: 1311-1318.

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

Mohrmann L, Langenberg K, Krijgsveld J, Kal AJ, Heck AJ, Verrijzer CP. Differential targeting of two distinct SWI/SNF-related *Drosophila* chromatin-remodeling complexes. *Mol Cell Biol*. (2004) 24: 3077-88.

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

Morales V, Giamarchi C, Chailleux C, Moro F, Marsaud V, Le Ricousse S, Richard-Foy H. Chromatin structure and dynamics: functional implications. *Biochimie*. (2001) 83: 1029-1039.

Mosrin-Huaman C, Canaple L, Locker D, Decoville M. DSP1 gene of *Drosophila melanogaster* encodes an HMG-domain protein that plays multiple roles in development. *Dev Genet*. (1998) 23: 324-334.

Mulholland NM, King IF, Kingston RE. Regulation of Polycomb group complexes by the sequence-specific DNA binding proteins Zeste and GAGA. *Genes Dev*. (2003) 17: 2741-2746.

Muller J, Gaunt S, Lawrence PA. Function of the Polycomb protein is conserved in mice and flies. *Development*. (1995) 121: 2847-2852.

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

Murphy FV 4th, Sweet RM, Churchill ME. The structure of a chromosomal high mobility group protein-DNA complex reveals sequence-neutral mechanisms important for non-sequence-specific DNA recognition. *EMBO J*. (1999) 18: 6610-6608.

Muyers-Chen I, Rozovskaia T, Lee N, Kersey JH, Nakamura T, Canaani E, Paro R. Expression of leukemic MLL fusion proteins in *Drosophila* affects cell cycle control and chromosome morphology. *Oncogene*. (2004) 23: 8639-8648.

N

Nagy PL, Griesenbeck J, Kornberg RD, Cleary ML. A trithorax group complex purified from *Saccharomyces cerevisiae* is required for methylation of histone H3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2002) 99: 90-94.

Narbonne K, Besse F, Brissard-Zahraoui J, Pret AM, Busson D. polyhomeotic is required for somatic cell proliferation and differentiation during ovarian follicle formation in *Drosophila*. *Development*. (2004) 131: 1389-1400.

Ng, J., Hart, C.M., Morgan, K. and Simon, J.A. A *Drosophila* ESC-E(Z) protein complex is distinct from other polycomb group complexes and contains covalently modified ESC. *Mol Cell Biol*. (2000) 20: 3069-3078.

O

Orlando V, Jane EP, Chinwalla V, Harte PJ, Paro R. Binding of trithorax and Polycomb proteins to the bithorax complex: dynamic changes during early *Drosophila* embryogenesis. *EMBO J.* (1998) 17: 5141-5150.

Orlando V, Strutt H, Paro R. Analysis of chromatin structure by in vivo formaldehyde cross-linking. *Methods.* (1997) 11: 205-214.

Orphanides G, LeRoy G, Chang CH, Luse DS, Reinberg D. FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes. *Cell.* (1998) 92: 105-116.

Orphanides G, Wu WH, Lane WS, Hampsey M, Reinberg D. The chromatin-specific transcription elongation factor FACT comprises human SPT16 and SSRP1 proteins. *Nature.* (1999) 400: 284-288.

Otte AP, Kwaks TH. Gene repression by Polycomb group protein complexes: a distinct complex for every occasion? *Curr Opin Genet Dev.* (2003) 13: 448-454.

P

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

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

Parisi MA, Clayton DA. Similarity of human mitochondrial transcription factor 1 to high mobility group proteins. *Science.* (1991) 252: 965-969.

Paro R. Imprinting a determined state into the chromatin of *Drosophila*. *Trends Genet.* (1990) 6: 416-421.

Paro R, Hogness DS. The Polycomb protein shares a homologous domain with a heterochromatin-associated protein of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1991) 88: 263-267.

Pattatucci AM, Otteson DC, Kaufman TC. A functional and structural analysis of the Sex combs reduced locus of *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* (1991) 129: 423-441.

Pauken CM, Nagle DL, Bucan M, Lo CW. Molecular cloning, expression analysis, and chromosomal localization of mouse Hmg1-containing sequences. *Mamm Genome.* (1994) 5: 91-99.

Pelegri F, Lehmann R. A role of polycomb group genes in the regulation of gap gene expression in *Drosophila*. *Genetics.* (1994) 136: 1341-1353.

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

Pil PM, Lippard SJ. Specific binding of chromosomal protein HMG1 to DNA damaged by the anticancer drug cisplatin. *Science*. (1992) 256: 234-237.

Pirrotta V. PcG complexes and chromatin silencing. *Curr Opin Genet Dev*. (1997) 7: 249-258.

Platero JS, Hartnett T, Eissenberg JC. Functional analysis of the chromo domain of HP1. *EMBO J*. (1995) 14: 3977-3986.

Poux S, McCabe D, Pirrotta V. Recruitment of components of Polycomb Group chromatin complexes in *Drosophila*. *Development*. (2001a) 128: 75-85.

Poux S, Melfi R, Pirrotta V. Establishment of Polycomb silencing requires a transient interaction between PC and ESC. *Genes Dev*. (2001b) 15: 2509-2514.

Poux S, Horard B, Sigrist CJ, Pirrotta V. The *Drosophila* trithorax protein is a coactivator required to prevent re-establishment of polycomb silencing. *Development*. (2002) 129: 2483-2493.

R

Randsholt NB, Maschat F, Santamaria P. polyhomeotic controls engrailed expression and the hedgehog signaling pathway in imaginal discs. *Mech Dev*. (2000) 95: 89-99.

Rank G, Prestel M, Paro R. Transcription through intergenic chromosomal memory elements of the *Drosophila* bithorax complex correlates with an epigenetic switch. *Mol Cell Biol*. (2002) 22: 8026-8034.

Rastelli L, Chan CS, Pirrotta V. Related chromosome binding sites for zeste, suppressors of zeste and Polycomb group proteins in *Drosophila* and their dependence on Enhancer of zeste function. *EMBO J*. (1993) 12: 1513-1522.

Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD, Jenuwein T. Regulation of chromatin structure by sitespecific histone H3 methyltransferases. *Nature*. (2000) 406: 593-599.

Read CM, Cary PD, Crane-Robinson C, Driscoll PC, Norman DG. Solution structure of a DNA-binding domain from HMG1. *Nucleic Acids Res*. (1993) 21: 3427-3436.

Ringrose L, Rehmsmeier M, Dura JM, Paro R. Genome-wide prediction of Polycomb/Trithorax response elements in *Drosophila melanogaster*. *Dev Cell*. (2003) 5: 759-771.

Ringrose L, Paro R. Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins. *Annu Rev Genet*. (2004) 38: 413-443.

Rivera-Pomar R, Niessing D, Schmidt-Ott U, Gehring WJ, Jackle H. RNA binding and translational suppression by bicoid. *Nature*. (1996) 379: 746-749.

Rogakou EP, Sekeri-Pataryas KE. Histone variants of H2A and H3 families are regulated during in vitro aging in the same manner as during differentiation. *Exp Gerontol*. (1999) 34: 741-754.

Roguev A, Schaft D, Shevchenko A, Pijnappel WW, Wilm M, Aasland R, Stewart AF. The *Saccharomyces cerevisiae* Set1 complex includes an Ash2 homologue and methylates histone 3 lysine 4. *EMBO J*. (2001) 20: 7137-7148.

Ronchi E, Treisman J, Dostatni N, Struhl G, Desplan C. Down regulation of the *Drosophila* morphogen bicoid by the torso receptor-mediated signal transduction cascade. *Cell*. (1993) 74: 347-355.

Roth SY, Denu JM, Allis CD. Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem*. (2001) 70: 81-120.

Rozenblatt-Rosen O, Rozovskaia T, Burakov D, Sedkov Y, Tillib S, Blechman J, Nakamura T, Croce CM, Mazo A, Canaani E. The C-terminal SET domains of ALL-1 and TRITHORAX interact with the INI1 and SNR1 proteins, components of the SWI/SNF complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (1998) 95: 4152-4157.

Rozovskaia T, Tillib S, Smith S, Sedkov Y, Rozenblatt-Rosen O, Petruk S, Yano T, Nakamura T, Ben-Simchon L, Gildea J, Croce CM, Shearn A, Canaani E, Mazo A. Trithorax and ASH1 interact directly and associate with the trithorax group-responsive bxd region of the Ultrabithorax promoter. *Mol Cell Biol*. (1999) 19: 6441-6447.

S

Saget O, Forquignon F, Santamaria P, Randsholt NB. Needs and targets for the multi sex combs gene product in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. (1998) 149: 1823-1838.

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

Sanchez-Herrero E. Control of the expression of the bithorax complex genes abdominal-A and abdominal-B by cis-regulatory regions in *Drosophila* embryos. *Development*. (1991) 111: 437-449.

Santamaria P, Randsholt NB. Characterization of a region of the X chromosome of *Drosophila* including multi sex combs (mxc), a Polycomb group gene which also functions as a tumour suppressor. *Mol Gen Genet*. (1995) 246: 282-290.

Satijn DP, Gunster MJ, van der Vlag J, Hamer KM, Schul W, Alkema MJ, Saurin AJ, Freemont PS, van Driel R, Otte AP. RING1 is associated with the polycomb group protein complex and acts as a transcriptional repressor. *Mol Cell Biol*. (1997) 17: 4105-4113.

Satijn DP, Hamer KM, den Blaauwen J, Otte AP. The polycomb group protein EED interacts with YY1, and both proteins induce neural tissue in *Xenopus* embryos. *Mol Cell Biol.* (2001) 21: 1360-1369.

Satijn DP, Otte AP. RING1 interacts with multiple Polycomb-group proteins and displays tumorigenic activity. *Mol Cell Biol.* (1999) 19: 57-68.

Sato T, Hayes PH, Denell RE. Homeosis in *Drosophila* : maternal effect of the enhancer of polycomb locus and its interaction with polycomb and related loci. *Dev. Genet.* (1984) 4: 185-198.

Sato T, Hayes PH, Denell RE. Homeosis in *Drosophila* : roles and spatial patterns of expression of the Antennapedia and Sex combs reduced loci in embryogenesis. *Dev. Biol.* (1985) 111: 171 -192.

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

Schmitt S, Prestel M, Paro R. Intergenic transcription through a polycomb group response element counteracts silencing. *Genes Dev.* (2005) 19: 697-708.

Schneider R, Bannister AJ, Myers FA, Thorne AW, Crane-Robinson C, Kouzarides T. Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nat Cell Biol.* (2004) 6: 73-77.

Schwendemann A, Lehmann M. Pipsqueak and GAGA factor act in concert as partners at homeotic and many other loci. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2002) 99: 12883-12888.

Sengupta AK, Kuhrs A, Muller J. General transcriptional silencing by a Polycomb response element in *Drosophila*. *Development.* (2004) 131: 1959-1965.

Sewalt RG, van der Vlag J, Gunster MJ, Hamer KM, den Blaauwen JL, Satijn DP, Hendrix T, van Driel R, Otte AP. Characterization of interactions between the mammalian polycomb-group proteins Enx1/EZH2 and EED suggests the existence of different mammalian polycomb-group protein complexes. *Mol Cell Biol.* (1998) 18: 3586-3595.

Shannon MP, Kaufman TC, Shen MW, Judd BH. Lethality patterns and morphology of selected lethal and semi-lethal mutations in the zeste-white region of *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* (1972) 72: 615-638.

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

Shearn A. The ash-1, ash-2 and trithorax genes of *Drosophila melanogaster* are functionally related. *Genetics.* (1989) 121: 517-525.

Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, Casero RA, Shi Y. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell.* (2004) 119: 941-953.

Shimell MJ, Peterson AJ, Burr J, Simon JA, O'Connor MB. Functional analysis of repressor binding sites in the *iab-2* regulatory region of the abdominal-A homeotic gene. *Dev Biol.* (2000) 218: 38-52.

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

Shirakawa H, Yoshida M. Structure of a gene coding for human HMG2 protein. *J Biol Chem.* (1992) 267: 6641-6645.

Shykind BM, Kim J, Sharp PA. Activation of the TFIID-TFIIA complex with HMG-2. *Genes Dev.* (1995) 9: 1354-1365.

Simon J, Chiang A, Bender W. Ten different Polycomb group genes are required for spatial control of the *abdA* and *AbdB* homeotic products. *Development.* (1992) 4: 493-505.

Simon JA, Tamkun JW. Programming off and on states in chromatin: mechanisms of Polycomb and trithorax group complexes. *Curr Opin Genet Dev.* (2002) 12: 210-218.

Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature.* (1990) 346: 240-244.

Sinclair DA, Milne TA, Hodgson JW, Shellard J, Salinas CA, Kyba M, Randazzo F, Brock HW. The Additional sex combs gene of *Drosophila* encodes a chromatin protein that binds to shared and unique Polycomb group sites on polytene chromosomes. *Development.* (1998) 125: 1207-1216.

Singh PB, Georgatos SD. HP1: facts, open questions, and speculation. *J Struct Biol.* (2002) 140: 10-16.

Slifer EH. A mutant stock of *Drosophila* with extra sex combs. *J Exp Zool.* (1942) 90: 31-40.

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

Srinivasan S, Armstrong JA, Deuring R, Dahlsveen IK, McNeill H, Tamkun JW. The *Drosophila* trithorax group protein Kismet facilitates an early step in transcriptional elongation by RNA Polymerase II. *Development.* (2005) 132: 1623-1635.

Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature.* (2000) 3: 41-45.

Struhl G. A gene product required for correct initiation of segmental determination in *Drosophila*. *Nature.* (1981) 293: 36-41.

Struhl G, Akam M. Altered distributions of Ultrabithorax transcripts in extra sex combs mutant embryos of *Drosophila*. *EMBO J.* (1985) 4: 3259-3264.

Strutt H, Cavalli G, Paro R. Co-localization of Polycomb protein and GAGA factor on regulatory elements responsible for the maintenance of homeotic gene expression. *EMBO J.* (1997) 16: 3621-3632.

Strutt H, Paro R. The polycomb group protein complex of *Drosophila melanogaster* has different compositions at different target genes. *Mol Cell Biol.* (1997) 17: 6773-6783.

Sullivan KF, Hechenberger M, Masri K. Human CENP-A contains a histone H3 related histone fold domain that is required for targeting to the centromere. *J Cell Biol.* (1994) 127: 581-592.

Sun ZW, Allis CD. Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature.* (2002) 418: 104-108.

T

Tamkun JW, Deuring R, Scott MP, Kissinger M, Pattatucci AM, Kaufman TC, Kennison JA. *brahma*: a regulator of *Drosophila* homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell.* (1992) 68: 561-572.

Tartof, K.D., Bishop, C., Jones, M., Hobbs, C.A. and Locke, J. Towards an understanding of position effect variegation. *Dev Genet.* (1989) 10: 162-176.

Tautz D, Pfeifle C. A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene *hunchback*. *Chromosoma.* (1989) 98: 81-85.

Teo SH, Grasser KD, Hardman CH, Broadhurst RW, Laue ED, Thomas JO. Two mutations in the HMG-box with very different structural consequences provide insights into the nature of binding to four-way junction DNA. *Embo J.* (1995) 14: 3844-3853.

Therrien M, Morrison DK, Wong AM, Rubin GM. A genetic screen for modifiers of a kinase suppressor of Ras-dependent rough eye phenotype in *Drosophila*. *Genetics.* (2000) 156: 1231-1242.

Tie, F., Furuyama, T., Prasad-Sinha, J., Jane, E. and Harte, P.J. 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.* (2001) 128: 275-286.

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

Tillib S, Petruk S, Sedkov Y, Kuzin A, Fujioka M, Goto T, Mazo A. Trithorax- and Polycomb-group response elements within an Ultrabithorax transcription maintenance unit consist of closely situated but separable sequences. *Mol Cell Biol.* (1999) 19: 5189-5202.

Tolhuis B, Palstra RJ, Splinter E, Grosveld F, de Laat W. Looping and interaction between hypersensitive sites in the active beta-globin locus. *Mol Cell.* (2002) 10: 1453-1465.

Treisman J. Drosophila homologues of the transcriptional coactivation complex subunits TRAP240 and TRAP230 are required for identical processes in eye-antennal disc development. *Development.* (2001) 128: 603-615.

Travers AA. Priming the nucleosome: a role for HMGB proteins? *EMBO Rep.* (2003) 4: 131-136.

Travis A, Amsterdam A, Belanger C, Grosschedl R. LEF-1, a gene encoding a lymphoid-specific protein with an HMG domain, regulates T-cell receptor alpha enhancer function. *Genes Dev.* (1991) 5: 880-894.

V

Vaccari T, Beltrame M, Ferrari S, Bianchi ME. Hmg4, a new member of the Hmg1/2 gene family. *Genomics.* (1998) 49: 247-252.

van de Wetering M, Clevers H. Sequence-specific interaction of the HMG box proteins TCF-1 and SRY occurs within the minor groove of a Watson-Crick double helix. *EMBO J.* (1992) 11: 3039-3044

van Lohuizen M. The trithorax-group and polycomb-group chromatin modifiers: implications for disease. *Curr Opin Genet Dev.* (1999) 9: 355-361.

Vazquez, M., Moore, L. and Kennison, J.A. The trithorax group gene *osa* encodes an ARID domain protein that genetically interacts with the brahma chromatin-remodeling factor to regulate transcription. *Development.* (1999) 126: 733-742.

W

Wakimoto BT, Kaufman TC. Analysis of larval segmentation in lethal genotypes associated with the antennapedia gene complex in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol.* (1981) 81: 51-64.

Wallrath, L.L. Unfolding the mysteries of heterochromatin. *Curr Opin Genet Dev.* (1998) 8, 147-153.

Waltzer L, Bienz M. Drosophila CBP represses the transcription factor TCF to antagonize Wingless signalling. *Nature.* (1998) 395: 521-525.

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

Wang L, Brown JL, Cao R, Zhang Y, Kassis JA, Jones RS. Hierarchical recruitment of polycomb group silencing complexes. *Mol Cell*. (2004b) 14: 637-646.

Waterman ML, Fischer WH, Jones KA. A thymus-specific member of the HMG protein family regulates the human T cell receptor C alpha enhancer. *Genes Dev*. (1991) 5: 656-669.

Weir, H.M., Kraulis, P.J., Hill, C.S., Raine, A.R., Laue, E.D. and Thomas, J.O. Structure of the HMG box motif in the B-domain of HMG1. *Embo J*. (1993) 12: 1311-1319.

Wisniewski JR, Hessler K, Claus P, Zechel K. Structural and functional consequences of mutations within the hydrophobic cores of the HMG1-box domain of the Chironomus high-mobility-group protein 1a. *Eur J Biochem*. (1997) 243: 151-159.

Wolffe AP, Hayes JJ. Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Res*. (1999) 27: 711-720.

Wolpert L, Beddington R, Brockes J, Jessel T, Lawrence P, Meyerowitz E. *Biologie du Développement : les grands principes*, p 128. (1998). Ed Dunod.

Wong J, Patterson D, Imhof A, Guschin D, Shi YB, Wolffe AP. Distinct requirements for chromatin assembly in transcriptional repression by thyroid hormone receptor and histone deacetylase. *EMBO J*. (1998) 17: 520-534.

Wright JM, Dixon GH. Induction by torsional stress of an altered DNA conformation 5' upstream of the gene for a high mobility group protein from trout and specific binding to flanking sequences by the gene product HMG-T. *Biochemistry*. (1988) 27: 576-581.

X

Xiao H, Sandaltzopoulos R, Wang HM, Hamiche A, Ranallo R, Lee KM, Fu D, Wu C. Dual functions of largest NURF subunit NURF301 in nucleosome sliding and transcription factor interactions. *Mol Cell*. (2001) 8: 531-543.

Xu, Y., Yang, W., Wu, J. and Shi, Y. (2002) Solution structure of the first HMG box domain in human upstream binding factor. *Biochemistry*. (2002) 41: 5415-5420.

Y

Yamamoto Y, Girard F, Bello B, Affolter M, Gehring WJ. The cramped gene of *Drosophila* is a member of the Polycomb-group, and interacts with mus209, the gene encoding Proliferating Cell Nuclear Antigen. *Development*. (1997) 124: 3385-3394.

Z

Zappavigna V, Falciola L, Helmer-Citterich M, Mavilio F, Bianchi ME. HMG1 interacts with HOX proteins and enhances their DNA binding and transcriptional activation. *EMBO J.* (1996) 15: 4981-4991.

Zhimulev I. Communication personnelle. (2004). Institut de Cytologie et génétique. Académie des Sciences. Novosibirsk, Russie.

Zink B, Paro R. In vivo binding pattern of a trans-regulator of homoeotic genes in *Drosophila melanogaster*. *Nature.* (1989) 337: 468-471.

Zink B, Engstrom Y, Gehring WJ, Paro R. Direct interaction of the Polycomb protein with Antennapedia regulatory sequences in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *EMBO J.* (1991) 10: 153-162.

Zraly CB, Marena DR, Nanchal R, Cavalli G, Muchardt C, Dingwall AK. SNR1 is an essential subunit in a subset of *Drosophila* brm complexes, targeting specific functions during development. *Dev Biol.* (2003) 253: 291-308.

Zwilling S, Konig H, Wirth T. High mobility group protein 2 functionally interacts with the POU domains of octamer transcription factors. *EMBO J.* (1995) 14: 1198-1208.

Résumé

Chez les organismes pluricellulaires, la prolifération, la différenciation ou encore la mort des cellules reposent en partie sur l'activation et la répression de gènes spécifiques. Les profils d'expressions géniques ainsi mis en place sont maintenus d'une génération cellulaire à l'autre par des mécanismes épigénétiques stables qui altèrent la structure de la chromatine au niveau des gènes cibles. Les protéines des groupes Polycomb (PcG) et Trithorax (TrxG) établissent une mémoire cellulaire au cours des mitoses en maintenant l'état transcriptionnel de nombreux gènes par une réorganisation de la structure chromatinienne. Les protéines PcG maintiennent la répression des gènes cibles en créant des domaines chromatinien compacts où l'ADN est peu accessible. Les protéines TrxG assurent le maintien de l'activation des gènes en bloquant la propagation des complexes PcG et en déplaçant les nucléosomes. Chez la drosophile, ces protéines agissent au sein de complexes multimériques qui se lient à la chromatine au niveau de modules communs appelés modules de mémoire cellulaire (CMM). Les PcG et TrxG régulent l'expression de nombreux gènes dont les plus étudiés sont les gènes homéotiques. Aujourd'hui, si les différents acteurs de la mémoire cellulaire commencent à être bien connus, plusieurs questions restent posées. Quels sont les moyens de recruter spécifiquement les PcG et TrxG sur leurs cibles ? Quels sont les mécanismes moléculaires qui permettent le maintien de cette mémoire ? Quels sont les gènes cibles ? Est-ce que les mécanismes d'action que nous étudions au niveau des gènes homéotiques sont communs à l'ensemble des gènes régulés par les PcG et TrxG ?

Notre équipe travaille sur une protéine à boîte HMG de drosophile : DSP1 (Dorsal Switch Protein 1). L'étude d'un mutant nul *dsp1¹* a montré que la protéine intervient dans la régulation des gènes homéotiques. Par ailleurs, des études d'interactions génétiques et des expériences de digestion à la DNase I montrent que DSP1 est un facteur de remodelage de la chromatine qui agit suivant le locus considéré en synergie avec les protéines des groupes PcG ou TrxG. DSP1 fait donc partie des protéines qui participent à la mémoire cellulaire.

Le travail de thèse que nous présentons ici a pour objectif la recherche des gènes cibles de DSP1 et du rôle de cette protéine dans la régulation de l'expression de ces gènes. Nous avons identifié des cibles préférentielles de DSP1 sur l'ensemble du génome par la technique d'immunoprécipitation de la chromatine pontée (ChIP). Nous avons étudié le rôle de DSP1 sur l'une de ces cibles, le CMM *Fab-7* dont l'activité régule le gène homéotique *Ultrabithorax*. Au cours de cette étude nous montrons par des expériences de transgénèse que DSP1 est indispensable au fonctionnement du CMM. Le recrutement des protéines PcG et TrxG sur les CMM reste mal connu. La fixation de DSP1 sur le CMM *Fab-7* est essentielle au recrutement des PcG. Ainsi nous montrons pour la première fois que DSP1 est un recruteur précoce de ces protéines suivant le locus considéré au cours de l'embryogenèse. Au contraire, nous montrons que DSP1 intervient tardivement dans l'activation du gène homéotique *Sex combs reduced*. Dans ce cas, la protéine n'est essentielle qu'au cours de la vie larvaire. Enfin, nous montrons que DSP1 régule l'expression du gène de segmentation *knirps* et est impliquée dans l'établissement de son profil d'expression plutôt que dans son maintien.

Les protéines des groupes Polycomb (PcG) et Trithorax (TrxG) établissent une mémoire cellulaire en maintenant l'état transcriptionnel de nombreux gènes par un remodelage de la chromatine. Chez la drosophile, ces protéines agissent au sein de complexes multimériques qui se lient à des unités fonctionnelles appelées Modules de Mémoire Cellulaire (CMM). Quels sont les gènes cibles des protéines PcG/TrxG ? Quels sont les moyens de recruter spécifiquement ces protéines ? Sont deux questions auxquelles nous avons voulu répondre. Notre équipe travaille sur une protéine à boîtes HMG de drosophile : DSP1. L'objectif du travail que nous présentons ici est de rechercher des gènes cibles de DSP1 et son rôle dans la régulation de l'expression de ces gènes. Plusieurs cibles ont été identifiées par la technique d'immunoprécipitation de la chromatine pontée (ChIP). Nous avons étudié le rôle de DSP1 sur le CMM *Fab-7* qui régule le gène *Ultrabithorax*. Nous montrons par des expériences de transgénèse que la fixation de DSP1 est indispensable à l'activité du CMM. Par ailleurs, nous montrons pour la première fois que DSP1 est un recruteur précoce des protéines PcG. Nous montrons également que DSP1 intervient en tant que protéine du groupe TrxG dans l'activation du gène *Sex combs reduced*. Dans ce cas, DSP1 est essentielle au cours de la vie larvaire. Enfin, nous montrons que DSP1 régule l'expression du gène *knirps* et participe à l'établissement de son profil d'expression plutôt qu'à son maintien.

Mapping DNA target sites of DSP1 protein in *Drosophila melanogaster*

The Polycomb (PcG) and Trithorax (TrxG) proteins maintain the memory of pre-established transcription patterns by remodeling chromatin structure. In *Drosophila*, PcG and TrxG complexes maintain expression of their target genes via fixation to DNA sequences termed cellular memory modules (CMMs). What are the target genes of the PcG and TrxG proteins? What are the mechanisms of recruitment of these proteins on CMMs? We tried to respond to these points. DSP1 (Dorsal Switch Protein 1) is a *Drosophila* HMGB (High mobility group)-like protein, which acts as a TrxG or PcG protein depending on the locus considered. In the present study, we attempted to characterize DSP1 target genes and functions in cellular memory. Using chromatin immunoprecipitation experiments (ChIP), we identify several DSP1 target genes. Here we show that DSP1 binds to a sequence present within the regulatory region of the *Abdominal-B* gene, termed *Fab-7*. We report, using a transgenic line for *Fab-7* regulatory element, that DSP1 binding is essential for CMM activity. We show for the first time that binding of DSP1 to *Fab-7* CMM is important for the recruitment of PcG proteins. Moreover, we report that DSP1 acts as a TrxG protein in expression maintenance of the homoeotic gene *Sex combs reduced*. In this case, DSP1 is essential during larval development. Lastly, we show that DSP1 is also involved in the regulation of the *knirps* gap gene and discuss of its function in initiation of *knirps* expression.

Mots clés : Développement – *Drosophila melanogaster* – DSP1 - Immunoprécipitation de la chromatine pontée – Mémoire cellulaire – Polycomb – Protéine HMG – Trithorax.

Centre de Biophysique Moléculaire. CNRS UPR 4301. Rue C. Sadron, 45071Orléans, France