



HAL
open science

Analyse d'interactions Hox/Cofacteur à l'échelle super-résolutive et contrôle transcriptionnel de l'autophagie chez la drosophile

Solène Vanderperre

► **To cite this version:**

Solène Vanderperre. Analyse d'interactions Hox/Cofacteur à l'échelle super-résolutive et contrôle transcriptionnel de l'autophagie chez la drosophile. Biologie moléculaire. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSEN048 . tel-03099347

HAL Id: tel-03099347

<https://theses.hal.science/tel-03099347>

Submitted on 6 Jan 2021

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.



Numéro National de Thèse : 2020LYSEN048

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée par
l'Ecole Normale Supérieure de Lyon

Ecole Doctorale ED N°340
Nom complet Ecole Doctorale
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire (BMIC)

Discipline : Sciences de la vie et de la santé

Soutenue publiquement le 25/09/2020, par :
Solène VANDERPERRE

**Analyse d'interactions Hox/Cofacteur à l'échelle
super-résolutive et contrôle transcriptionnel de
l'autophagie chez la Drosophile**

Devant le jury composé de :

DOSTATNI, Nathalie, Professeure, DR, Institut Curie	Rapporteure
LAGHA, Mounia, DR, Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier	Rapporteure
MOLLEREAU, Bertrand, Professeur, DR, ENSL LBMC,	Examinateur
GIACOMELLO, Marta, Chercheure, Université de Padova, Italie	Examinatrice
PLACE, Christophe, CRCN, ENSL Laboratoire de Physique	Examinateur
MERABET, Samir, DR, Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon	Directeur de thèse

Numéro nationale de thèse : 2020LYSEN048

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée par

L'Ecole Normale Supérieure de Lyon

Ecole Doctorale ED340

Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire (BMIC)

Discipline : Science de la vie et de la santé

Soutenue publiquement le 25/09/2020 par :

Solène VANDERPERRE



***ANALYSE D'INTERACTIONS
HOX/COFACTEUR A L'ECHELLE SUPER-
RESOLUTIVE ET CONTROLE
TRANSCRIPTIONNEL DE L'AUTOPHAGIE
CHEZ LA DROSOPHILE***



Membres du Jury :

DOSTATNI Nathalie (Professeure, DR, Institut Curie, rapporteure)

LAGHA Mounia (DR, IGMM, Montpellier, rapporteure).

MOLLEREAU Bertrand (Professeur, DR, ENSL LBMC, examinateur)

GIACOMELLO Marta (Chercheure, Université de Padova, examinatrice)

PLACE Christophe (CRCN, ENSL, Laboratoire de Physique, examinateur)

MERABET Samir (DR, IGFL, Lyon, Directeur de Thèse)



RESUME

La régulation transcriptionnelle est le sujet principal de nombreuses recherches et est un mécanisme indispensable pour assurer les fonctions cellulaires de tout organisme. Les avancées technologiques dans le monde de la microscopie ouvrent de nouvelles opportunités pour visualiser différentes étapes de ce mécanisme. Notamment les dynamiques et la localisation d'un FT à l'échelle super-résolutive. Cependant, un unique FT n'est pas suffisant pour réguler finement l'activation ou la répression de la transcription d'un gène. En effet, différents complexes de FT coopèrent pour atteindre une telle précision de régulation. La visualisation de la fixation d'un complexe (binaire) sur sa séquence régulatrice cible serait donc un atout pour mieux déchiffrer la régulation transcriptionnelle.

La première partie de mon travail de Thèse a consisté à mettre en place des outils permettant de visualiser en microscopie confocale et super-résolution, la fixation de complexes Hox-cofacteur sur des séquences ADN cibles spécifiques. Ces outils ont été appliqués pour quantifier l'enrichissement de différents complexes Hox/Exd au niveau d'un enhancer connu (appelé *fkh250*) du gène cible *forkhead* (*fkh*) dans les glandes salivaires de la larve de drosophile. J'ai combiné la méthode de BiFC (confocale) ou BiFC-PALM (super-résolution) et le système ParB/*INT* pour visualiser simultanément les complexes Hox/Exd et l'enhancer *fkh250*, respectivement.

Mes analyses confirment un enrichissement spécifique des complexes Hox/Exd sur les différents types d'enhancer *fkh250*. Surtout, des résultats préliminaires indiquent la possibilité de quantifier le nombre exact de complexes Hox/Exd fixés sur l'enhancer *fkh250* à l'échelle super-résolutive.

La deuxième partie de mon travail de thèse concerne l'analyse d'une nouvelle interaction entre les protéines Hox avec la Lamine C (LamC) pour une répression transcriptionnelle active des gènes liés à l'autophagie (*atg*) dans le corps gras de la larve de drosophile. Ce travail a permis de révéler un profil de co-expression typique des protéines Hox et de la LamC, au sein du noyau par imagerie confocal « lightning » et l'importance de contrôler le positionnement des loci génomiques pour une régulation fine de la transcription.

Key words : Régulation de la transcription, glandes salivaires, corps gras, drosophile, microscopie Lightning, BiFC, microscopie PALM (BiFC-PALM), organisation nucléaire, protéines Hox, gènes de l'autophagie (*Atg*).

ABSTRACT

Transcriptional regulation is essential for all cellular functions and is the subject of a number of studies. Technological advances in the field of microscopy open new opportunities to visualize different steps of this mechanism. In particular, it allows visualizing individual TFs at the super resolution scale *in vivo*. However, an isolated TF is not sufficient to tightly regulate the activation or repression of a target gene. Indeed, different complexes need to cooperate to achieve this level of accurate control. The observation of binary protein-protein interactions bound on a specific DNA sequence would be an asset to decipher the complex mechanism of transcription.

The first part of my thesis project consisted to establish the tools allowing the visualization of different Hox-cofactor complexes on a specific target sequence, at confocal resolution and super-resolution. These tools were applied to quantify a specific enrichment of Hox/Exd complexes on a well characterized enhancer called *fkf250*. This enhancer is regulating the expression of a *Drosophila* salivary gland gene named *forkhead (fkf)*. I combined Bimolecular Fluorescent Complementation (BiFC) (confocal resolution) or BiFC-PALM (super-resolution) with the ParB/*INT* system to simultaneously detect Hox/Exd complexes bound to the *fkf250* enhancer, respectively.

My results confirm a specific enrichment of Hox/Exd complexes on several *fkf250* enhancers. Moreover, my preliminary results show the possibility to perform bi-colour PALM for revealing in the same nucleus the Hox/Exd complexes and its target DNA sequences.

The second part of my project revealed a new interaction between Hox proteins and a nuclear matrix component, the Lamin C (LamC), in the context of transcriptional repression of autophagy related genes (*Atg*) in *Drosophila* larval fat body. This work revealed a typical profile of co-expression of Hox and LamC in *Drosophila* fat body nuclei. This profile was imaged through confocal Lightning microscopy. These results also revealed the importance of genomic loci positioning for the fine control of transcription.

Key words : Transcription regulation, salivary glands, fat bodies, *Drosophila*, Lightning microscopy, BiFC, PALM microscopy (BiFC-PALM), nuclear organization, Hox proteins, autophagy genes (*Atg*).

REMERCIEMENTS

Quatre ans de recherches (voire cinq) résumées en 200 pages. Chose que je n'aurais pas accompli sans le soutien et l'aide de ma famille et des collègues devenus amis ☺. Je vous remercie tous, vraiment. Voilà, ça sera tout...

... Ah bon (ah oui ?!, dédicace à mon chéri) ?! Il faut détailler un peu plus ? Alors on y va. (Désolée, blague pourrie, il faut bien rester soi-même).

Je commencerai par mon chéri, sans qui je n'aurais pas eu la possibilité de focaliser toute mon attention sur MA THEEEEEEEEESE. Merci pour ton soutien moral quand je commençais à en avoir marre des analyses, des analyses et aussi des analyses. Tu as toujours été aux petits soins : ciorbe (cu smantana !!) ; ghiveci ; chiftete ; suc de piersici ; piept de porc ; Vandor etc. Merci aussi pour tes massages et les promenades dans le parc (enfin, plutôt promenade pour toi et manuscrit dans l'herbe pour moi !). C'est vraiment grâce à tous ces gestes quotidiens que j'ai pu finir cette THEEEEEEEEESE dans les temps et sans trop de stress ;) Multumesc frumos, te aimesc.

Merci Papa et Maman et toute la GRANDE famille pour vos pensées pleines de courage que vous m'avez transmises tout au long de la rédaction mais aussi pendant ces quatre dernières années intenses de ma vie ! (Promis je ne travaillerai plus jamais pendant les vacances !). Un merci spécial à toi, Maman car tu as pris le temps de lire TOUTE, eh oui !, je dis bien TOUTE mon Introduction pour démasquer les dernières coquilles uniquement visibles sous tes yeux aguëris.

Ensuite, merci Samir pour ton énergie, ta bonne humeur et ta pédagogie (qui finalement, me semble être une chose assez rare chez les PI !). Tu m'as toujours mis la bonne pression sans me stresser. Ça me permettait de remettre la machine en route quand les choses commençaient à stagner. Ah oui, et merci pour la Clairette et le pain/fromage traditionnel pendant les repas de labo ! Enfin, merci de m'avoir confié ce projet focalisé sur la microscopie parce que c'est vraiment ce que je recherchais.

Merci Marilynne pour toutes ces heures de brainstorming sur les Figures du papier. On a réussi !!! Vive le FISH !! Tu es bien plus qu'un membre de l'équipe pour moi, tu es vraiment une personne super, attentionnée toujours là pour aider en cas de besoins. On peut vraiment compter sur toi. Merci pour ta bonne humeur aussi ☺ J'ai aussi passé des supers moments à MiFoBio avec toi et tout le MiFoBio wonder group. Notamment Elodie, toi aussi tu m'as beaucoup aidée pendant ces quatre ans. Il s'en sera passé des choses avec ce microscope ! Peut-être que quand je partirai ça ira mieux, ah ah ! Il y a une étrange corrélation entre mon arrivée et le début des problèmes successifs. En tout cas, bravo pour ta gestion parce que c'était bien la ***de. Dans le Wonder group il y avait aussi Christophe. Les heures à l'Elyra passaient beaucoup plus vite quand tu étais là. En plus, tu étais toujours là pour me dire, à 11h13 : « c'est le moment où tu commences à avoir froid » et ensuite à 11h32 : « tu as faim, non ? ». En tout cas on a bien rigolé ! Et merci pour ton positivisme, tout va toujours bien, c'est génial.

Merci à tout le reste de l'équipe (et anciens membres) : Rachel, Guillaume, Jonathan, Yun-Long, Fred, Françoise, Agnès (tu rigoles tout le temps, j'adore ! Dommage que tu n'ais pas pu rester plus longtemps...), Sylvie (heureusement que j'ai réussi à retrouver ce livre d'Origami, je m'en serais trop voulu sinon... Pareil pour toi, on t'aurait bien gardé dans l'équipe plus longtemps !).

Enfin, vive le groupe SM♥FL ! Merci Rachel, Guillaume, Jo, Théo, Jessika, Vince pour toutes les soirées jeux et la soirée d'anniversaire de Rachel (I'm 25 !!! I'm 25 !!!). C'était vraiment super ces 4 ans (ou moins) avec vous. Et j'espère que ça continuera comme ça même après la thèse !

Special thanks to Rachouchon and Guillaume. The fly room was a real pleasure with you around (and the music : « Solène, what do we play next ? » « All I know is Muse, Coldplay and Imagine Dragons, so play whatever you want ! ... »). Sorry Guillaume for my lack of ideas. Rachel, I'll never forget the day of the bungee jumping, it was so funny ! And you can be sure that I'll never forget that you will be 25 years old for the rest of your life :D Guillaume, thank you for your smart jokes and « jeux de mots » (« Guillaume, passe moi un tube stp », réponse : « La bohèèèèemeee, La bohèèèèemeee... », I think this was one of the first). And Jo, stop with this song ! I could say a lot more about everything but I think I should stop and just say that it was really great to have all of you, and specially Rachou, Guillaume and Jonathan during this chapter of my life. I know I'm not the best person to keep in touch, but even if I don't send news, it doesn't mean I'm not thinking about you, don't forget that. And Rachou, I'll always be your Pomperre :)

Et biensûr, un merci général à toutes les personnes de l'IGFL (équipe administrative, Chérif, Christian, Michel et l'équipe sécurité !). Cet institut est un concentré de bonnes personnes ☺

MERCI A TOUS
THANK YOU EVERYONE !

LISTE DES ABBREVIATIONS

AbdA : Abdominal-A

AbdB : Abdominal B

AD : Domaine d'activation

Antp : Antennapedia

AP : Antéro-postérieur

ARNg : ARN guides

ARNi : ARN interférence

ARNnc : ARN non codants

ARNPI : ARN polymerase I

ARNPII : ARN polymérase II

ARNPIII : ARN polymérase III

BD : Domaine de liaison à l'ADN

BiFC : Complémentation de Fluorescence Bimoléculaire

BiLC : Complémentation de Luminescence Bimoléculaire

BRET : Transfert d'énergie par bioluminescence

BX-C : complexe bithorax

COMBO-FISH : combinatorial oligonucleotide FISH

CRISPR : clustered regularly interspaced short palindromic repeats

Dfd : Deformed

DH : Double-hybride

DHFR : Réductase dihydrofolate

En : Engrailed

eve : even-skipped

Exd : Extradenticule

FISH : Fluorescence In Situ Hybridization

Fkh : forkhead

FRET : Transfert d'énergie par fluorescence

FT : Facteur de Transcription

GAF : facteur GAGA

GFP : protéine fluorescente verte

GSs : Granules de stress

H-B-H : hélice-boucle-hélice

HD : homéodomaine

HILO : illumination en feuillet optique hautement incliné et laminé

H-T-H : hélice-tour-hélice

Hth : Homothorax

HX : Hexapeptide

IPPs : Interactions protéine-protéine

LADs : Lamina Associated Domains

LamC : Lamine C

lncARN : longs ARN non-codants

MCP : MS2 coat protein

MET : Microscopie Electronique à Transmission

NPCs : pores nucléaires

OA : Oral-aboral

ON : Ouverture Numérique

PA-FPs : protéines fluorescentes photo-activables

PA-GFP : GFP photo-activable

PAINT : Point Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography

PALM : microscopie de localisation par photo-activation

PcG : Polycomb Group
PCP : PP7 coat protein
PF : Protéine fluorescente
PLA : Ligature de proximité
PREs : Eléments de réponse aux PcG
PSF : Point Spread Function
RESOLFT : REversible Saturable Optical Fluorescence Transitions
RIDs : Régions Intrinsèquement Désordonnées
ROS : espèces réactives de l'oxygène
rs : photo-réversibles
Scr : Sex comb reduced
SIM : microscopie par illumination structurée
SLiMs : Short Linear Motifs
smFISH : hybridation *in situ* de molécules d'ARN uniques
SMLM : microscopie de localisation
SNs : Speckles nucléaires
SNR : rapport signal sur bruit
sptPALM : single particle tracking PALM
SR : super-résolution
SSIM : SIM saturé
STED : microscopie à épuisement d'émission stimulée
STORM : microscopie optique stochastique de reconstruction
svb : shavenbaby
TADs : Domaines Topologiquement Associés
TCs : territoires chromosomiques
TIRF : fluorescence par réflexion interne totale

TSS : Site d'initiation de la transcription

Ubx : Ultrabithorax

VC : partie C-terminale de la Vénus

VN : partie N-terminale de la Vénus

YFP : protéine fluorescente jaune

SOMMAIRE

	1
RESUME	3
ABSTRACT	4
REMERCIEMENTS	5
LISTE DES ABBREVIATIONS	8
SOMMAIRE	12
CHAPITRE 1	15
Introduction	15
I. Régulation de l'expression génique par les facteurs de transcription	15
I.1. Promoteurs et enhanceurs transcriptionnels	15
I.1.1. Les promoteurs	15
I.1.2. Les enhanceurs transcriptionnels	17
I.1.2.1 Enhanceosomes Versus Billboards	18
I.1.2.2 Une régulation à distance	19
I.1.2.3 Concentration et affinité des facteurs de transcription sur leurs sites de fixation	23
I.2 Les facteurs de transcription	26
I.2.1. Les familles de facteurs de transcription	27
I.2.1.1. Les facteurs de transcription à doigt de zinc	27
I.2.1.2. Le motif hélice-tour-hélice (HTH)	27
I.2.1.3 La glissière à leucine et domaines basiques de liaison à l'ADN	28
I.2.2. L'action des facteurs de transcription sur la transcription	29
I.2.3 Répartition des facteurs de transcription dans l'environnement nucléaire	30
I.2.3.1. Séparation de phase et condensats transcriptionnels	30
I.2.3.2. D'autres domaines nucléaires contiennent des FT	32
I.3 Les interactomes sont la base de processus moléculaires multiples et variés	35
I.3.1 Les interactomes : généralités	35
I.3.1.1. Cartes des réseaux d'interactions protéine-protéine	36
I.3.1.2. Prédications à large échelle	37
I.3.2 Détection des interactions protéine-protéine in vivo	38
I.3.2.1. Les tests par complémentation de fragments protéiques (CFPs) : généralités	38
I.3.2.2. Transfert d'énergie entre protéines fluorescentes ou bioluminescentes (FRET/BRET)	41
I.3.2.3 Méthodes pour marquer les protéines avoisinantes avec la biotine	42
I.3.2.4 Essai de ligature de proximité (PLA)	44
Tableau récapitulatif de techniques de détection des IPPs	45
II. Les protéines Hox comme modèle d'étude de facteur de transcription	46
II.1. Les différentes fonctions des protéines Hox	46
II.1.1. Patterning des axes longitudinaux : des cnidaires à l'homme	46
II.1.2. Les autres fonctions des protéines Hox	48
II.2. Différents types de gènes cibles	52
II.2.3. Propriété de liaison à l'ADN des protéines Hox	53
II.2.3.1. Fixation monomérique des protéines Hox	53
II.2.3.2. Fixation à l'ADN avec les cofacteurs TALE	54
II.2.4. Les autres cofacteurs des protéines Hox	60

II.2.4.1. Les protéines Hox en partenariat avec la machinerie transcriptionnelle	60
II.2.4.2. Les protéines Hox en proche relation avec les régulateurs de la chromatine	61
II.2.4.3. Les cofacteurs modificateurs des protéines Hox	61
II.2.4.4. Les petits motifs comme plateforme de régulation des interactions	62
II.2.4.5. Recrutement de molécules non-protéiques par les protéines Hox	63
III. La microscopie pour une meilleure visualisation des processus de régulation génique	64
III.1 La microscopie super-résolution: un outil indispensable pour dépasser la limite de diffraction	64
III.1.1 Le principe de la microscopie super-résolution	65
III.1.2. Les méthodes de SR les plus utilisées : STED, SIM, SMLM	67
III.1.2.1. Stimulated-emission depletion microscopy (STED)	67
III.1.2.2. Microscopie par illumination structurée (SIM)	70
III.1.2.3. Single-molecule localization microscopy	73
III.2. La microscopie au service de la compréhension du génome et de sa régulation	82
III.2.1. L'organisation nucléaire à l'échelle super-résolutive	82
III.2.1.1. Le repliement de la chromatine et les régions chromosomiques à l'échelle super-résolutive	83
III.2.1.2. Les domaines topologiquement associés (TADs)	85
III.2.1.3. La périphérie nucléaire et les domaines associés à la lamina (LADs)	89
III.3.2. La microscopie comme outil de visualisation des loci génomiques et de la transcription	94
III.3.2.1. Observation des loci génomiques à l'échelle super-résolutive	94
III.3.3. La régulation de la transcription en images	99
III.3.4. La microscopie super-résolution pour visualiser les IPPs	102
III.3.4.1. Single-molecule localization microscopy (SMLM) multi-couleurs	102
III.3.4.2. Une combinaison entre microscopie PALM et BiFC : la BiFC-PALM	103
CHAPITRE 2	107
Resultats	107
I. Visualisation des complexes Hox/Exd sur le locus génomique <i>fkh</i> : résolution confocale (Lightning)	107
I.1. Visualisation de l'enrichissement des complexes Hox/Exd sur le gène <i>fkh</i> : FISH	108
I.2. Visualisation de l'enrichissement des complexes Hox/Exd sur l'enhancer <i>fkh250</i> : système ParB/INT	110
II. Visualisation des complexes Hox/Exd sur l'enhancer <i>fkh250</i> à l'échelle super-résolutive	112
II.1. Observation de la protéine Hox Ubx au sein des noyaux de glandes salivaires, en microscopie PALM	114
II.2. Observation des complexes Ubx/Exd au sein des noyaux de glandes salivaires, en microscopie PALM	115
II.3. Observation des complexes Scr/Exd sur l'enhancer <i>fkh250</i> à l'échelle super-résolutive	117
Matériels et Méthodes	120
CHAPITRE 3	129
Manuscrit : <i>Hox and Lamin-C interact in a nuclear ring to repress autophagy in the Drosophila fat body</i>	130
Abstract	130
Introduction	131
Results	132

Discussion	137
Materials and methods	139
Figure legends	145
Figures	149
Références	159
CHAPITRE 4	162
<i>Discussions et Perspectives</i>	162
I. Déciffrer et visualiser la régulation de la transcription par un complexe protéique sur ses séquences cibles cis-régulatrices	162
I.1. Quantification de l'enrichissement de complexes binaires sur des séquences cis-régulatrices cibles au sein d'un échantillon épais	163
I.1.1. Une nouvelle méthode pour visualiser et quantifier des interactions protéine-protéine sur leur séquence génomique cible	163
I.1.1.1. En résolution confocale	163
I.1.1.2. A l'échelle super-résolutive	164
II.2. Expression endogène et microscopie super-résolution	167
II.3. Observation simultanée du locus génomique et de la transcription associée.	169
II. Les complexes Hox/LamC et la répression de l'autophagie dans les corps gras de drosophile	170
CHAPITRE 5	174
<i>Annexes et Données Supplémentaires</i>	174
I. Visualisation des complexes BiFC sur l'enhancer <i>fkh250</i> via le nanobody RFP-booster	174
II. La microscopie PALM dans l'embryon et le corps gras de drosophiles	178
III. Données supplémentaires	180
III.1. Figures supplémentaires (Résultats et Discussion)	180
III.2. Séquences pour la création des sondes FISH pour le gène <i>fkh</i>	184
III.3. Séquences des enhancers <i>fkh250</i> , <i>fkh250_{MUT}</i> et <i>fkh250_{CONS}</i>	184
III.4. Macro pour le clustering	185
IV. Article : Generation of a versatile BiFC ORFeome library for analyzing protein-protein interactions in live <i>Drosophila</i>.	188
BIBLIOGRAPHIE	189

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

I. Régulation de l'expression génique par les facteurs de transcription

I.1. Promoteurs et enhancers transcriptionnels

I.1.1. Les promoteurs

La transcription est un processus de base pour l'activité cellulaire et de manière plus générale, pour le bon fonctionnement d'un organisme entier. Ce processus se déroule en plusieurs étapes qui incluent : une décondensation du locus ciblé, un remodelage des nucléosomes, des modifications d'histones, la fixation d'enhancers et co-enhancers transcriptionnels sur des séquences régulatrices, et enfin du recrutement de la machinerie de transcription au niveau du promoteur minimal (Smale and Kadonaga, 2003). Le promoteur minimal constitue une région de l'ADN suffisante pour diriger correctement l'initiation de la transcription et également indispensable à la régulation de l'expression des gènes (Haberle and Lenhard, 2016). Une des enzymes responsables de la transcription des gènes codant pour des protéines ou pour des ARNs non-codants est appelée l'ARN polymérase II (ARNPII) (Thomas and Chiang, 2006). L'ARNPII démarre la transcription au site d'initiation de la transcription (TSS) situé au début du gène cible. Le promoteur minimal s'étend sur environ 40 paires de bases (pb) en amont et en aval du TSS (Smale and Kadonaga, 2003). Contrairement à ce qui était pensé à l'origine, le promoteur minimal n'est pas un élément universel. En effet, il existe une grande diversité de structures et de fonctions pour cette région. Certains motifs sont communément retrouvés dans les promoteurs minimaux, incluant la boîte TATA, la séquence Inr (ou initiator), le TFIIB recognition element (BRE) et le downstream promoter element (DPE) (**Figure 1**). Cependant, il est important de noter que chacun de ces éléments peut être trouvé dans certains mais pas tous les promoteurs minimaux (Butler and Kadonaga, 2002).

L'ARNPII est parfois placée sur le gène cible sans que celui-ci ne soit transcrit. Des analyses informatiques ont révélé des séquences particulières, comme les motifs GAGA ou « pause button » (PB), présentes au sein des promoteurs contenant une ARNPII en pause (Gilchrist et al., 2010) (**Figure 2**). Les motifs présents dans les fixations des facteurs de transcription (FT) représentent une syntaxe promoteurs minimaux sont suffisants pour déterminer si un gène est

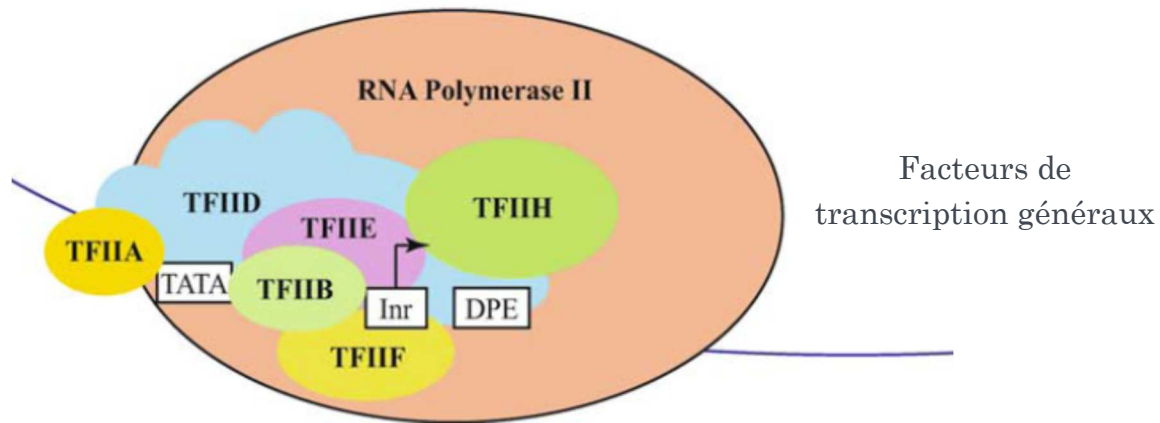


Figure 1 : La machinerie transcriptionnelle de base ou générale. L'ARNPII est situé au niveau de la séquence initiator (Inr) du promoteur minimal et recrute différents facteurs de transcription (TFIIA, TFIIB, TFIID etc.). Le promoteur contient des séquences reconnues par différents FTs, comme les séquences DPE et TATA. *Figure issue de (Thomas and Chiang, 2006).*

« pausé » ou non. Dans des cellules en culture, il a été montré que l'ARNPII en pause permet de garder les promoteurs « ouverts » en excluant ou en diminuant l'arrivée de nucléosomes inhibiteurs qui obtureraient le TSS (Gilchrist et al., 2012) (Figure 2). Dans l'embryon de drosophile et les cellules souches de mammifère, 30% de tous les gènes codant et non-codant pour des protéines sont dans cette situation (Guenther and Young, 2012). L'ARNPII est alors en pause et attend un signal externe pour initier la transcription. Ceci peut permettre d'obtenir la synchronisation d'expression génique à un instant donné. En effet, Lagha et al. (Lagha et al., 2013) ont montré que le remplacement du « paused promoter » du gène *snail* par un « moderately or nonpaused promoter » cause l'activation aléatoire de ce-dernier. L'expression normale de *snail* est responsable de l'invagination d'un millier de cellules mésodermales lors de la gastrulation. Mais sans le « paused promoter », la variabilité de l'invagination du mésoderme est accrue. Les gènes qui contiennent des fortes concentrations d'ARNPII en pause sont activés plus rapidement que les gènes qui en contiennent peu ou pas (Figure 2). Les promoteurs ont donc aussi un rôle important dans la synchronisation de l'expression des gènes (Boettiger and Levine, 2009).

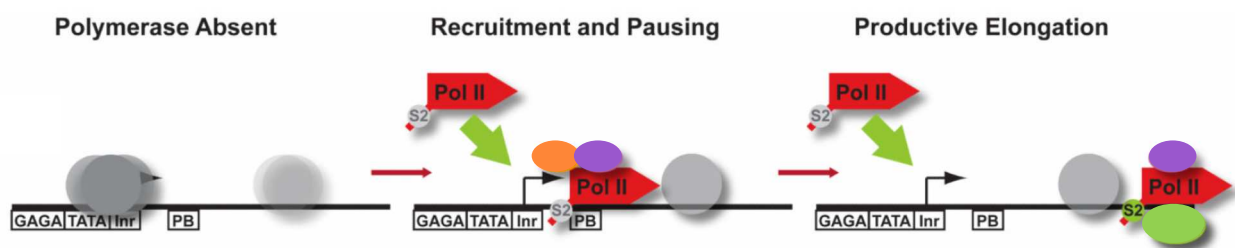


Figure 2 : Le mécanisme de pause de l'ARNPII. Les ronds gris représentent les nucléosomes et leur intensité montre le degré d'occupation. L'ARNPII est recruté sur la séquence 'Inr et est stoppée au niveau du « pause button » (PB). Lorsque la transcription est activée, l'ARNPII en pause est relâchée et commence l'élongation. En parallèle, une autre ARNPII est recrutée sur l'Inr et se met en pause à son tour. *Figure issue de (Gilchrist et al. 2010).*

Les promoteurs peuvent aussi contrôler le niveau d'expression des gènes en contrôlant le taux d'ARN synthétisé (Juven-Gershon and Kadonaga, 2010). Un haut niveau de pause d'un gène n'est pas forcément lié à sa forte expression (Gilchrist et al., 2012; Lin et al., 2011a). Au contraire, à cause du temps de pause, les gènes peu ou « non-pausés » permettent la succession plus fréquentes des complexes d'ARNPII et ainsi un taux de synthèse plus élevé que dans le cas d'un gène hautement « pausé ». Le promoteur minimal possède encore d'autres fonctions. Par exemple, chez la drosophile, il a été montré que la présence d'un promoteur minimal avec une composition spécifique le rend réactif à des enhancers distincts (Engström et al., 2007). Cela présente les promoteurs minimaux comme des acteurs important de la régulation des gènes sur de longues distances.

Les promoteurs représentent donc un premier niveau de régulation de l'expression des gènes. Cependant, ils ne sont pas les seuls acteurs de ce contrôle si *précis* et spécifique. Comme évoqué dans le dernier exemple, les promoteurs sont en relation étroite avec des séquences d'ADN appelés « enhancers ». Celles-ci ont également un grand rôle à jouer pour orchestrer l'activation ou l'inhibition spatio-temporelle des gènes.

1.1.2. Les enhancers transcriptionnels

Les enhancers permettent la production de quantités *précises* de protéines et autre produits de la transcription, et ceci au bon moment et dans la bonne cellule (Buffry et al., 2016). Les enhancers sont des modules de plusieurs centaines de pb (Maria I. Arnone and Eric H. Davidson, 1997; Simpson and Ayyar, 2008). Ces séquences sont reconnues spécifiquement par des facteurs de transcription (FT) requis pour le contrôle de l'activation ou de la répression des gènes. Le nombre et l'espacement des sites de fixation des FT représentent une syntaxe pour les régulateurs (Buffry et al., 2016). Les séquences *cis*-régulatrices sont séparées en plusieurs sous-éléments qui ont chacun leur rôle dans la régulation globale du gène cible. Ces sous-éléments sont appelés « modules régulateurs ». La définition expérimentale de tels modules repose sur la capacité de ces séquences à reproduire une fraction du domaine d'expression obtenu par la région *cis*-régulatrice complète.

La structure des enhancers est complexe, les différents modules peuvent se chevaucher de par leur position, leur expression et parfois même en partageant les sites de fixation des FT (Banerji et al., 1981). Les séquences *cis*-régulatrices peuvent se trouver en amont ou en aval du gène à réguler et ce, sur de longues distances, jusqu'à plusieurs mégabases (Mb) (Spitz, 2016). Certains modules ont des propriétés intrinsèques leur permettant de transmettre des informations de régulation, directement à la machinerie transcriptionnelle de base. La communication est assurée par les FT liés à ces modules ou par d'autres protéines

elles-mêmes ancrées à ces FT et non pas directement liées à l'ADN (Maria I. Arnone and Eric H. Davidson, 1997).

Le fonctionnement des enhanceurs est l'une des clés pour parvenir à la compréhension globale des systèmes de régulation à l'origine du développement d'organismes vivants. Plusieurs modes de fonctionnement des enhanceurs ont pu être décrits, en voici quelques exemples ci-après.

I.1.2.1 Enhanceosomes Versus Billboards

Dans le modèle « enhanceosome », les FT fixés aux enhanceurs entrent en coopération avec des cofacteurs et forment ainsi des complexes nucléoprotéiques. L'information permettant la régulation de l'expression du gène provient de l'ensemble des sites de fixation (Arnosti and Kulkarni, 2005; Merika and Thanos, 2001). Ici, chaque site de fixation est un mot, et l'ensemble des sites forment une phrase possédant une syntaxe particulière (Figure 3A).

Pour le modèle « billboard », la syntaxe est flexible. En effet, dans ce cas, les FT fixés n'agissent pas comme un complexe. Les enhanceurs sont divisés en plusieurs sous-éléments, capables de contacter la machinerie transcriptionnelle de base, pour réguler l'expression des gènes (Arnosti and Kulkarni, 2005) (Figure 3B). De nombreux régulateurs développementaux opèrent de cette façon, par exemple, l'enhancer *even-skipped stripe 2* (*eve stripe 2*). Cet enhancer de 500 pb est impliqué dans la régulation du gène *even-skipped* (*eve*) qui détermine la formation des bandes lors du développement de l'embryon de drosophile. La manipulation expérimental de cet enhancer a montré qu'il tolère une grande variété de changements dans la position des activateurs ainsi que leur identité (Arnosti et al., 1996; Small et al., 1992).

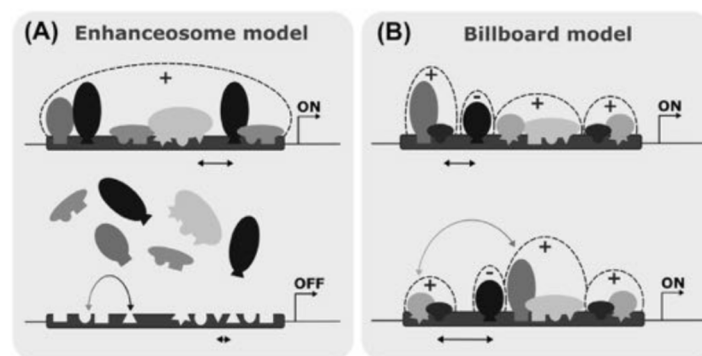


Figure 3 : Deux modèles de fonctionnalité des enhanceurs. (A) Le modèle enhanceosome propose que l'assemblage coopératif de tous les FTs sur l'enhancer est requis pour réguler la transcription. Dans ce modèle, l'information portée par tous les sites de fixation est intégrée en une seule unité pour diriger la transcription (en haut). L'espacement (flèche noire droite) et l'organisation des sites (flèche courbée) de fixation sont contraints, par conséquent, une mutation qui affecte ces paramètres abolit l'activité de l'enhancer (en bas). (B) Dans le modèle billboard, la position et l'organisation des sites est flexible. Les FTs sont toujours essentiels à la fonction de l'enhancer. Cependant, ils ne régulent pas la transcription comme une seule unité coopérative, mais plutôt comme différentes sous-unités d'information (en haut). La fonction de l'enhancer n'est pas affectée par des changements dans l'espacement (flèche noire droite) ou l'organisation des sites (flèche courbée) (en bas). *Figure issue de* (Buffry et al., 2016).

Il est probable que la plupart des régulateurs fonctionnent grâce à des mécanismes intermédiaires, qui combinent les deux modes d'action décrits précédemment.

I.1.2.2 Une régulation à distance

Des approches à l'échelle du génome entier ont montré que le génome humain est criblée d'enhancers. Le nombre estimé est compris entre 200 000 et 1 000 000 au moins (Dunham et al., 2012b). D'après les analyses du consortium ENCODE (Sanyal et al., 2012), les enhancers peuvent se trouver très loin de leur gène cible. Même pour un génome aussi compact que celui de la drosophile (*Drosophila melanogaster*), au moins 30% des interactions promoteurs/enhancers surviennent à plus de 20 kb de distance et cela même si d'autres gènes sont présents entre les deux (Ghavi-Helm et al., 2014; Kvon et al., 2014).

Le FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) et les méthodes de capture de conformation de la chromatine montrent aussi les contacts physiques à grande distance entre un enhancer distal et le promoteur cible (Andrey et al., 2013; Kagey et al., 2010; Mifsud et al., 2015; Spitz, 2016).

La régulation des gènes à distance : les modèles existants

Le modèle « facilitated tracking »

Pour atteindre le promoteur du gène cible, l'ARNPII et la machinerie transcriptionnelle associées à l'enhancer se déplacent le long de l'ADN et forment une boucle (Figure 4). Cette dernière continue de s'élargir jusqu'à ce qu'un contact stable soit établi avec le promoteur (Blackwood and Kadonaga, 1998; Hatzis and Talianidis, 2002; Wang et al., 2005; Zhu et al., 2007).

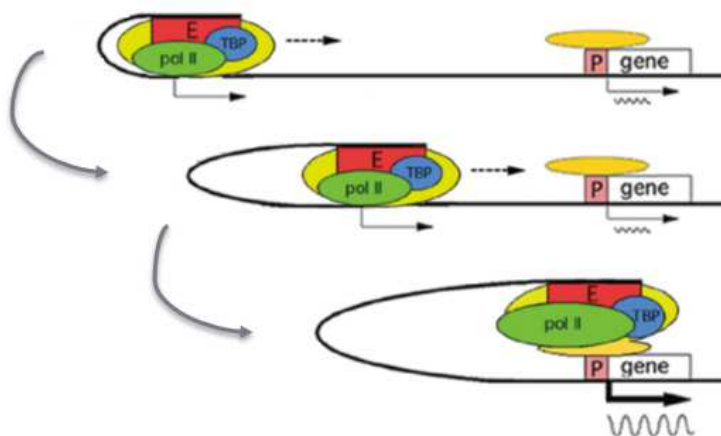


Figure 4 : Le modèle « facilitated tracking ». L'enhancer (rectangle rouge), recrute des protéines dont l'ARNPII et la protéine de fixation à la TATA-Box (TBP) pour former le complexe de transcription. Le déplacement du complexe, vers le promoteur (P) du gène, forme une boucle (ligne noire). Lorsqu'il y a contact entre enhancer et promoteur, l'ARNm est transcrit (vague). *Figure issue de (Zhu et al., 2007).*

Le modèle « looping »

Ce modèle implique une communication directe entre l'enhancer et le promoteur, ce qui permet un contact sur de grandes distances (Carullo and Day, 2019; Schoenfelder et al., 2010) (Figure 5). Avec la technique de capture de chromatine 3C, des interactions directes enhancer/promoteur impliquant le « looping » de l'ADN ont été démontrées à de nombreux loci (Dekker et al., 2002; Vakoc et al., 2005).

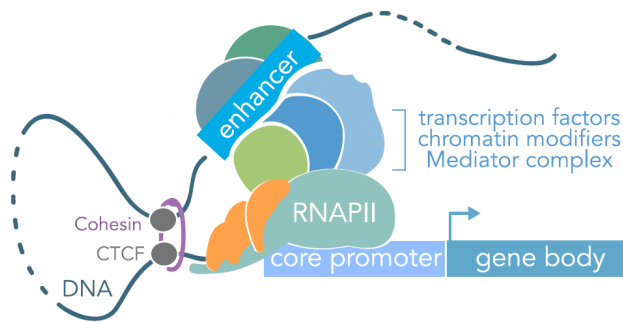


Figure 5 : Le modèle enhancer « looping ». La boucle formée suite à l'interaction enhancer-promoteur est médiée par le facteur CTCF et la cohésine (description dans la partie sur les TADs). L'interaction enhancer-promoteur favorise la fixation de facteurs de transcription, de modificateurs de la chromatine et du complexe Mediator qui favorisent le recrutement de l'ARNPII. Issue de (Carullo and Day, 2019).

Appariement des régions homologues

Des appariements entre régions homologues d'un chromosome à de longues distances sont aussi possibles. Ce phénomène a été montré entre domaines transloqués et même entre différents chromosomes (Gemkow et al., 1998; Johnston and Desplan, 2014).

La transcription est dépendante de la proximité physique entre enhancer et promoteur

La transcription est intimement liée voire dépendante du rapprochement physique entre le promoteur et l'enhancer. Par exemple, la distance entre les enhancers *eve* et le promoteur (couplé à un gène rapporteur) converge de manière continue vers un seuil précis, permettant le début de la transcription du gène cible. A cet instant, la distance seuil est égale à 340 nm environ (Chen et al., 2018). De plus, il a été montré que la transcription cesse presque instantanément lorsque le promoteur rapporteur et les enhancers *eve* sont physiquement séparés (Chen et al., 2018). Ces résultats suggèrent l'existence d'une distance enhancer/promoteur limite, probablement variable en fonction du gène régulé, qui autorise l'initiation de la transcription.

Différents types de topologies

La variation des distances enhancer-promoteur indique l'état de compaction de la chromatine. Une courbe représentant les distances moyennes entre enhancer et promoteurs montre une distribution bimodale. Le pic représentant des distances moyennes plus longues (environ 710 nm) équivaut à 87% de tous les échantillons.

L'autre pic, avec une proportion moindre, représente une distance moyenne plus petite (environ 355 nm) (Chen et al., 2018). Pour aller plus loin, des constructions rapportrices ainsi que des séquences *homie*, ont été utilisées. Ces éléments « *homie* », artificiellement intégrées dans la construction, facilitent la formation de boucles stables par appariement avec la séquence endogène correspondante (Fujioka et al., 2016). En utilisant ces constructions, il est possible de reproduire la distribution bimodale des distances enhancer-promoteur. Cependant, si la séquence *homie* est remplacée par une séquence d'ADN λ , seul le pic le plus représentatif, correspondant aux longues distances enhancer/promoteur, est maintenu. Ces dernières reflètent probablement les noyaux avec une conformation ouverte, non-appariée. A l'inverse, les plus petites distances reflètent les noyaux avec une topologie d'appariement *homie-homie*. Il est important de noter que l'activité transcriptionnelle est entièrement comprise dans le pic des courtes distances et est abolie si l'appariement est absent (séquences *homie* remplacées par une séquence λ). Cependant, dans cette conformation, le promoteur rapporteur est actif seulement dans la moitié des cas. Le rapprochement facilité du promoteur et de l'enhancer par les séquences *homie* n'est pas suffisant pour amorcer la transcriton (Chen et al., 2018).

Ici, trois conformations enhancer-promoteur ont été caractérisées : une dans laquelle l'enhancer distal et le promoteur ne sont pas appariés, une autre où ils sont proches mais sans initiation de la transcription et enfin, une dernière où ils sont proches et semblent être stabilisés par la transcription. Dans le deuxième cas, d'autres acteurs, comme les protéines structurales, permettraient de compléter l'interaction entre le promoteur et l'enhancer sur de plus ou moins longues distances (1-150 kb) et stabiliser le complexe. Cette compaction est aussi en concordance avec l'hypothèse que la séparation de phase pourrait contribuer à l'assemblage des « RNAPII factories » ou des « noyaux (hubs) » de transcription au sein de domaines topologiquement associés (TADs) (Hnisz et al., 2017; Sexton et al., 2007). De récentes expériences de capture de chromatine (Hi-C), sur des embryons de *Drosophile*, soutiennent aussi l'effet de la transcription sur l'organisation locale de la chromatine, par exemple pour sa compaction (Hug et al., 2017).

L'interaction enhancer-promoteur est un mécanisme essentiel à l'expression des gènes et par conséquent indispensable au bon déroulement des programmes développementaux. En effet, l'interaction ectopique entre enhancer et promoteur et/ou la manipulation de la topologie de la chromatine peut altérer le déroulement des programmes développementaux (Deng et al., 2014; Franke et al., 2016).

Chromosome kissing

Les chromosomes eukaryotes sont organisés en territoires distincts dans le noyau des cellules. Ils sont très rarement entremêlés. Il faut tout de même noter que plusieurs contacts entre différents loci ont été observés et ce phénomène est nommé chromosome kissing (Kleckner and Weiner, 1993) (Figure 6). Ces contacts sont établis en fonction des caractéristiques spécifiques de chaque locus, et pourraient jouer un rôle important dans la régulation de l'expression génique. Des études chez la *Drosophile*, ont mis en évidence que ce type d'interaction a lieu dans la majorité des tissus (Bosco, 2012; McKee, 2004).

Le kissing des chromosomes est impliqué dans le « silencing » de chromosomes entiers, de domaines ou encore de loci individuels (Cavalli, 2007). Le groupe de protéines Polycomb (PcG) contribue à ce type de « silencing ». Les protéines PcG sont cruciales pour le développement, elles sont responsables du « silencing » de centaines de gènes chez les vertébrés, les mouches et les plantes (Guitton and Berger, 2005; Schuettengruber et al., 2007). Chez la *Drosophile*, le « silencing » dépendant des protéines PcG repose sur leur fixation à des séquences d'ADN spécifiques appelées : éléments de réponse aux PcG (*PREs*). Le regroupement de ces protéines sur leur *PREs* forme des ensembles appelés « corps PcG ». En plus de réguler le promoteur adjacent, les *PREs* peuvent parfois réprimer la transcription à de très longues distances. Chez la *Drosophile*, le complexe *bithorax* (acteur de la segmentation d'une partie des segments thoraciques et abdominaux) contient deux *PREs* particuliers, capables d'induire des événements de kissing : *Mcp* (Vazquez et al., 2006) et *Fab-7* (Bantignies et al., 2003). Les contacts ont lieu dans les « corps PcG ». Ces *PREs* renforcent le « silencing » PcG-dépendant, sont basés sur des homologies de séquence et requièrent la présence des protéines PcG ainsi que des composants de la machinerie ARN interférence (ARNi) (Grimaud et al., 2006).

Un autre exemple important de kissing entre chromosomes implique les deux chromosomes X des cellules de mammifère femelle. Dans ce cas, le

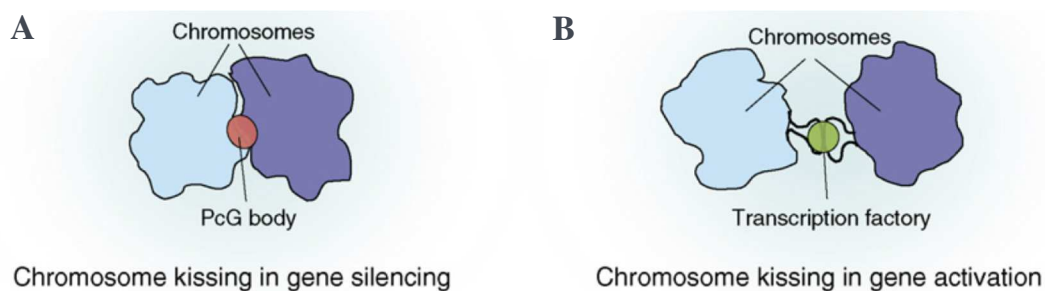


Figure 6 : Le modèle de « chromosome kissing ». Des gènes individuels peuvent être impliqués dans le phénomène de kissing. (A) In *Drosophila*, les protéines PcG peuvent induire le kissing, ce qui renforce le silencing du gène. (B) Des gènes actifs ou en cours d'activation induisent aussi le kissing de chromosomes. Dans ce cas, le kissing peut se produire au niveau de différentes structures comme les entreprises de transcription (foci d'ARNPII), des speckles de splicing et les sites CTCF. Issue de (Cavalli, 2007).

« silencing » de l'un des chromosomes X est atteint via des modifications d'histone et l'intervention des protéines PcG (Heard, 2005). Lorsque le processus d'inactivation a lieu, dans un nombre significatif de noyaux, les deux copies X sont transitoirement en étroite proximité.

I.1.2.3 Concentration et affinité des facteurs de transcription sur leurs sites de fixation

Les FT se fixent spécifiquement sur leurs séquences cibles avec des affinités différentes. Il semblerait que les sites de forte affinité soient peu fréquemment utilisés dans la nature. D'après de récents travaux, les FT ont plutôt tendance à se fixer à des sites de faible affinité (Crocker et al., 2016). En effet, ces sites sont répartis à l'échelle du génome. Par exemple, dans le génome de la levure, de nombreuses interactions de faible affinité, en lien avec une transcription active, ont été révélées par Tanay et al (Tanay, 2006). Le locus Pax6, chez la souris, est aussi contrôlé par des sites de faible affinité (Rowan et al., 2010). De même, chez la Drosophile, l'enhancer du gène *shavenbaby* (*svb*) contient des sites de faible affinité pour le FT Ultrabithorax (Ubx) (Crocker et al., 2015). Les sites de faible affinité s'avèrent être un mécanisme général de la régulation de l'expression des gènes chez les Eukaryotes (Crocker et al., 2016).

Sites de fixation de faible affinité

Des études sur des cellules en culture, ont démontré que les FT fixés sur l'ADN, se dissocient du site de liaison en quelques secondes (Chen et al., 2014; Liu et al., 2014b; Normanno et al., 2015; Tsai et al., 2017). Les sites de faible affinité sont essentiels à la spécificité de FT apparentés qui possèdent des séquences de reconnaissance similaires (Crocker et al., 2015a; Crocker et al., 2016; Farley et al., 2016; Rowan et al., 2010; Tanay, 2006).

Microenvironnements : une forte concentration de FT pour une transcription plus efficace

Un exemple représentatif de ce phénomène est celui de l'enhancer *svb* évoqué précédemment. Au sein d'un microenvironnement nucléaire avec une haute concentration du FT Ubx, ce-dernier utilise des sites de faible affinité présents sur le locus *svb* et sur les enhancers connexes. Une relation inverse existe entre l'affinité pour l'enhancer et la concentration d'Ubx requise pour l'activation de la transcription. Plus la concentration d'Ubx est forte, moins l'affinité est grande et inversement (Crocker et al., 2015a; Tsai et al., 2017).

Des cofacteurs peuvent stabiliser les interactions de faibles affinités par interaction coopérative et structurale avec les FT. C'est le cas avec Ubx, où deux cofacteurs clés, appelés Extradenticule (Exd) (Pbx chez les Mammifères) et

Homothorax (Hth) (Meis chez les Mammifères), peuvent se trouver enrichis à proximité des enhanceurs reconnus par Ubx, et ce, malgré le fait qu'ils ne colocalisent pas forcément avec Ubx à l'intérieur du noyau (Lelli et al., 2011; Rieckhof et al., 1997; Ryoo and Mann, 1999; Slattery et al., 2011; Tsai et al., 2017).

Une transcription initiée par des enhanceurs cofacteurs-dépendants requièrent des microenvironnements qui contiennent une forte concentration de FT ainsi que des cofacteurs associés. La forte concentration locale permettrait de compenser l'inefficacité cinétique (faible affinité), en favorisant une fixation à l'ADN plus fréquente et des interactions coopératives au sein de ces domaines (Farley et al., 2016). Ainsi, les microenvironnements pourraient être une caractéristique générale de la régulation de la transcription chez les Eukaryotes.

La distribution de Ubx avec des zones de fortes concentrations a été montrée dans les noyaux d'embryons de *Drosophile* expansés. En général, les FT sont localisés dans des régions accessibles qui possèdent des niveaux élevés d'activité transcriptionnelle. Cependant, tous les FT ne partagent pas les mêmes régions sub-nucléaires. En effet, d'autres FT comme *Engrailed* (En), *Abdominal-A* (AbdA) ou encore *Evenskipped* (Eve) ont aussi des distributions hétérogènes, avec des concentrations plus ou moins fortes. De plus, dans les noyaux où ils sont co-exprimés, ils ne se chevauchent que partiellement (En) avec Ubx ou sont exclus les uns des autres (AbdA et Eve). Les distributions en microenvironnements ne résultent donc pas d'un mécanisme partagé qui limite la localisation des FT dans les mêmes régions sub-nucléaires (Tsai et al., 2017).

D'un point de vue épigénétique, Ubx chevauche seulement partiellement les régions contenant de l'ADN activement transcrit, c'est-à-dire un ADN chargé avec l'ARNPII ou montrant des marques actives comme H3K4me3. Les séquences d'ADN riches en marques répressives comme H3K27me3 ne colocalisent presque pas avec Ubx. La localisation de Ubx n'est donc pas restreinte à des régions accessibles par les FT ou à des régions de forte activité transcriptionnelle.

Les foci de Ubx sont produits par des événements de fixations répétées et spécifiques. Ceci indique que Ubx se concentre et reste au sein de régions nucléaires bien spécifiques. Il faut également noter que cette localisation dépend de la capacité de liaison à l'ADN de la protéine Hox. En effet, une protéine Ubx mutée dans l'homéodomaine (N51A), présente une distribution homogène dans le noyau (Tsai et al., 2017).

Les microenvironnements de FT corrélerent avec des loci transcriptionnellement actifs. Par exemple, les enhanceurs *svb* colocalisent avec les sites où *svb* est transcrit. Cette corrélation n'est pas dépendante de la localisation sur le chromosome. En effet, Tsai et al (Tsai et al., 2017) ont montré qu'un enhancer rapporteur (*lacZ*) inséré sur le chromosome 3 colocalise souvent avec le

locus *svb* endogène sur le chromosome X, contrairement au site de transcription de forkhead (chromosome 3). Ces expériences indiquent que des enhancers apparentés se rassemblent dans des microenvironnements transcriptionnels, indépendamment de leur emplacement chromosomique. Les microenvironnements semblent être des domaines relativement stables générés par des dynamiques rapides de molécules individuelles. Ce système de régulation est compatible avec celui du modèle de séparation de phase (Hnisz et al., 2017) puisque différents microenvironnements réunissent différents types de protéines dans le noyau.

Redondance des enhancers

Certaines séquences *cis*-régulatrices ont des expressions similaires ou qui chevauchent celles d'autres enhancers du même gène. Ces séquences sont appelées « shadow enhancers » (Barolo, 2012). Ils ont été décrits pour la première fois par Hong, Hendrix et Levine en 2008 (Hong et al., 2008). L'enhancer proximal se trouve être le l'enhancer principal et l'enhancer distal, le « shadow enhancer » ou enhancer secondaire. Lors du développement du mésoderme chez la Drosophile, de nombreux loci contiennent un enhancer et trois, quatre, parfois cinq enhancers secondaires (Cannavò et al., 2016). Les hubs transcriptionnels de multi-enhancers confèrent une certaine robustesse phénotypique (Tsai et al., 2019). La nature transitoire des interactions et l'utilisation de sites de fixation multiples assurent une régulation de la transcription efficace et spécifique en fonction de conditions environnementales variables. Cette stratégie paraît être appropriée et utilisée par de nombreux enhancers développementaux (Frankel et al., 2012; Perry et al., 2010).

Par exemple, l'enhancer *svb* décrit précédemment, profite de ce mécanisme. La longue région *cis*-régulatrice contient de multiples enhancers dont les profils d'expression se chevauchent. La délétion d'un de ces enhancers n'a pas mené à une dérégulation développementale claire, seule une réduction de la production de transcrits a été observée. Cependant, dans le cas où les embryons ont subi un stress, par exemple un choc thermique, des défauts développementaux sont apparus ainsi qu'une réduction plus importante de l'activité transcriptionnelle (Tsai et al., 2019). Le même type de phénomène avait déjà été montré précédemment lors de la délétion de « shadow enhancers » (Hong et al., 2008).

Les super-enhancers

Lorsqu'ils ont été découverts, les super-enhancers ont été décrits comme une nouvelle classe de régions régulatrices regroupées en clusters. En général, ils présentent une forte concentration de sites de fixation pour les FT (**Figure 7A**) généraux Oct4, Sox2, Nanog et particulièrement le coenhancer Mediator (Med1) (**Figure 7B**). Ils portent aussi des marques de chromatine active, comme H3K27ac

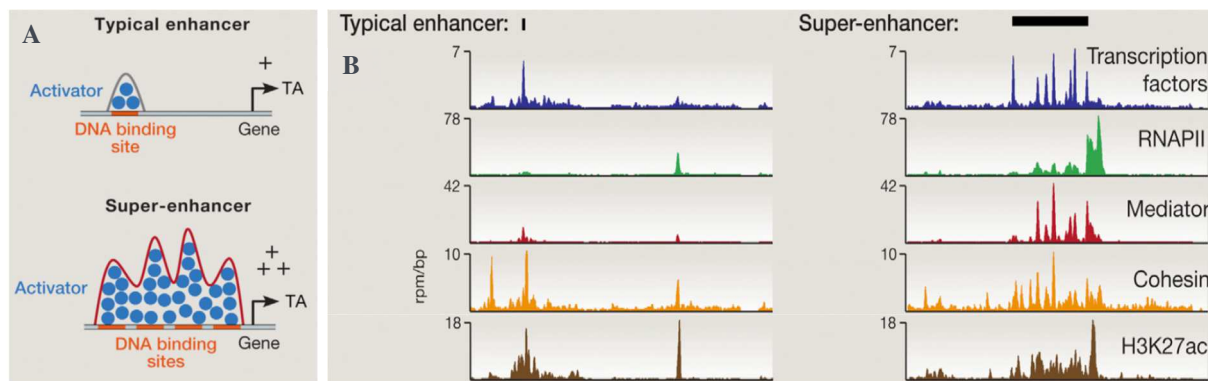


Figure 7 : Modèles et caractéristiques des enhancers « typiques » et des super-enhancer. (A) Modèle de coopération. La forte densité de régulateurs transcriptionnels (activators) contribue à une activité transcriptionnelle plus importante et une sensibilité accrue des super-enhancers à la concentration d'activateurs. *Schéma adapté de* (Lovén et al., 2013). (B) Profils ChIP-seq pour différents acteurs de la régulation transcriptionnelle. Une plus grande concentration de tous ces acteurs est retrouvée au niveau des super-enhancers. *Figure issue de* (Hnisz et al., 2013).

(Hnisz et al., 2013; Whyte et al., 2013) et sont décrits dans de nombreux types cellulaires différents (Qian et al., 2014; Siersbæk et al., 2014; Vahedi et al., 2015).

Le knockdown d'une sous-unité du Mediator complex affecte le niveau d'expression de gènes adjacents aux super-enhancers. De même pour le knockdown de Oct4 (Kagey et al., 2010; Whyte et al., 2013). La description des super-enhancers comme nouvelle classe de régions régulatrices est débattue. Ils pourraient simplement être la somme de celles-ci.

Dans le cas du locus de l' α -globuline, chez les Mammifères, chaque élément du cluster d'enhancers paraît agir indépendamment de manière cumulative plutôt que coopérative (Hay et al., 2016). Certains éléments semblent ne pas fonctionner comme un enhancer.

Le développement des organismes mais aussi son fonctionnement correct est basé sur l'expression fine de chaque gène. Promoteurs et enhancers sont indispensables au bon déroulement de ces processus. Ils reposent sur la fixation de facteurs de transcriptions spécifiques qui autorisent l'activation ou la répression avec une précision spatio-temporelle presque infaillible. Les FT sont donc des éléments de base de ce mécanisme.

1.2 Les facteurs de transcription

Comme la plupart des protéines, les FT sont constitués de chaînes d'acides-aminés (a.a) repliées dans une conformation tri-dimensionnelle (3D) spécifique. Une partie de la structure reconnaît et permet la fixation à une séquence d'ADN spécifique. Nombre de FT possèdent aussi des régions « désordonnées », flexibles qui ne forment pas de structure 3D rigide. Et cela pourrait aider au contrôle de l'activité des gènes (Clark et al., 2018).

Ces FT sont communément classifiés en différentes familles. La manière dont les FT se fixent à l'ADN ou causent la dimérisation du facteur, souvent essentielle à la reconnaissance de l'ADN, est à la base de leur classification (Latchman, 1993).

1.2.1. Les familles de facteurs de transcription

1.2.1.1. Les facteurs de transcription à doigt de zinc

Le domaine de liaison à l'ADN de cette famille de FT contient neuf répétitions d'une séquence de 30 a.a (Miller et al., 1985). Chacune de ces répétitions contient deux paires de cystéine et histidine qui entourent un unique atome de zinc, le nom « doigt de zinc » provient de la structure qui en résulte. L'extrémité de ces doigts établit un contact direct avec le grand sillon de l'ADN, en alternance sur un côté ou l'autre de la double hélice (Klug and Rhodes, 1987) (Figure 8A).

Le premier FT à avoir été purifié s'avère être un membre de cette famille. Le facteur de transcription III A (TFIIIA) joue un rôle critique dans la transcription des gènes à ARN ribosomiaux 5S par l'ARN polymérase III (ARNPIII) (Sakonju and Brown, 1982). Un autre exemple de FT à doigt de zinc est la protéine Krüppel (Kr) chez la Drosophile. Elle est exprimée dans un domaine restreint pendant le stade blastoderme de l'embryogenèse et est impliquée dans le contrôle du développement des segments abdominaux et thoraciques de la mouche (Klug and Rhodes, 1987; Licht et al., 1990). Une mutation ponctuelle dans l'un des motifs à doigt de zinc de Kr entraîne l'apparition d'une mouche mutante identique à celle obtenue lors de la délétion complète du gène (Redemann et al., 1988). L'aptitude à fixer le zinc est donc essentielle pour la fixation à l'ADN et par conséquent au bon fonctionnement du FT.

1.2.1.2. Le motif hélice-tour-hélice (HTH)

Les protéines à homéodomaine (HD) sont conservées au cours de l'évolution puisqu'elles sont présentes dans l'intégralité du règne Eukaryote, des organismes unicellulaires jusqu'aux plantes, champignons et animaux (Bürglin and Affolter, 2016). Les FT à HD représentent 15 à 30% de tous les FT, qui régulent des processus aussi divers que la formation des axes (Pick and Heffer, 2012), la maintenance des cellules souches (Dolzblasz et al., 2016) ou encore les réponses métaboliques (Tao et al., 2016; Wu et al., 2011). La plupart des FT à HD se fixent à l'ADN pour contrôler l'activité d'autres gènes.

L'HD contient un motif hélice-tour-hélice (HTH) (Figure 8D), motif déjà présent dans certaines recombinaisons bactériennes (Laughon and Scott, 1984; Scott et al., 1989). A l'intérieur de ce motif, une hélice- α est suivie par un tour- α et de

nouveau par une hélice- α (Laughon and Scott, 1984). La première hélice- α est disposée en travers du grand sillon de l'ADN, alors que la deuxième, connue comme l'hélice de reconnaissance, se positionne partiellement dans le grand sillon et établit des contacts séquence-spécifiques avec l'ADN (Ptashne, 1986).

L'exemple le plus pertinent est celui des protéines Hox. Elles sont codées par les gènes homéotiques et jouent un rôle critique dans le développement embryonnaire mais aussi dans l'organogenèse chez l'adulte. Ce sont des FT dont l'HD est fortement conservée entre les différents gènes (Bobola and Merabet, 2017a; Latchman, 1990). Des motifs HTH sont aussi retrouvés dans les protéines de régulation transcriptionnelle du type sexuel chez la Levure (Nasmyth and Haering, 2005; Shepherd et al., 1984), dans diverses protéines d'Amphibiens et de Mammifères (Akam, 1989) et chez les Plantes comme l'Antirrhinum (Sommer et al., 1990).

I.2.1.3 La glissière à leucine et domaines basiques de liaison à l'ADN

Dans cette structure, des résidus de leucine sont espacés de sept a.a à l'intérieur d'une hélice- α . Les leucines apparaissent tous les deux tours du même côté de l'hélice. La glissière ainsi formée, facilite la dimérisation de protéines par interdigitation de deux hélices différentes contenant ces répétitions de leucines. De la dimérisation, résulte une conformation qui expose une région adjacente, souvent basique, qui peut interagir directement avec l'ADN acide (Gentz et al., 1989; Landschulz et al., 1989) (**Figure 8B**). La glissière à leucine est présente dans différents FT comme le FT spécifique du foie C/EBP, le facteur GCN4 chez la Levure, et les protéines proto-oncogènes Myc, Fos et Jun (Abel and Maniatis, 1989; Landschulz et al., 1989).

Le domaine basique est associé à une région adjacente qui forme une structure en hélice-boucle-hélice (HBH) (Murre et al., 1989). Comme la glissière à leucine, la conformation HBH cause une dimérisation des protéines permettant la liaison à l'ADN par le domaine basique adjacent (Murre et al., 1989; Prendergast and Ziff, 1989) (**Figure 8C**). Ces domaines sont identifiés dans un certain nombre de régulateurs transcriptionnels comme la protéine régulatrice MyoD1 (Tapscott et al., 1988) et la protéine Daughterless chez la Drosophile (Caudy et al., 1988).

Il existe donc différentes structures de fixation à l'ADN séquence-spécifique. Plusieurs d'entre elles sont communes à des FT distincts. Des différences dans la séquence précise du motif dans chaque facteur contrôlent la spécificité de la séquence d'ADN à laquelle il se lie. Bien que la fixation à l'ADN soit un prérequis nécessaire à un FT pour affecter la transcription, ce n'est pas suffisant. Ces facteurs doivent également interagir avec d'autres facteurs ou l'ARNPII elle-même pour moduler la transcription.

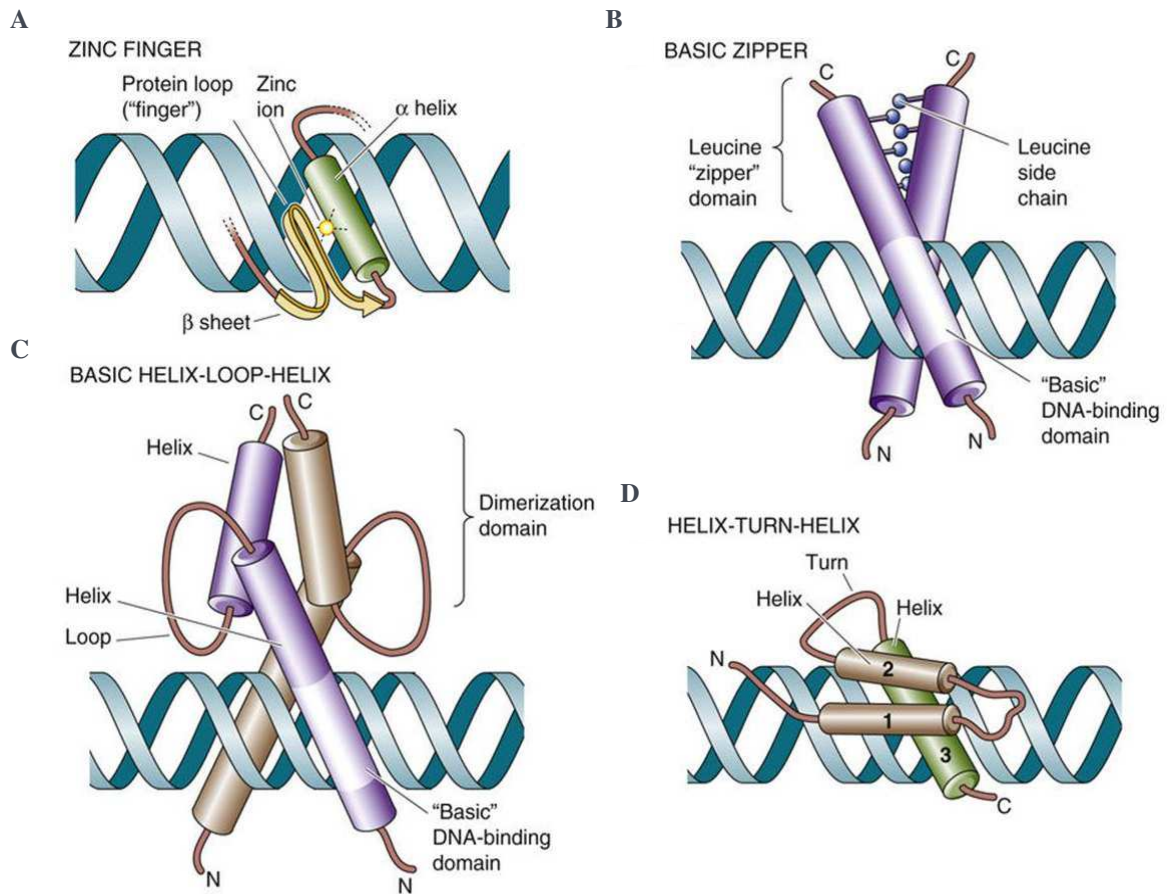


Figure 8 : Les différents types de FTs. (A) Le schéma représente la fixation d'un FT à doigt de zinc sur le grand sillon de l'ADN. (B) La glissière à leucine est formée par dimérisation de deux FTs et interagit avec l'ADN via le domaine basique. (C) Le domaine basique s'associe à une région adjacente et forme une structure hélice-boucle-hélice. (D) La structure hélice-tour-hélice est présente dans les FT à homéodomaine. La première hélice est placée dans le grand sillon et la deuxième hélice est appelée hélice de reconnaissance. *Issue de Medical Physiology, 3rd Edition Transcription Factors.*

I.2.2. L'action des facteurs de transcription sur la transcription

En général, les domaines d'activation sont distincts des régions de liaison à l'ADN. Ceci indique que les FT ont une structure modulaire avec différentes régions qui ont chacune des activités indépendantes. Les membres de la famille des récepteurs des hormones thyroïdiennes (Evans, 1988), où des régions distinctes de la protéine induisent la liaison à l'ADN, l'activation transcriptionnelle et la fixation de l'hormone, illustrent ce mécanisme.

Une comparaison des domaines d'activation des FT montre qu'ils ne partagent pas d'homologie de séquence, mais qu'ils possèdent une grande proportion d'a.a acides (Ptashne, 1986; Sigler, 1988). Ces domaines d'activation acides semblent, le plus souvent, s'associer à d'autres FT pour former un complexe transcriptionnel basal, qui interagit avec l'ARNPII par la suite (Latchman, 1993). Ces a.a sont arrangés pour former une hélice- α amphipathique qui peut activer la

transcription lorsqu'elle est liée au domaine de fixation à l'ADN. Si les a.a du domaine d'activation du FT GAL4 de la Levure, sont placés de façon arbitraire, il n'est plus en mesure d'activer la transcription. Cela montre l'importance de l'arrangement précis de ces a.a acides. Bien que ces domaines d'activation acides se retrouvent de la Levure à l'Homme, d'autres domaines d'activation non-acidiques, sont aussi décrits.

Pour faciliter la transcription, les FT peuvent aussi interagir directement avec l'ARN polymerase, comme évoqué précédemment (Sigler, 1988), ou avec d'autres facteurs de fixation à l'ADN comme le facteur de liaison à la TATA box TFIID (Sawadogo and Roeder, 1985). Le FT GAL4 ou le FT ATF (chez les Mammifères), engagent un changement de conformation de TFIID déjà fixé. De cette façon, plutôt que de contacter uniquement la TATA box, ils contactent aussi le site d'initiation de la transcription (Horikoshi et al., 1988).

Une mutation dans un FT peut se traduire par un manque de spécificité dans l'expression génique menant à l'apparition d'une maladie. Par exemple, des mutations dans le FT Pit-1, appartenant à la famille de FT POU, provoquent l'échec du développement de la glande pituitaire et une faible expression du gène codant pour l'hormone de croissance. Le nanisme résulte de ce défaut développemental (Radovick et al., 1992). Dans le cas de l'hémophilie B, le FT nécessaire à la transcription du gène facteur IX est présent, mais n'est pas capable de se fixer au promoteur du gène entraînant un échec de la transcription du gène (Crossley and Brownlee, 1990).

1.2.3 Répartition des facteurs de transcription dans l'environnement nucléaire

Pour assurer leur fonction de régulateur de gènes efficacement, les FT sont souvent regroupés dans des zones délimitées du noyau, comme les usines à transcription. Ces regroupements de FT pourraient se former par l'interaction de leurs régions désordonnées, ce phénomène s'appelle séparation de phase.

1.2.3.1. Séparation de phase et condensats transcriptionnels

De récentes études suggèrent qu'un processus coopératif de séparation de phase, qui implique des interactions multivalentes entre les FT, cofacteurs et ARNPII, pourrait être à l'origine de l'assemblage de ces condensats ou clusters de ces facteurs sur les éléments enhancers spécifiques (Boija et al., 2018; Chong et al., 2018; Hnisz et al., 2017; Tsai et al., 2017). De plus, la présence de tels clusters sur un locus génomique, peut prédire la présence d'un élément enhancer (Berman et al., 2002; Markstein et al., 2002; Rajewsky et al., 2002).

La formation de ces condensats transcriptionnels implique des protéines caractérisées par la présence de régions intrinsèquement désordonnées (RIDs) dans leur structure (Boija et al., 2018; Cho et al., 2018; Sabari et al., 2018) (**Figure 9**). A l'aide de modèles informatiques et de reconstitutions *in vivo*, Shrinivas et al. (Shrinivas et al., 2019) ont montré que la condensation de FT et coenhancers sur des éléments d'ADN, est basée sur la valence des sites de fixation des FT, leur densité et leur spécificité. L'étude révèle un seuil précis du nombre de sites de fixation qui permet la formation des clusters. En effet, en modulant l'affinité, le nombre ou la densité d'interactions FT-ADN et la force des interactions RID-RID, cela impacte la formation des condensats. Pour qu'ils se forment, l'interaction FT-ADN est aussi importante que les faibles interactions multivalentes entre RIDs. Des analyses bioinformatiques à l'échelle du génome montrent que les caractéristiques des RID marquent des régions activatrices connues. La formation de ces clusters transcriptionnels pourrait contribuer à l'organisation et aux interactions génomiques à longue portée (Shrinivas et al., 2019).

Il est aussi important de noter que les sites de faible affinité peuvent contribuer à l'échaffaudage des condensats transcriptionnels, s'ils sont en assez grand nombre et densité. Cela supporte les travaux évoqués précédemment sur les enhancers *svb* et autres (Crocker et al., 2015a; Tsai et al., 2017). L'arrangement des microenvironnements ou « hubs » de FT, décrits précédemment, serait autorisé par le processus de séparation de phase médiée par interactions entre les domaines désorganisés des différents facteurs (Cisse et al., 2013; Furlong and Levine, 2018; Ghavi-Helm et al., 2014; Mir et al., 2017) (**Figure 9**). En revanche, les séquences d'ADN comportant un grand nombre de sites de haute affinité, distribués à faible densité locale ne correspondent pas à des régions activatrices car elles ne permettront pas la formation des condensats.

Les interactions RID-RID sont relativement peu spécifiques et les RIDs d'un même coenhancers peuvent s'assembler à différents loci. Ceci corrobore le fait que les clusters de FT prédisent souvent la localisation des enhancers actifs puisqu'un mécanisme commun régit la formation de ces derniers sur ces séquences d'ADN (Berman et al., 2002; Markstein et al., 2002; Rajewsky et al., 2002).

Ce mécanisme peut être étendu à d'autres condensats formés sur des loci génomiques spécifiques. Cela pourrait inclure les condensats dans l'organisation de l'hétérochromatine (Larson et al., 2017; Strom et al., 2017), la formation des paraspeckles contenant de longs ARN non-codants (lncARN) (Fox et al., 2018; Yamazaki et al., 2018), l'assemblage des nucléoles (Feric et al., 2016; Pederson, 2011), ou encore la répression transcriptionnelle par les protéines polycomb (Tatavosian et al., 2018). Des avancées récentes en microscopie à l'échelle nanoscopique (Li et al., 2019), pourraient donner de nouvelles informations sur la

capacité de ces condensats à former des sub-structures d'ordre supérieur comme le nucléole (Feric et al., 2016).

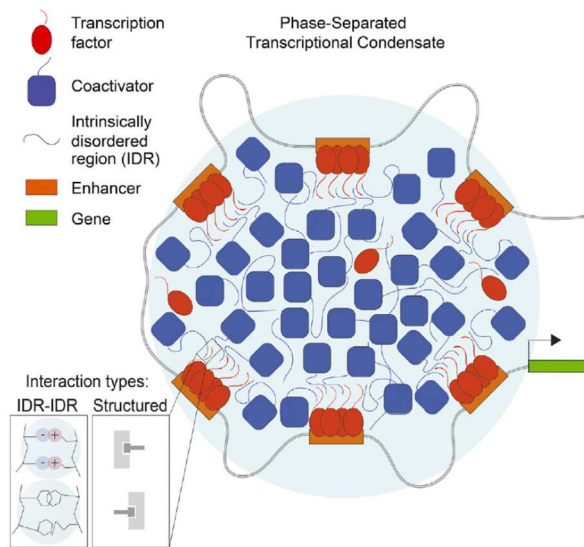


Figure 9 : Modèle de condensat transcriptionnel. Les FTs et coactivateurs forment un condensat formé par séparation de phase. Dans ce modèle, les condensats incorporent des interactions dynamiques (RID-RID) et structurées. *Issue de* (Boija et al., 2018).

I.2.3.2. D'autres domaines nucléaires contiennent des FT

Les FT sont généralement concentrés en de nombreux foci répartis au sein du nucléoplasme (Grande et al., 1997a; van Steensel et al., 1995). Ils sont localisés dans des structures diverses comme les speckles, paraspeckles, nucléoles, corps de Cajal etc. En immunofluorescence, le marquage des FT montre un profil en points, cohérent avec les descriptions précédentes (Lamond and Earnshaw, 1998; Spector, 2001).

Corps de Cajal ou corps spiralés

Certains FT comme Oct1, TFIID (p62), le récepteur aux glucocorticoïdes (RG), E2F-1 et TFIIF (RAP74), occupent des domaines de petite taille, interconnectés, à travers le nucléoplasme, en excluant les nucléoles. En plus de ce marquage pointilliste, TFIID et TFIIF sont retrouvés dans différents foci. Dans 30% des cas, Oct1 montre un large domaine (>1,5 μm), souvent localisé à proximité d'un nucléole. Dans quelques zones, les sites de transcriptions (marquage BrUTP) et ces domaines contenant différents FT se chevauchent. Cependant, dans de nombreux cas, les domaines de FT ne montrent qu'un faible marquage BrUTP ou une absence de ce-dernier et vice versa. Une grande fraction des FT analysés dans cette étude est regroupée en clusters mais n'est pas impliquée dans l'activation de la transcription. La distribution pointilliste de TFIID et TFIIF ne montre aucune relation. Sauf dans les foci contenant une haute concentration de ces deux facteurs. Ces foci sont appelés « corps spiralés » (Figure 10). Les RG et E2F-1 ne co-localisent pas non plus.

Les corps spiralés, aussi appelés corps de Cajal, sont souvent liés à la périphérie du nucléole, et sont composés de petites ribonucléoprotéines nucléaires (snRNPs, sous-unités des complexes d'épissage) et de composants du nucléole (Bohmann et al., 1995) (Figure 10). Ces différents domaines pourraient représenter des complexes d'initiation de la transcription incomplets ou des complexes inhibiteurs dont la plupart sont dépourvus de l'ARNPII. Ces clusters riches en FT peuvent aussi être des sites de stockage d'où ils peuvent être recrutés efficacement en cas de nécessité (Grande et al., 1997b).

Les FT dans le nucléole

La transcription spécifique des gènes codant pour les ARN ribosomiaux (ARNr), par l'ARN polymérase I (ARNPI), requiert au moins deux FT, le facteur se fixant en amont (UBF) et le facteur de sélectivité du promoteur (TBP/SL1) (Bell et al., 1988; Schnapp and Grummt, 1991). Des immunomarquages montrent, de façon claire, que les facteurs UBF et TBP et l'ARNPI colocalisent avec les foci de transcription présents dans le nucléole (Figure 10) de cellules en croissance active (Carmo-Fonseca et al., 1996).

Les speckles nucléaires (SNs) ou clusters de granules interchromatiniennes (IGCs)

Les speckles nucléaires sont un des corps nucléaires les plus abondants (Figure 10). Ce terme est réservé à un corps nucléaire particulier, avec une taille entre 0,3 et 3 µm et une quantité variant entre quelques uns à une dizaine (Hall et al., 2006; Spector and Lamond, 2011). Presque tous les composants protéiques contenus dans les SNs sont des facteurs impliqués dans la transcription, le processing post-transcriptionnel de l'ARN, ou l'export des ARNs. Par conséquent, leur localisation peut varier : liaison à des loci actifs, des transcrits naissants, des pré-ARN messagers (ARNm) et/ou d'autres accumulations focalisées (Chen and Belmont, 2019).

Contrairement à ce qui était postulé auparavant, la sur-représentation des protéines d'épissage au sein des SNs n'est pas confirmée par les données plus récentes. En effet, ces nouvelles informations ont révélé que les protéines les plus représentées dans les SNs jouent un rôle dans la transcription, incluant FT et facteurs de remodelage de la chromatine (Galganski et al., 2017).

Les FT dans les granules de stress

Un trait caractéristique d'un stress, au sein de cellules humaines, est l'organisation de du FT HSF1 sous forme de structures sub-nucléaires, appelées granules de stress (GSs) (Alastalo et al., 2003). HSF1 est le FT de choc thermique le plus étudié. Il répond à des températures élevées et d'autres formes de stress

induisant une dégradation des protéines (Pirkkala et al., 2001). HSF1 n'est pas le seul composant des GSs, des protéines de liaison à l'ARN et certains facteurs d'épissage ont aussi été identifiés dans ces domaines (Denegri et al., 2001; Weighardt et al., 1999).

Domaines OPT

Les FT, PTF et Oct1, activent la transcription de gènes codant pour les petits ARNs nucléaires (snARNs) et d'autres intervenant dans la maturation des ARNs. Ils se fixent à des éléments de séquence proximaux et distaux (PSEs et DSEs), présents au sein des promoteurs et activent la transcription par l'ARNPII ou l'ARNPIII (Hernandez, 1992).

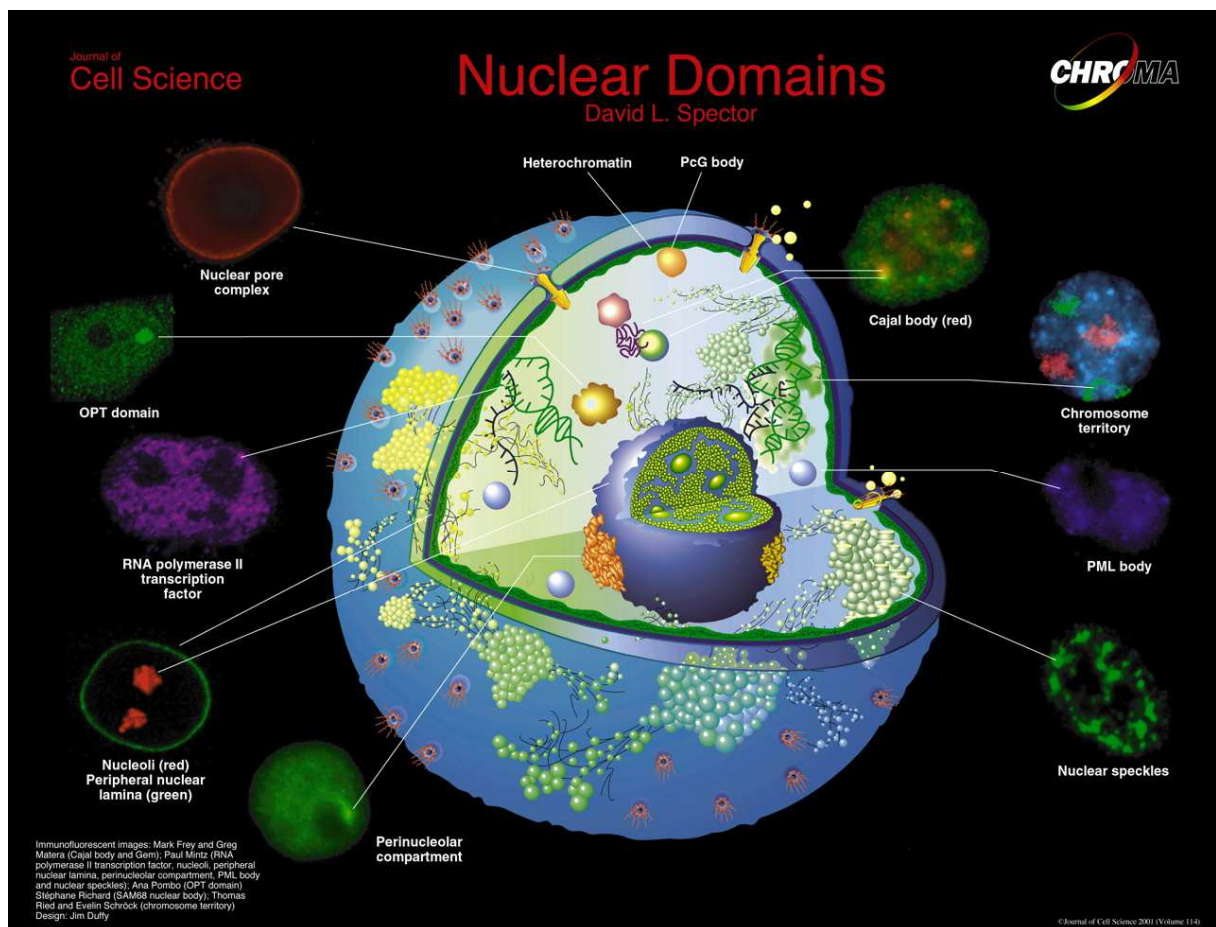


Figure 10 : Les domaines nucléaires. Ce schéma donne une vue d'ensemble des différents domaines nucléaires. Chaque domaine est associé à une image en microscopie à fluorescence. Issue de (Spector, 2001).

PTF et Oct1 sont concentrés dans des domaines de grande taille, à un certain stade du cycle cellulaire : la phase G1. Chaque domaine contient quelques usines de transcription. Ils sont appelés « domaines OPT » (Figure 10). D'autres types de FT peuvent aussi s'y ajouter, comme la protéine de fixation p53 1 (53BP1), ainsi que les polymérases. Mais aucun facteur d'épissage n'est détectable (Pombo et al., 1998).

Il est également intéressant de remarquer que ces domaines colocalisent avec le variant d'histones γ H2AX et MDC1, ce qui est une caractéristique des sites de dommage à l'ADN. Les domaines OPT sembleraient donc se former au niveau de ces sites (Harrigan et al., 2011).

Le clastosome

Dans le noyau des cellules eukaryotes, la majorité des protéines avec une courte durée de vie, est dégradée par la voie ubiquitination-protéasome (Rock et al., 1994). Dans les cellules de Mammifères, il est connu que les protéasomes sont enrichis à l'intérieur de domaines nucléaires, nommés clastosome. Le clastosome concentre les protéasomes 20S et 19S, des « ubiquitin-conjugates » et des chaperons moléculaires comme Hsp70/HSC70. Le clastosome contient aussi certains substrats du protéasome comme les FT c-Fos et c-Jun (Lafarga et al., 2002). Ces structures ont aussi été montrées plus récemment dans les neurones dopaminergiques de cerveau humain (Korzhevskii et al., 2017).

1.3 Les interactomes sont la base de processus moléculaires multiples et variés

Les cellules vivantes sont le siège de nombreux processus biologiques. Ceux-ci sont médiés par des interactions complexes entre protéines. Ces réseaux d'interaction sont appelés interactomes. L'interactome humain serait composé d'environ 130 000 interactions protéiques binaires (Venkatesan et al., 2009). Ces interactions protéine-protéine (IPPs) sont souvent connectées entre elles et sont organisées en réseaux denses et dynamiques.

1.3.1 Les interactomes : généralités

La vision de l'organisation des cellules a changé au court des ans. Auparavant cataloguée comme un sac d'enzymes, elle est maintenant considérée comme un réseau complexe d'interactions macromoléculaires (Robinson et al., 2007; Vidal et al., 2011).

La science des réseaux traite de la complexité par la simplification du système. Les composants représentent les « nœuds » et les interactions entre eux sont représentées par les « arrêtes ». Les nœuds sont des métabolites et des macromolécules comme les protéines, les ARNs ou encore des séquences génomiques, alors que les liens/arrêtes sont des interactions physiques, biochimiques et/ou fonctionnelles. Ces-dernières peuvent être détectées par différentes techniques (détaillées plus loin). Les interactomes permettent d'extraire des informations théoriques globales ou locales. Lorsque ces propriétés

sont démontrées, statistiquement différentes d'un réseau aléatoire, il est possible de revenir sur les processus biologiques initiaux et ainsi, mieux comprendre les mécanismes impliqués (Vidal et al., 2011).

I.3.1.1. Cartes des réseaux d'interactions protéine-protéine

Dans le cas des interactomes de protéines, les nœuds représentent les protéines alors que les lignes représentent des interactions physiques ou biochimiques entre deux protéines. Pour établir des cartes d'interactions à large échelle, deux méthodes dominent la science expérimentale. La cartographie d'interactions binaires est souvent effectuée à l'aide de différentes variations et améliorations de la technique du double-hybride chez la Levure (DH) (Dreze et al., 2010; Fields and Song, 1989). Le DH est basé sur une observation des FT Eukaryotes, organisés en deux domaines fonctionnels: le domaine de liaison à l'ADN (BD) et le domaine d'activation (AD) décrits précédemment (Causier, 2004; Fields and Song, 1989). Ces domaines sont physiquement séparables.

L'ADN complémentaire (ADNc) codant pour une protéine d'intérêt est fusionné au BD du FT, et l'AD est fusionné à un autre ADNc codant pour une autre protéine donnée. Les vecteurs ainsi élaborés permettent l'expression de protéines recombinantes au sein des Levures. Si les deux protéines d'intérêt interagissent dans le noyau des Levures, le BD et l'AD sont suffisamment proches pour activer la transcription du gène rapporteur. Celui-ci est sous le contrôle d'un promoteur qui contient les séquences reconnues par le BD (Figure 11).

Un des désavantages du DH est la génération de faux positifs et faux négatifs. Les faux négatifs sont des interactions non détectables dans le système « Levure ». Par exemple, certaines modifications post-traductionnelles, indispensables à l'interaction entre deux partenaires, ne sont pas possibles chez la Levure. Les faux positifs sont les IPPs qui surviennent chez la Levure, mais qui n'ont pas d'intérêt biologique.

Comme pour toutes les méthodes de détection d'IPP, la validation des partenaires identifiés par une deuxième méthode est indispensable. Les validations les plus communes sont la co-immunoprécipitation et le pull-down (Paiano et al., 2019) (Figure 11). Ce type de purification, pour isoler des complexes protéiques, est suivi d'une analyse en spectrométrie de masse (AP/MS) pour identifier les constituants de ces complexes (Charbonnier et al., 2008; Rigaut et al., 1999). Le principe général de l'AP/MS implique l'immobilisation de la protéine d'intérêt ou « appât » sur un support solide (billes d'agarose ou magnétiques), et capturer les protéines « proies » à partir d'une phase soluble, mise au contact de l'appât sur une colonne (Figure 11). Les protéines purifiées sont digérées par des protéases (trypsine) afin de générer des peptides qui sont par la suite sous-

fractionnés par chromatographie liquide à haute pression (HPLC). Ces fragments sont enfin ionisés et détectés par un spectromètre de masse (Dunham et al., 2012a).

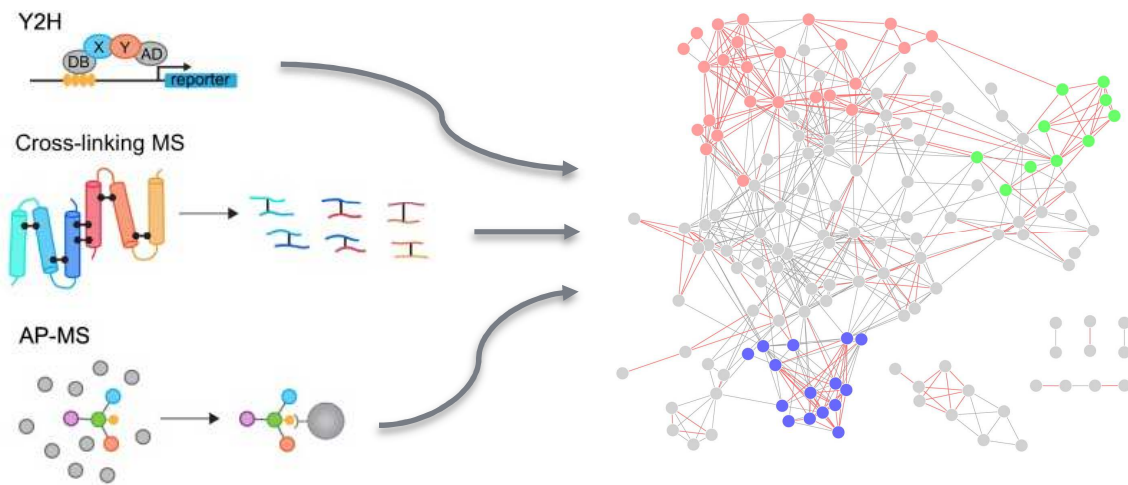


Figure 11 : Schéma de techniques communes pour analyser des IPPs. Le Y2H, le cross-linking MS et le pull-down suivi de la spectrométrie de masse sont schématisés de haut en bas. Ces différentes techniques aboutissent toute à l'établissement d'un interactome plus ou moins complexe. *Issue de* (Pires and Boxem, 2018) (à gauche) et (Lin et al., 2011b) (à droite).

Une grande partie des interactomes connus pour les organismes modèles comme, *S. cerevisiae*, *C. elegans* et *D. melanogaster*, ont été générés par la technique du DH (Giot et al., 2003; Reboul et al., 2003; Uetz et al., 2000). C'est aussi le cas pour certains interactomes chez les humains (Rual et al., 2005; Venkatesan et al., 2009).

Chez l'Homme, les maladies peuvent être perçues comme une dérégulation de réseaux cellulaires interconnectés. Par conséquent, les maladies ne peuvent être considérées comme indépendantes les unes des autres. Cette vision des choses a mené à la création de multiples cartes de réseaux de maladies. S'il existe des relations phénotypiques entre différentes maladies, ces cartes permettent d'établir des liens entre celles-ci. De telles cartes ont été construites à partir d'associations gène-maladie collectées dans une base de données appelée OMIM (Goh et al., 2007). Dans ce type d'interactomes, les nœuds représentent les maladies et un lien est créé entre deux maladies si elles partagent au moins un gène commun ou une mutation commune. Ces réseaux recourent significativement les interactomes d'IPP. Cela montre la pertinence de ces interactomes (Goh et al., 2007).

I.3.1.2. Prédictions à large échelle

Pour l'étude des interactomes à large échelle, le domaine de la bioinformatique se développe fortement. De plus en plus de logiciels de prédiction d'IPP sont en libre accès sur internet. Les méthodes de prédiction d'IPP sont réparties en plusieurs catégories : données génomiques, séquences protéiques, structures protéiques, réseaux d'IPP, expression génique et annotations de la

fonction des gènes, de leur localisation et des processus. Les prédictions d'IPPs sont presque aussi pertinentes que les données expérimentales à large échelle (von Mering et al., 2002).

Par exemple, SCINET (single-cell imputation and network construction) reconstruit l'ensemble des interactomes type-cellulaire spécifiques avec des profils d'expression de gènes cellule-unique. SCINET donne un contexte cellulaire virtuel qui permet d'interpréter des voies moléculaires et fonctionnelles. Il permet aussi de contextualiser des gènes associés à des maladies dans différents types cellulaires ou différentes conditions. De plus, il est possible d'étudier les dynamiques d'interaction au cours du développement normal ou pathologique (Mohammadi et al., 2019).

Une approche plus globale, non spécifique à l'interactome humain, utilise le machine-learning pour prédire les IPPs. Cela peut permettre de découvrir de nouvelles IPPs. Les IPPs prédites par cette méthode peuvent aussi être utiles pour déterminer des couples de protéines prioritaires pour les tests expérimentaux, et peuvent fournir des informations sur le contexte spécifique de l'IPP comme le tissu ou le phénotype. Les réseaux d'IPP découverts par des techniques bioinformatiques, suivies de validations expérimentales, peuvent être utilisés pour la prédiction de la fonction d'un gène (Mostafavi and Morris, 2012), l'identification de gènes impliqués dans une maladie (Navlakha and Kingsford, 2010) et enfin la découverte de nouveaux médicaments (Barabási et al., 2011; Sarkar and Saha, 2019).

1.3.2 Détection des interactions protéine-protéine in vivo

Les IPPs sont, par nature, dynamiques. Cela permet d'ajuster la réponse à différents stimuli et les conditions environnementales. Une légère perturbation de telles interactions peuvent avoir des conséquences majeures sur le fonctionnement cellulaire et provoquer l'apparition de phénotypes pathologiques (Vidal et al., 2011). De plus en plus de technologies émergent ou évoluent pour permettre l'identification et la caractérisation d'IPPs.

1.3.2.1. Les tests par complémentation de fragments protéiques (CFPs) : généralités

Les CFPs sont basés sur la fusion de partenaires hypothétiques à deux fragments d'une protéine rapportrice (Michnick et al., 2000). L'interaction entre l'appât et la proie réunit les deux fragments du rapporteur, assez proches pour reconstituer la conformation et l'activité d'origine de ce-dernier (Michnick et al., 2016) (**Figure 12**). Différents types de protéines sont utilisées comme rapportrices : la réductase dihydrofolate (DHFR) (Pelletier et al., 1998), la β -lactamase (Galarneau et al., 2002), la protéase TEV (Wehr et al., 2008), la protéine

fluorescente (PF) verte GFP et ses variants (Hu and Kerppola, 2003), la luciférase (Villalobos et al., 2007), etc. En fonction de la protéine utilisée, le « read-out » est différent : couleur, survie cellulaire, fluorescence etc.

La sélection du rapporteur dépend de l'objectif de l'étude et de la protéine appât. La DHFR est particulièrement utilisée pour les expériences impliquant les sélections de banque, alors que les PFs ou luminescentes sont plus adaptées pour étudier une IPP spécifique : sa localisation, ses dynamiques dans différentes conditions (inhibition, par exemple). Les PFs sont plus simples d'utilisation car le « read-out » est direct et aucun substrat n'est nécessaire (contrairement à la luminescence ou la DHFR) (Morell et al., 2009).

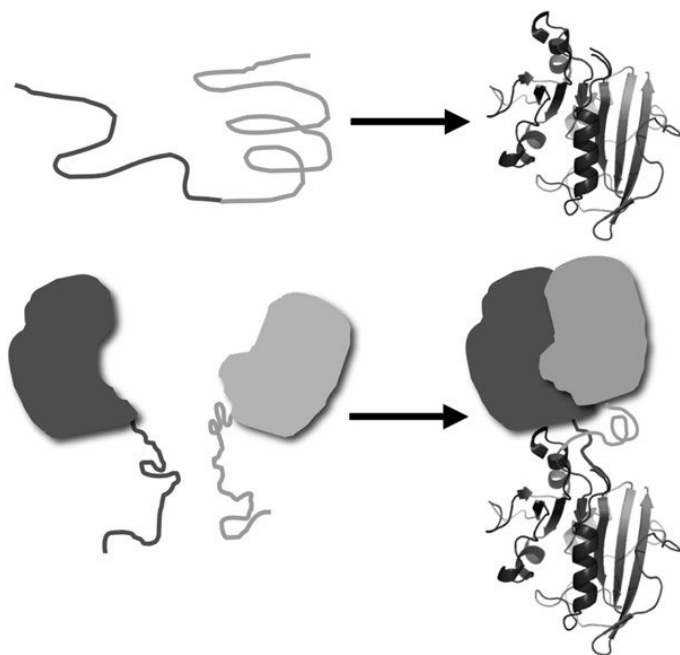


Figure 12 : Le concept de base de la complémentation par fragments protéiques. La partie supérieure représente le repliement unimoléculaire d'une protéine à partir d'un polypeptide synthétisé. La fragmentation en parties N-term et C-term permettent de fusionner chaque fragment à une protéine d'intérêt. Si ces protéines interagissent, les deux moitiés de la protéine rapportrice se replient correctement et récupèrent leur activité (panneau du bas). La protéine rapportrice peut être une enzyme comme la DHFR, la β -lactamase, la protéase TEV ou une protéine fluorescente comme la GFP. Le « read-out » est différent en fonction de la protéine rapportrice utilisée. Schéma issu de (Michnick et al., 2016).

Complémentation de Fluorescence Bimoléculaire (BiFC)

La BiFC est basée sur la capacité d'une PF à être séparée en deux fragments non fluorescents. Chaque fragment est fusionné à un des partenaires potentiels, si les deux partenaires interagissent, les deux fragments se retrouvent à proximité et reconstituent une PF fonctionnelle (Figure 13). Ce phénomène se manifeste par un signal fluorescent détectable par microscopie ou cytométrie en flux (Kerppola, 2008; Zhang et al., 2016). Les IPPs peuvent alors être visualisées en cellules vivantes ce qui permet d'observer leurs localisations en direct. La méthode est très sensible, un avantage pour détecter des interactions protéiques faibles et/ou transitoires. Les protéines de fusion peuvent être exprimées à des niveaux physiologiques/endogènes.

Cette technique est utilisée dans différents organismes modèles, simple à mettre en place et peu coûteuse. Plusieurs couples d'IPPs peuvent être détectés simultanément en combinant différentes PFs. Cette méthode est adaptée à la visualisation d'interactions binaires (Hu et al., 2002; Zhang et al., 2016).

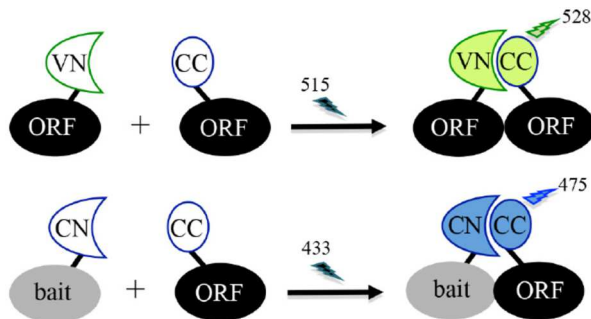


Figure 13 : Principe de la BiFC multi-couleurs. La complémentation de fluorescence est possible entre deux PFs différentes. En effet, la partie N-terminale de la Vénus (VN) peut compléter la partie C-terminale de la Céruléane (CC) (panneau du haut). Cette association émet une fluorescence verte. La partie C-terminale de la Céruléane peut aussi compléter avec sa partie N-terminale (CN) et émettre une fluorescence bleue.

Plus récemment, la BiFC est exploitée pour des « screens » à large-échelle et a révélé de nouvelles interactions chez la Levure, les Plantes et les cellules de Mammifères (Kerppola, 2008; Kerppola, 2009; Kodama and Hu, 2012). La BiFC autorise l'analyse systématique d'interactomes protéiques avec, en supplément, des informations sur la localisation subcellulaire.

La combinaison de la BiFC et du tri cellulaire par fluorescence (FACS) a permis l'identification des cofacteurs protéiques de la protéine kinase B (PKB)/Akt dans les cellules COS-1. Suite à ce screen, de nouveaux partenaires comme hFt1 ont été ajoutés à l'interactome de PKB/Akt (Remy and Michnick, 2004). Comme dans toute méthode de screen à large échelle, les candidats identifiés par un screen basé sur la BiFC, doivent être validés par des méthodes complémentaires et les bons contrôles de spécificité sont indispensables. Ce type d'approche à large échelle est aussi possible dans des modèles multicellulaires plus complexes comme l'embryon de drosophile. En effet, dans un article récemment publié, nous avons développé une librairie prête à l'emploi pour cribler des centaines de FT (450) au sein d'embryons de drosophile vivants. Avec cet outil, il est également possible de révéler des complexes trimériques potentiels grâce à la BiFC multicouleurs (Bischof et al., 2018).

La BiFC n'est pas la méthode idéale pour mesurer les dynamiques ou les changements en temps réel des IPPs. En effet, le délai pour la génération de la fluorescence après interaction et le caractère irréversible de la formation du fluorochrome, maintient l'interaction dans le temps jusqu'à la dégradation du complexe (Kerppola, 2008).

Comme pour d'autres techniques qui impliquent des protéines de fusion, la fonctionnalité de celles-ci doit être vérifiée avant de poursuivre les expériences. Enfin, l'apparition de signaux fluorescents faux-positifs est possible, due à une mauvaise interprétation du signal fluorescent (bruit de fond) ou à un signal

provenant d'une interaction non-spécifique entre les deux protéines étudiées (Miller et al., 2015).

Complémentation de Luminescence Bimoléculaire (BiLC)

Les luciférases existent à l'état naturel chez les lucioles et l'espèce *renilla*. Ce type d'enzymes génère de la bioluminescence suite à la fixation de leur substrat. Par conséquent, contrairement à la BiFC, ce composé doit être ajouté au système afin d'obtenir le signal et de le détecter. L'un des avantages de la BiLC est le caractère réversible de la reconstitution. En effet, l'addition d'un inhibiteur entraîne la séparation du complexe bimoléculaire suivie de la disparition du signal bioluminescent. La BiLC est donc spécialement adaptée à l'étude de la dynamique des IPPs (Luker et al., 2004; Stefan et al., 2007).

I.3.2.2. Transfert d'énergie entre protéines fluorescentes ou bioluminescentes (FRET/BRET)

Le transfert d'énergie par fluorescence : le FRET

Cette technique est basée sur le transfert d'énergie non-radiatif d'un fluorophore donneur excité à un fluorophore accepteur. Donneurs et accepteurs sont sélectionnés en fonction de leur spectre d'absorption et d'émission. Le spectre d'absorption de l'accepteur doit chevaucher le spectre d'émission du donneur. Une protéine d'intérêt est fusionnée au donneur et l'autre à l'accepteur. Si les deux protéines interagissent ou se retrouvent à proximité, le fluorophore donneur excité, n'émet pas de photons mais transfère son énergie au fluorophore accepteur (Broussard et al., 2013). Le fluorophore donneur absorbe l'énergie et émet de la fluorescence (Figure 14). Le signal d'émission diffère de celui observé avec le donneur seul et permet le suivi d'IPP (Ma et al., 2014).

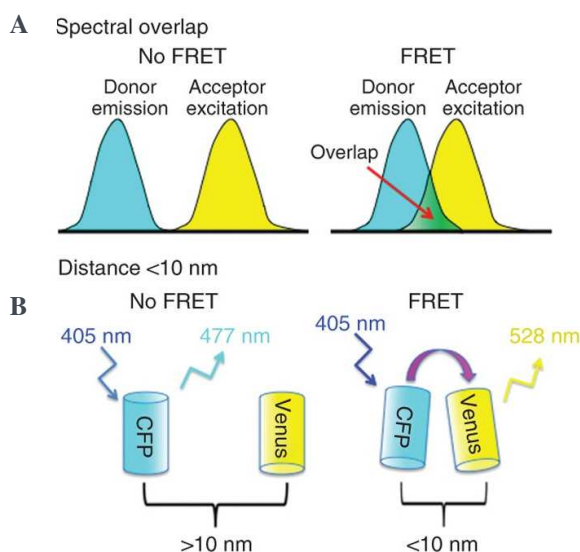


Figure 14 : Schéma des trois conditions à réunir pour obtenir un signal FRET. (A) L'énergie de l'émission du donneur doit être une énergie que l'accepteur peut absorber. Par conséquent, le spectre d'émission du fluorophore donneur doit chevaucher le spectre d'excitation du fluorophore accepteur. (B) Si le donneur et l'accepteur sont à une distance supérieure à 10 nm, il n'y a pas de FRET et le donneur émet sa fluorescence. S'ils sont à une distance inférieure à 10 nm, le transfert d'énergie peut se produire du donneur (CFP) vers l'accepteur (Vénus). Schéma issu de (Broussard et al., 2013).

L'avantage du FRET est son abilité à suivre des IPPs en temps réel et de mesurer les interactions de courte durée. De plus, le FRET est adaptée à un contexte cellulaire vivant et permet aussi la détection des sites d'interaction. Une très petite distance (< 10 nm) entre les deux fluorophores est requise pour que le transfert d'énergie se produise. Le FRET a également une sensibilité déccrue en comparaison à d'autres approches comme la BiFC ou le BRET. En effet, après l'illumination de l'échantillon, le signal d'autofluorescence a tendance à être fort. Les signaux faibles sont donc difficiles à distinguer du bruit de fond (Boute et al., 2002; Ma et al., 2014).

Le transfert d'énergie par bioluminescence : le BRET

Le BRET a été développé pour contrecarrer la majeure limitation du FRET : le fort bruit de fond. La protéine d'intérêt est fusionnée à la luciférase *Renilla* (RLuc) qui sert de donneur d'énergie. Le partenaire potentiel est fusionné à une protéine fluorescente verte ou jaune (GFP ou YFP) qui fait office d'accepteur. Lorsque donneurs et accepteurs sont à proximité (<100 Å), via l'interaction des partenaires, le transfert d'énergie se produit entre la RLuc et la PF. Le signal fluorescent indique l'interaction (Boute et al., 2002; Hamdan et al., 2006).

Le BRET a les mêmes avantages que le FRET (Boute et al., 2002; Hamdan et al., 2006; Xie et al., 2011), cependant, le BRET est plus sensible et présente un bruit de fond plus faible que le FRET (Boute et al., 2002). Comparé au FRET, le signal tend à être plus faible (Hamdan et al., 2006; Xie et al., 2011).

Enfin, l'analyse des IPPs avec le BRET ou le FRET n'est pas adaptable au screening à large échelle. Cela serait trop fastidieux au niveau de l'analyse.

I.3.2.3 Méthodes pour marquer les protéines avoisinnantes avec la biotine

BioID

L'approche BioID utilise une biotine ligase (BirA*), dérivée de la bactérie *Escherichia coli*, qui possède une mutation dans le site catalytique (R188G) (Roux et al., 2012). Cette mutation diminue la spécificité de la BirA d'origine, qui ne biotinylyle que certaines lysines. La BirA* peut biotinylyler toutes les lysines présentes sur les protéines voisines (Kim and Roux, 2016; Rees et al., 2015). Pour la BioID, la BirA* est fusionnée à une protéine appât. Une fois exprimée dans la cellule, la protéine de fusion interagit avec ses cofacteurs habituels et sont biotinylysés par la BirA* (Trinkle-Mulcahy, 2019) (Figure 15).

La biotine doit généralement être ajoutée aux cellules en culture pour réaliser l'expérience (Trinkle-Mulcahy, 2019). Les cellules sont au contact de la biotine pendant quelques heures. Les protéines biotinylées sont par la suite

capturées sur une matrice d'affinité à la streptavidine et l'identification est réalisée par spectrométrie de masse en tandem avec « liquid chromatography » (LC-MS/MS). Cette technique peut être utilisée pour des approches à petite ou à grande échelle, comme l'analyse des interactions à l'interface centrosome-cil (Gupta et al., 2015) ou les facteurs impliqués dans l'organisation des corps ou granules associés aux ARNm (Youn et al., 2018), respectivement.

Le potentiel de la BioID a rapidement établi la technique comme une approche complémentaire aux cartographies d'interactomes basée sur l'AP/MS. Un des avantages clés de la BioID est la capacité de capture des interactions faibles et/ou transitoires qui peuvent être perdues avec des approches standards de purification d'affinité. En effet, la force de l'interaction streptavidine/biotine permet de limiter la perte de partenaires potentiels lors des multiples rinçages inhérents aux techniques de purification sur colonne. Cette caractéristique limite aussi le bruit de fond car les conditions d'extraction et de capture peuvent être plus stringentes. Ceci limite le bruit de fond des contaminants. Contrairement aux purifications d'affinité classiques, la BioID est aussi applicable à des protéines solubles ou insolubles et variées (FT, molécules de signalisation, ligases d'ubiquitine, composants du cytosquelette etc.).

La technique a été développée pour les cellules en culture mais récemment, son utilisation a été étendue à des organismes modèles. Par exemple, chez la drosophile, la BirA* a été exprimée spécifiquement dans les disques d'ailes (structures larvaires donnant naissance aux ailes chez l'adulte) pour identifier des protéines impliquées dans le développement de cet organe du vol (Branon et al., 2018). Une autre expérience a été réalisée dans l'embryon de drosophile et a permis de construire les interactomes spécifiques à différents lignages cellulaires (mésodermale, neural, et neuroectodermale) (Carnesechi et al., 2020). La BioID a aussi été implémentée chez *C. elegans* où la ligase est exprimée tôt dans le lignage intestinal et l'activité de biotinylation est examinée à différents stades développementaux. De cette façon, une comparaison entre différents interactomes est possible et peut permettre l'identification de protéines communes ou spécifiques à plusieurs temps développementaux (Branon et al., 2018).

APEX

La peroxidase APEX (27 kDa), en présence d'H₂O₂, catalyse l'oxydation du phénol-biotine en un radical de phenoxy-biotine à courte durée de vie (< 1ms). La réaction avec des a.a riches en électrons (tyrosine, tryptophane, cystéine et histidine), provoque leur biotinylation (**Figure 15**). La protéine appât fusionnée à l'APEX est exprimée dans les cellules. Celles-ci sont incubées avec le phénol-biotine puis exposées une minute avec l'H₂O₂ pour induire la biotinylation (Trinkle-Mulcahy, 2019).

L'APEX est plus petite que la BirA* (27 versus 35 kDa), un avantage clé pour la fonctionnalité des protéines de fusion. La vitesse de marquage est plus grande pour l'APEX que pour la BirA*. Une meilleure résolution temporelle est donc atteinte et facilite l'identification de modifications dynamiques des associations protéine-protéine au court du temps ou en réponse à une perturbation cellulaire (Trinkle-Mulcahy, 2019).

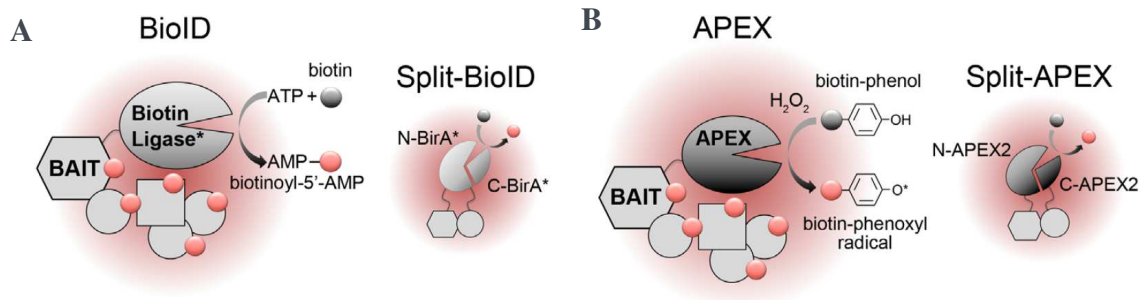


Figure 15 : Principe de la BioID (et split-BioID). (A) La BioID est basée sur l'expression d'une protéine proie fusionnée à un mutant de la biotine ligase BirA*. Cette forme active de biotine s'attache de manière covalente aux résidus de lysine accessibles sur les protéines avoisinantes. La split-BioID adapte la technique aux tests de CFPs. (B) Le principe est le même que celui de la BioID, mais la protéine proie est fusionnée à une peroxydase qui catalyse l'oxydation du biotine-phénol en biotine-phénoxy, en présence d'H₂O₂. Cette forme active de la biotine crée des liens covalents avec les a.a riches en électrons sur les protéines à proximité de la proie. De même, cette technique est adaptable en version fragmentée : split-APEX. *Schéma issu de* (Trinkle-Mulcahy, 2019).

L'APEX a été développé en premier lieu, pour l'imagerie à haute résolution de structures cellulaires via la microscopie électronique. Plus tard, la méthode a été appliquée aux cellules vivantes (Rhee et al., 2013) et aux organismes modèles comme la *Drosophile* (Mannix et al., 2019) et le poisson zèbre (Ariotti et al., 2017).

Récemment, le potentiel de ces deux techniques, BioID et APEX, s'est étendu. En effet, les deux méthodes sont compatibles avec la complémentation de fragment protéiques (De Munter et al., 2017; Schopp et al., 2017; Xue et al., 2017) (Figure 15). Cette possibilité apporte une plus grande spécificité et permet l'étude des partenaires d'un complexe protéique donné.

I.3.2.4 Essai de ligature de proximité (PLA)

La PLA permet la détection d'interactions protéiques à des niveaux d'expression endogènes et avec une grande sensibilité et spécificité (Fredriksson et al., 2002; Gullberg et al., 2004; Söderberg et al., 2006). Un immuno-marquage (histochimie ou fluorescence) des protéines cibles est réalisé dans les cellules. Les deux anticorps primaires doivent provenir de deux espèces différentes. Les anticorps secondaires sont appelés sondes PLA (une PLUS et une MOINS). Celles-ci contiennent un brin d'ADN unique, complémentaire de l'autre. Lorsque les protéines ciblées interagissent, les sondes ADN s'hybrident pour former un ADN circulaire. Cette structure est amplifiée puis visualisée par des oligonucléotides

complémentaires, couplés à un fluorophore. Les interactions sont alors visualisées comme des points, et leur nombre et leur intensité peuvent être quantifiés par microscopie à fluorescence (Sigma-Aldrich) (Figure 16). La PLA ne peut se faire qu'au sein de cellules ou tissus fixés et repose sur la disponibilité d'anticorps compatibles (Alam, 2018).

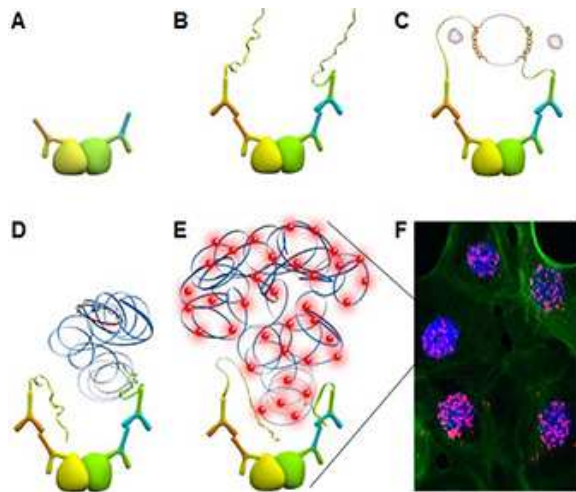


Figure 16 : Schéma de la réaction de PLA. (A) Deux anticorps primaires reconnaissent spécifiquement les protéines d'intérêt. (B) Des anticorps secondaires couplés aux oligonucléotides (sondes PLA) se fixent à l'anticorps primaire correspondant. (C) Lorsque les sondes PLA sont à proximité, il y a ligation entre les deux sondes. (D) Il en résulte un ADN circulaire qui est amplifié par l'ADN polymérase. (E) Les oligos de détection complémentaires, couplés aux fluorochromes, s'hybrident à des séquences répétées présentes dans les amplicons. (F) Les signaux PLA sont détectés par microscopie à fluorescence et apparaissent comme des points lumineux au sein des cellules. Cela donne l'accès à la localisation intracellulaire des IPPs. Schéma issu de (Sigma-Aldrich).

Tableau récapitulatif de techniques de détection des IPPs

Détection des IPPs

Nom de la technique	Imagerie Live (<i>in vivo</i>)	Niveau d'expression	Interaction réversible (études cinétiques)	Localisation cellulaire	Distance maximale	High-throughput
BIFC	Oui	Faible / Endogène	Non	Oui	40 nm	Oui
BILC	Oui	Faible	Oui	Oui	40 nm	Non
FRET	Oui	Fort	Oui	Oui	10 nm	Non
BRET	Oui	Fort	Oui	Oui	10 nm	Non
BioID	Oui	Moyen	Non	Non	10-15 nm	Oui
APEX	Oui	Moyen	Non	Non	10-15 nm	Oui
PLA	Non	Faible / Endogène	Non	Oui	40 nm	Oui

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des différentes méthodes de détection des IPPs. De la gauche vers la droite : le nom de la technique ; la possibilité de faire de l'imagerie en échantillon vivant ; le niveau d'expression requis pour détecter un signal exploitable ; processus réversible ou non, si oui, des études cinétiques sont possibles ; permet l'observation de la localisation cellulaire, ou non ; distance maximale entre les deux partenaires pour autoriser la détection ; possibilité d'adapter la technique à large échelle.

II. Les protéines Hox comme modèle d'étude de facteur de transcription

II.1. Les différentes fonctions des protéines Hox

II.1.1. Patterning des axes longitudinaux : des cnidaires à l'homme

Au sein d'un corps animal, les axes déterminent la répartition des cellules pour développer des structures spécifiques à l'emplacement désigné. Les protéines Hox sont des FT et sont considérées comme les régulateurs principaux de la formation de l'axe antéro-postérieur (AP) (Castelli-Gair Hombría et al., 2016; Pearson et al., 2005). Ce système de « patterning » est conservé chez les animaux à symétrie bilatérale (**Figure 17A**). Dans les premières branches de l'arbre phylogénétique, les gènes Hox sont seulement trouvés chez les Cnidaires (**Figure 17A**). Ceci indique une origine évolutive antérieure à la séparation bilatériens/cnidaires, il y a plus de 600 millions d'années (Ferrier and Holland, 2001; Putnam et al., 2007).

En raison de certains domaines d'expression des protéines Hox chez les Cnidaires (en particulier l'anémone de mer *Nematostella vectensis*) (He et al., 2018) et les Bilatériens, tous deux étaient considérés bilatéralement symétriques. Cependant, des études récentes ont remis en question ce postulat. Chez *Nematostella vectensis*, l'équivalent de l'axe AP est l'axe oral-aboral (OA) (**Figure 17A**). Dubuc et al. (DuBuc et al., 2018) ont montré que l'anémone présente des signatures « postérieures » aux deux pôles, oral et aboral. De plus, d'autres gènes Hox ne suivent pas un profil d'expression conservé le long de l'axe OA chez les Cnidaires (He et al., 2018). Ces observations soulignent que, la corrélation entre l'axe AP des Bilatériens et l'axe OA des Cnidaires, n'est pas évidente. Une autre étude a mis en évidence le rôle des gènes Hox dans la segmentation radiale, pour former l'axe directeur de l'anémone de mer (He et al., 2018) (**Figure 17B**). Les protéines Hox permettent également l'apparition de structures secondaires comme tentacules et mésentères (He et al., 2018). L'axe directeur semble être un meilleur homologue de l'axe AP des Bilatériens, que l'axe OA présenté précédemment (Merabet and Galliot, 2015; Thomas-Chollier et al., 2010) (**Figure 17B**).

Les gènes Hox confèrent une identité cellulaire le long de l'axe AP en contrôlant l'expression de gènes cibles spécifiques. Ils sont actifs dans différentes régions et indiquent aux cellules quelle voie de développement morphogénétique emprunter. Et c'est le cas chez tous les Bilatériens, comme les nématodes (Costa et al., 1988), les insectes (Lewis, 1978; Sánchez-Herrero et al., 1985), ou encore les Mammifères (Krumlauf, 1994).

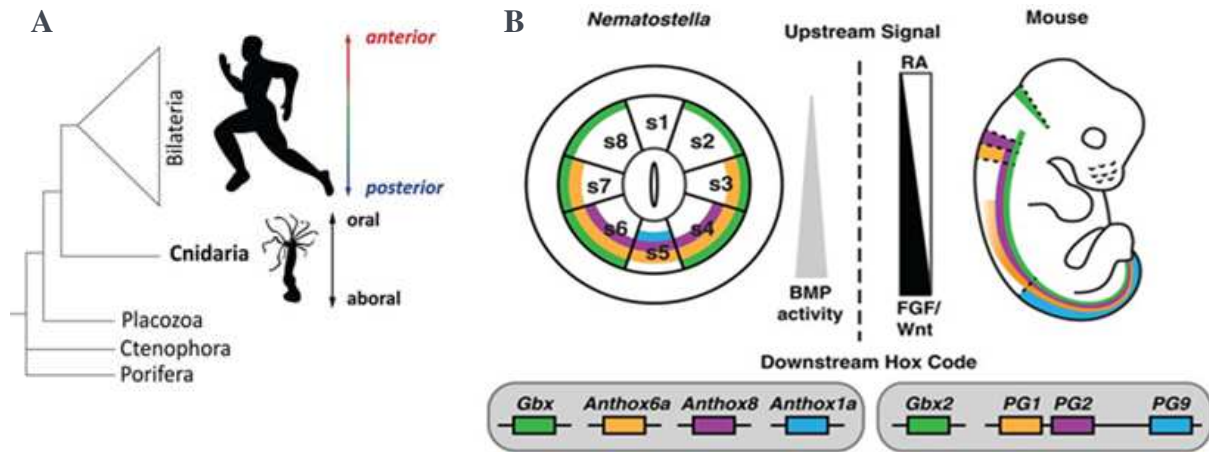


Figure 17 : Les gènes Hox dans le développement de l'axe antéro-postérieur (AP). (A) Les organismes Bilatériens sont définis par un axe AP perpendiculaire à l'axe dorso-ventral (DV). Les Cnidaires et les Bilatériens sont des taxons frères. Les Cnidaires sont la seule branche basale à avoir un cluster de gènes Hox différent (DuBuc et al., 2017). (B) Comparaison entre le code Hox chez un représentant des Cnidaires (*Nematostella*) et des Vertébrés (souris). Bien que les gènes Hox répondent à différentes voies de signalisation sur des axes distincts (Upstream Signal), des programmes moléculaires similaires contrôlent le patterning des segments (Downstream Hox code) (He et al., 2018).

Les gènes Hox ont été identifiés et classifiés sur la base de phénotypes causés par des mutations. Celles-ci ont la particularité de transformer et remplacer l'identité d'une partie du corps par une autre. Ce phénomène est appelé transformation homéotique. Par exemple, les mutations perte de fonction dans le gène Hox *Ultrabithorax* (*Ubx*) chez la Drosophile, montrent une transformation du troisième segment thoracique (T3) en deuxième segment thoracique (T2). Cela se traduit par la transformation des organes balanciers, appelés haltères (sur le segment T3) en ailes (présentes également sur le segment T2), et aboutit au phénotype bien connu des mouches à quatre ailes (Lewis, 1978).

La Drosophile possède huit gènes Hox contre 40 chez les Mammifères (Figure 18). Des analyses de séquences des gènes Hox de Mammifères ont montré que les quatre groupes paralogues des gènes Hox proviennent d'un unique groupe ancestral et ont été formés par duplication de gènes et de chromosomes au cours de l'évolution (Figure 18) (Carroll, 1995).

Au sein des différentes branches évolutives, le nombre de segments et de gènes Hox n'est pas identique. Par exemple, les drosophiles et les souris ne partagent pas le même nombre de segments et chaque segment est déterminé par un nombre différent de gènes Hox (Figure 18). Malgré ces différences, la morphologie des segments dans l'embryon précoce n'exhibe pas de dissemblances morphologiques évidentes. Il est intéressant de noter que les gènes Hox des animaux ont tous la même organisation : gènes antérieurs, centraux et postérieurs (Carroll, 1995). De plus, un gène Hox donné, pourrait réguler un segment spécifique de différentes manières dans deux espèces distinctes. La protéine Hox *Ubx*, évoquée précédemment, régule l'identité des ailes postérieures chez plusieurs

espèces d'Arthropodes comme le papillon *Precis coenia* (Warren et al., 1994) et la blatte *Tribolium castaneum* (Tomoyasu et al., 2005).

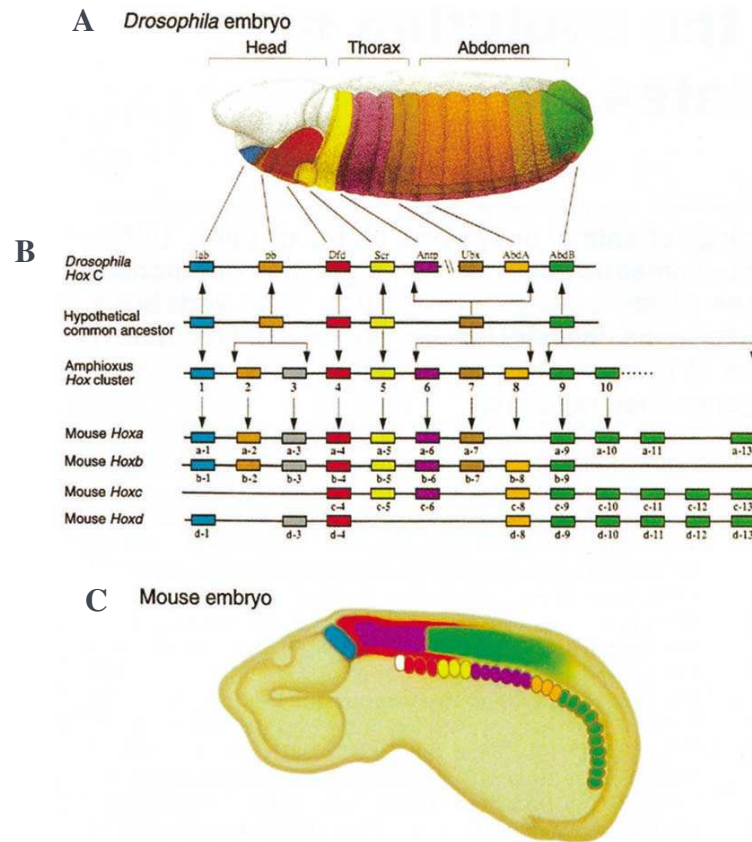


Figure 18 : Organisation et expression des gènes Hox. (A) L'expression des gènes Hox dans les domaines de l'axe AP correspond à l'ordre des gènes dans le complexe de gènes Hox. (B) Ce schéma montre les relations entre les clusters de gènes Hox chez la drosophile (*Drosophila*), l'amphioxus et la souris, au cours de l'évolution. La deuxième ligne du schéma représente l'organisation déduite du cluster Hox ca chez l'ancêtre commun aux arthropodes et chordés. (C) Domaines AP des gènes Hox durant le développement de la souris qui correspondent aussi à l'ordre des gènes dans le complexe de gènes Hox (Ghiselin, 2001).

II.1.2. Les autres fonctions des protéines Hox

Les protéines Hox contrôlent un grand nombre de fonctions aussi diverses que la forme des cellules, leur migration, leur prolifération, la mort cellulaire programmée ou encore leur différenciation (Cerdá-Esteban and Spagnoli, 2014; Philippidou and Dasen, 2013; Sánchez-Herrero, 2013; Shah and Sukumar, 2010; Taniguchi, 2014). Par exemple, chez les Oiseaux et les Mammifères, l'expression des gènes Hox, durant la gastrulation, guide la migration des cellules et dans le cas du système nerveux central, établit les circuits nerveux (Gavalas et al., 1997). Le même processus se déroule chez *C. elegans* où les protéines Hox contrôlent la migration des neuroblastes (Tamayo et al., 2013). Le rôle des gènes Hox dans la migration est aussi retrouvé chez le poisson zèbre. Ils encadrent la migration collective des cellules pendant le développement de la ligne latérale

mécanoréceptive (Breau et al., 2013). Pour toutes ces situations, les protéines Hox régulent l'expression récepteur/ligand. Cela conduit à des interactions attractives ou répulsives entre les cellules en migration et l'environnement dans lequel elles se déplacent (Žigman et al., 2014). De plus, elles permettent également de modifier directement la forme cellulaire, la communication entre les cellules et enfin les voies de signalisation impliquées. Ces actions directes, délimitent les frontières fonctionnelles et morphologiques entre les différents segments du rhombencéphale (cervelet et bulbe rachidien chez l'Homme) des Vertébrés (Prin et al., 2014).

Le couple différenciation/morphogénèse est aussi une des cibles des protéines Hox. Chez la souris, cela a été étudié pour le gène *Hoxa5*. L'expression de celui-ci organise les épithélia, à partir des cellules du stroma des poumons, des intestins et des glandes mammaires (Aubin et al., 2002; Boucherat et al., 2012; Garin et al., 2006).

De manière plus générale, chez les vertébrés, plusieurs gènes Hox favorisent ou inhibent le développement et/ou le remodelage du système vasculaire (Stoll and Kroll, 2012). Cela supporte le fait que les protéines Hox semblent moduler les gènes effecteurs impliqués dans le contrôle des interactions entre cellules et matrice extracellulaire (Kachgal et al., 2012; Winnik et al., 2009). De plus, la peau est un autre organe au sein duquel les protéines Hox agissent sur la différenciation. Soit comme FT effecteurs, soit en amont, à un niveau élevé dans la voie de signalisation impliquée (Godwin and Capecchi, 1998; Johansson and Headon, 2014; La Celle and Polakowska, 2001).

Pendant l'hématopoïèse, différents gènes Hox, en particulier les gènes Hox postérieurs, interviennent dans le choix des cellules souches, à entrer en différenciation ou rester dans un état pluripotent (Alharbi et al., 2013). De même, Abdominal B (AbdB), chez la Drosophile, contribue au maintien de la niche de cellules souches des testicules. Dans ce contexte, les protéines Hox régulent l'orientation des centrosomes et le taux de division des cellules souches de la lignée germinale (Papagiannouli et al., 2014).

Concernant la prolifération et le cycle cellulaire, il a été démontré que le gène *Antennapedia* (*Antp*) maîtrise la sortie du cycle cellulaire des neuroblastes de Drosophile (Baumgardt et al., 2014). La régulation de ces processus par les gènes Hox se retrouve dans de nombreux cancers et leucémies (Shah and Sukumar, 2010). En effet, le modèle murin de leucémie a permis de mettre en évidence l'importance de la protéine *Hoxa9* dans le contrôle du cycle cellulaire. Dans ce contexte, *Hoxa9* est associée à d'autres régulateurs du cycle cellulaire : la protéine alpha de liaison à un enhancer/CCAAT (*C/EBPα*) (Collins et al., 2014) et la méthyltransférase G9a (*EHMT2*) (Lehnertz et al., 2014).

Enfin, la décision de mort cellulaire programmée peut être influencée par l'activité des gènes Hox. Par exemple, la protéine Hox MAB-5, chez *C. elegans*, contrôle directement l'apoptose des cellules blastiques pro-neurales ventrales (Liu et al., 2006). Hoxa5 stimule l'apoptose dans les tissus mammaires humains et murins, et ce, par la régulation de p53 (TP53/TRP53), Twist et les gènes codant pour les caspases 2 et 8 (Chen et al., 2004; Raman et al., 2000; Stasinopoulos et al., 2005). De même, chez la Drosophile, la protéine Hox Deformed (Dfd) agit directement sur le gène *rpr* (*death promoting gene reaper*) pour l'activation locale de l'apoptose (Lohmann et al., 2002).

La multitude de fonctions des protéines Hox se reflète aussi au niveau de leurs modes opératoires, avec une action pouvant se situer à différents niveaux de régulation : de l'initiation aux événements terminaux. Les gènes Hox ont ainsi été définis comme des « micromanagers » (Akam, 1998).

II.2 La spécificité des protéines Hox

II.2.1 Le paradoxe des protéines Hox : généralités

Les protéines Hox possèdent un domaine de liaison, l'homéodomaine (HD) (Figure 19) très conservé. Par conséquent, elles montrent des propriétés de liaison à l'ADN très similaires voire identiques *in vitro* (Hayashi and Scott, 1990; Mann and Chan, 1996; Mann et al., 2009; Merabet and Mann, 2016; Zandvakili and Gebelein, 2016). En effet, les HDs, des protéines Hox se fixent tous sur des séquences riches en nucléotides A et T. Cependant, comme illustré précédemment, cette famille de protéines a des actions diverses et variées mais aussi très spécifiques. La reconnaissance des séquences riches en A/T par les protéines Hox *in vitro* ne peut donc expliquer une telle spécificité *in vivo*: c'est le paradoxe des protéines Hox. Il est important de noter que l'HD est tout de même une région requise pour les fonctions des protéines Hox mais n'est pas responsable, à lui-seul, de la spécificité. Dans certains cas, sont aussi requis, des résidus localisés immédiatement après la partie N ou C-terminale de l'HD (Dessain et al., 1992; Gibson et al., 1990; Lin and McGinnis, 1992; Mann and Hogness, 1990; Zhao and Potter, 2001; Zhao and Potter, 2002).

Dans la partie précédente, à propos des FT HTH, il a été évoqué que tous les FT à HD se replient sous forme de trois hélices- α et d'une partie N-terminale désordonnée (Figure 19A et B). Les premiers contacts avec l'ADN ont lieu au niveau des résidus 47, 50, 51 et 54, qui appartiennent à la troisième hélice- α (appelée hélice de reconnaissance) (Figure 19B) et de l'arginine en position 5, partie du bras N-terminal (Figure 19C).

Une approche bactérienne simple hybride a été utilisée pour analyser les préférences de fixation à l'ADN des différents types d'HDs présents dans le génome de *D. melanogaster* (Noyes et al., 2008). Une étude parallèle a fait de même pour les HDs de la souris (Berger et al., 2008). Ces données ont confirmé que les HDs des protéines Hox reconnaissent des séquences riches en A/T. En particulier, le « groupe d'HDs ANTP », qui inclue tous les HDs des protéines Hox sauf ceux de la classe AbdB, préfèrent se lier aux séquences TAAT[t/g][a/g]. Ces préférences de liaison ont été reproduites plus récemment par des expériences de Selex-seq avec les protéines Hox de drosophile complètes (Slattery et al., 2011).

Dans le génome de la Drosophile, il y a 87 307 copies de la séquence TAATTA et 86 201 copies de la séquence TAATGA. Ces deux nombres sont plus de cinq fois supérieurs au nombre de gènes annotés, codant pour des protéines. Il est donc évident que la présence d'un site TAAT[t/g][a/g] ne peut être une information suffisante pour la régulation par les protéines Hox. De plus ces sites sont reconnus par d'autres HDs n'appartenant pas à la famille des protéines Hox (Mann et al., 2009). La liaison à l'ADN via les sites TAAT[t/g][a/g] ne permet donc pas de distinguer entre les membres de la famille des Hox et leurs fonctions distinctes *in vivo*.

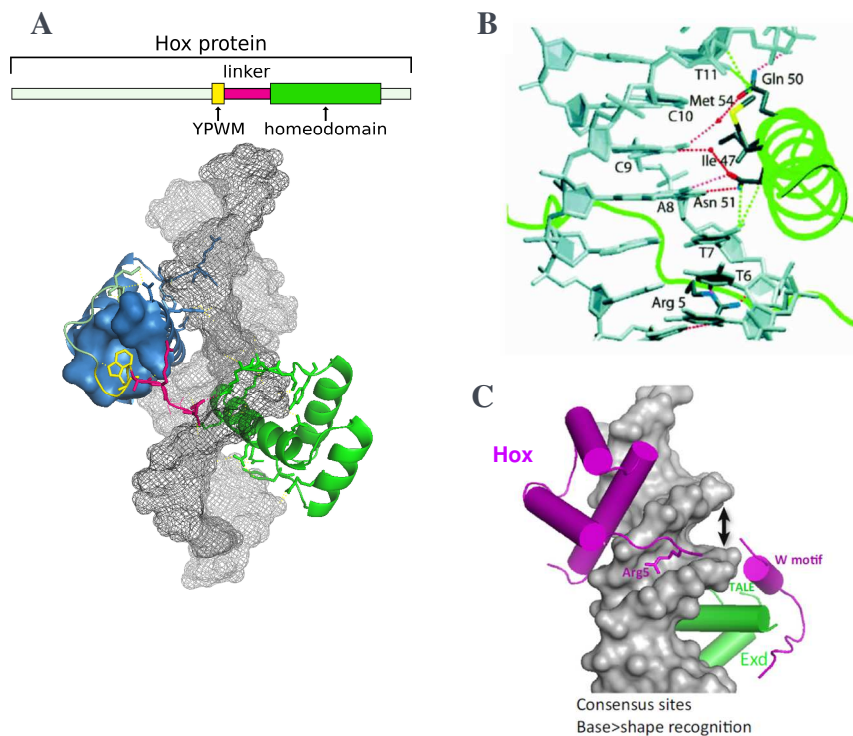


Figure 19 : Structure moléculaire des protéines Hox. (A) Représentation et structure des éléments d'une protéine Hox qui déterminent leur fixation à l'ADN, d'après (Hueber et al., 2013) dans PyMol (Delano et al. 2002). Ces éléments incluent le motif YPWM, la région linker et l'HD. Le schéma représente la protéine Scr (en vert), son interaction avec Exd (en bleu) et l'enhancer *fkf250* du gène *forkhead (fkf)* (en gris) (Joshi et al., 2007). Le motif YPWM (en jaune) interagit avec la poche hydrophobique de Exd, l'HD (en vert) interagit avec le petit et le grand sillon de l'ADN (gris), alors que la région linker (rose) interagit avec Exd et le petit sillon de l'ADN. D'après (Hueber et al., 2013). (B) Liaisons à l'ADN établies par la protéine HoxA9. L'interaction avec le petit sillon de l'ADN se fait par l'Arg 5 de l'HD. Les interactions hydrophobiques (vert) et les liaisons hydrogènes (rouge) sont représentées par des lignes pointillées. D'après (LaRonde-LeBlanc and Wolberger, 2003). (C) Structure 3D qui illustre la reconnaissance d'un site de fixation non-spécifique des paralogues. La protéine Hox contacte l'ADN par l'Arg5 (magenta), visible au centre de la structure 3D de l'ADN (gris). D'après (Merabet and Mann, 2016).

I.2.2. Différents types de gènes cibles

Les différents types de gènes cibles peuvent être classés en plusieurs groupes. En effet, des expériences de caractérisation de profils d'expression de gènes dans l'embryon entier, suivies d'expressions ectopiques individuelles de chaque gène Hox, ont mis en lumière différentes catégories de gènes cibles (Hueber et al., 2007). L'expression ectopique de Deformed (Dfd), Sex comb reduced (Scr), Antp, Ubx, AbdA ou AbdB provoque des changements significatifs dans l'expression d'environ 1500 gènes. Plus des deux tiers (~69%) sont régulés par une seule des six protéines Hox testées. Approximativement un tiers (~30%) des 1500 gènes répondent à plusieurs protéines Hox alors que, 1% seulement répondent aux six protéines Hox (Figure 20). Ce dernier pourcentage, faible mais significatif, supporte le fait que certains gènes peuvent être ciblés par de multiples protéines Hox. Ceci soulève la possibilité que, tous les sites de fixation des protéines Hox, ne nécessitent pas toujours une discrimination entre celles-ci.

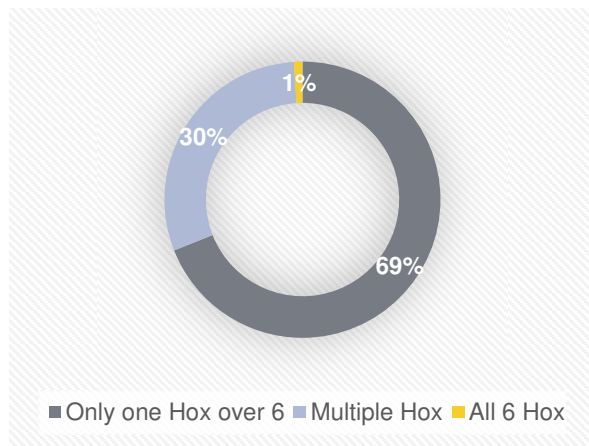


Figure 20 : Expression ectopique et réponse variable des protéines Hox. Le graphique montre la répartition (en pourcentage) des différentes réponses possibles des protéines Hox suite à l'expression ectopique de l'une d'entre elles. L'expression ectopique d'une protéine Hox provoque des changements d'expression pour 1500 gènes. La majorité des changements sont régulés par une seule protéine Hox (69%, partie grise), 30% par plusieurs protéines Hox (en bleu clair) et enfin seulement 1% par toutes les protéines Hox (jaune).

Cinq grandes classes de gènes cibles ont été caractérisées (Hueber et al., 2007; Merabet and Mann, 2016) :

1. Gènes cibles Paralogue-spécifiques (1) : gènes cibles spécifiques d'un groupe paralogue, régulés par des sites de fixation spécifiques des paralogues.
2. Gènes cibles Paralogue-spécifiques (2) : gènes cibles spécifiques d'un groupe paralogue, régulés par des sites de fixation non-spécifiques des paralogues.
3. Gènes cibles semi Paralogue-spécifiques: gènes cibles spécifiques de groupe semi-paralogues, régulés par des sites de fixation avec une spécificité intermédiaire.
4. Gènes cibles non-spécifiques des paralogues : gènes cibles avec de multiples sources d'informations, chacune d'entre elles étant dépendantes de sites de fixation spécifique d'un groupe paralogue ou de spécificité intermédiaire.

5. Gènes cibles généraux : gènes cibles non-spécifique des paralogues, régulés par des sites de fixation non-spécifiques des paralogues.

La régulation transcriptionnelle par les protéines Hox *in vivo* semble être le résultat d'une combinaison complexe de spécificité pour les sites de fixation mais dépend aussi du contexte cellulaire et de mécanismes indépendants à la fixation à l'ADN.

II.2.3. Propriété de liaison à l'ADN des protéines Hox

II.2.3.1. Fixation monomérique des protéines Hox

Certains modèles de fixation des protéines Hox sur les éléments *cis*-régulateurs, impliquent de multiples sites de liaison monomériques. Dans ce contexte, la multiplication des sites monomériques pourrait augmenter le taux d'occupation des enhancers et permettre une action coopérative entre les monomères, pour la régulation du gène cible (Biggin and McGinnis, 1997). Ces sites monomériques sont très fréquents dans le génome (Appel and Sakonju, 1993).

Une étude a examiné la contribution potentielle, de sites de fixation monomériques uniques, à la répression de gènes cibles des protéines Hox. Ils ont montré que plusieurs sites de fixation individuels de Ubx induisent une répression partielle de l'élément *sal 328* du gène *spalt (sal)* dans l'haltère. Et l'addition de trois sites monomériques permettent la répression complète du gène *sal* (Galant et al., 2002).

Trois autres études ont aussi démontré une apparente capacité des monomères de protéines Hox à contribuer à la régulation de gènes cibles. Par exemple, l'élément *cis*-régulateur *P2* du gène *Antp*, contient 41 sites de fixation pour Ubx, dont la majorité est nécessaire à sa répression (Appel and Sakonju, 1993). Ces résultats suggèrent que la régulation d'éléments *cis*-régulateurs, pourrait se faire par un effet additif de multiples événements de fixation des protéines Hox monomériques. En effet, la présence de sites multiples augmente la probabilité qu'un site de fixation soit occupé par un FT. Les protéines Hox pourraient aussi agir par la fixation sur des sites monomériques positionnés dans des contextes spécifiques de séquences nucléotidiques. Entre autres, la proximité avec des sites de fixation d'autres enhancers ou répresseurs, au sein de l'enhancer (Galant et al., 2002).

Dans le cas de la régulation par la fixation de FT sous forme monomérique, ceux-ci doivent avoir un motif impliqué dans l'activation ou la répression de la cible. En effet, il a été montré qu'un motif C-terminal de la protéine Ubx permet l'interaction avec des membres de la machinerie transcriptionnelle, et ainsi pourrait participer directement à la régulation du gène cible (Galant et al., 2002). Une autre

étude montre que les sites de fixation monomériques, peuvent compenser l'absence d'un site de fixation Hox/cofacteur de haute affinité (Sánchez-Higueras et al., 2019). Par ailleurs, plusieurs cibles de la protéine Hox AbdB, ne dépendent que de son activité monomérique. De plus, la présence des cofacteurs canoniques des protéines Hox, Homothorax (Hth) et Extradenticule (Exd), peuvent moduler l'activation de gènes cibles par AbdB (Rivas et al., 2013).

II.2.3.2. Fixation à l'ADN avec les cofacteurs TALE

Généralités

La liaison à l'ADN en coopération avec des cofacteurs qui se lient ou non à l'ADN, est un moyen bien établi pour atteindre la spécificité recherchée *in vivo*. Pour les protéines Hox, les cofacteurs les mieux caractérisés sont les protéines à HD de la famille TALE (three amino acid loop extension) (Mann and Chan, 1996; Moens and Selleri, 2006) (**Figure 19C**). Chez la Drosophile, les cofacteurs TALE connus sont Exd et Hth, évoqués précédemment. Pour la souris, il existe quatre homologues de Exd (Pbx1, Pbx2, Pbx3 et Pbx4) et cinq homologues de Hth (Meis1, Meis2, Meis3, Prep1 and Prep2). De même, *C. elegans* dénombre trois homologues de Exd (ceh-20, ceh-40, ceh-60) et deux homologues de Hth : unc-62 and psa-2 qui code pour une forme tronquée sans HD (Mukherjee and Bürglin, 2007). Pour plus de simplicité, Exd/Pbx/Ceh-20 sont regroupées comme les protéines PBC.

Ces protéines ont toute la capacité à se fixer à l'ADN, en coopération avec les protéines Hox ou Hth/Meis. Cependant, les protéines de la famille TALE ne sont pas seulement des partenaires des protéines Hox, elles ont aussi des fonctions *in vivo*, indépendantes des protéines Hox (Bessa et al., 2008; Bon et al., 2018; Jiang et al., 2008; Merabet et al., 2005; Moens and Selleri, 2006). Les protéines PBC interagissent également avec les membres de la famille Hth/Meis/Prep, indépendamment de l'ADN. Les régions N-terminales de ces protéines présentent des domaines hautement conservés, qui sont le siège de l'interaction entre ces partenaires (Mann and Affolter, 1998). Dans plusieurs cas, la localisation nucléaire et/ou la stabilité de ces protéines, est dépendante de cette interaction (Berthelsen et al., 1999; Haller et al., 2004; Huang et al., 2003; Mann and Chan, 1996; Ryoo and Mann, 1999; Stevens and Mann, 2007).

L'examen de soixante-six éléments *cis*-régulateurs connus des protéines Hox montre que 31 de ces séquences contiennent un site PBC-Hox. Pour 7 de ces éléments, des preuves expérimentales montrent que ces cofacteurs ne sont pas utilisés (Mann et al., 2009). Ces quelques exemples sont à la base de caractéristiques intéressantes. Il y a une tendance des protéines Hox antérieures (paralogues 1 à 5), à exploiter les cofacteurs PBC plus fréquemment que les protéines Hox postérieures (paralogues 6 à 13) : 20/30 contre 9/36, respectivement

(Figure 21). Les éléments indépendants des protéines PBC sont plus disposés à multiplier les sites de fixation des protéines Hox, comme évoqué dans la partie précédente sur les sites de fixation monomériques. En effet, la différence entre les sites de fixation, avec ou sans PBC, est marquée. Le nombre moyen de sites Hox en coopération avec les protéines PBC est de 1,2 (allant de 1 à 3), contre 2,8 (allant de 1 à 30) lorsqu'il n'y en a pas. Cette particularité pourrait refléter des sites de fixation de plus faible affinité en absence des protéines PBC, d'où la multiplication de ces sites, en compensation.

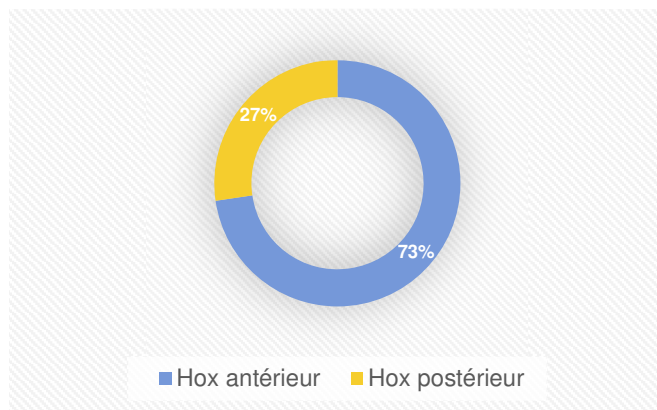


Figure 21 : Fréquence d'utilisation des cofacteurs PBC par les protéines Hox. Les protéines Hox antérieures et postérieures n'exploitent pas les cofacteurs PBC de la même manière. Dans 73% des cas étudiés, les protéines Hox antérieures utilisent les cofacteurs PBC pour assurer leur fonction (bleu). Alors que les protéines Hox postérieures les utilisent seulement dans 27% des cas (jaune).

Ce modèle est cohérent avec celui des sites de faible affinité entourés de microenvironnements riches en FT, comme décrit précédemment pour Ubx et l'enhancer de *svb*. Dans ce scénario, les FT ont tendance à s'incorporer dans un environnement de séquences qui possèdent des caractéristiques similaires à celles du motif de fixation, c'est-à-dire dans un « environnement homotypique ». Dans un tel contexte, la reconnaissance des sites multiples est facilitée (Dror et al., 2015). Ceci pourrait aussi éviter la diffusion des FT vers des sites génomiques ectopiques et activer des gènes dans un lignage inapproprié (Luna-Zurita et al., 2016).

Chez la *Drosophile*, de nombreuses structures régulées par les protéines Hox, notamment les appendices distaux, ne recourent pas aux cofacteurs EXD et HTH pour leur développement (Abu-Shaar and Mann, 1998; González-Crespo et al., 1998; Mann and Morata, 2000). De plus, le développement des appendices distaux chez d'autres Arthropodes (González-Crespo and Morata, 1996) et les Vertébrés (González-Crespo et al., 1998; Mercader et al., 2000; Selleri et al., 2001) ne requièrent, ni la présence des protéines PBC, ni celle des protéines MEIS.

L'interaction du complexe Hox-DNA avec les protéines PBC, à elle-seule, augmente la spécificité de liaison des protéines Hox. Ceci est illustré par différents exemples. En absence de cofacteurs, le paralogue Hox1 ou Labial (Lab, chez la *Drosophile*) montre une préférence pour les sites TAATTA (Berger et al., 2008; Noyes et al., 2008). En revanche, en présence d'une protéine PBC, l'hétérodimère PBC-Hox1/Lab préfèrent se lier à la séquence TGAT[t/g]GATgg. Ubx monomérique a également une préférence pour les sites TAATTA, ce qui ne permet pas la

distinction avec Hox1/Lab. Cependant, l'hétérodimère PBC-Ubx reconnaît la séquence TGATTTATTT (Berger et al., 2008; Noyes et al., 2008), qui diffère de celle reconnue par le complexe PBC-Hox1/Lab.

Si l'on ajoute au complexe PBC-Hox, le troisième partenaire MEIS/HTH, la séquence reconnue s'étend sur seize paires de bases. Contrairement aux sites monomériques, ce type de séquence est plus rare au sein du génome, et par conséquent, accroît la spécificité (Berthelsen et al., 1998; Jacobs et al., 1999; Ryoo and Mann, 1999).

Cependant, les interactions PBC-Hox semblent être plus complexes. Différentes approches biochimiques, *in vivo* et structurales, ont permis d'établir un mécanisme commun d'interaction PBC-Hox. En effet, la plupart des protéines Hox portent un motif YPWM, qui entre en contact direct avec le motif TALE du cofacteur PBC (Figure 19C et 22). Le tryptophane (W) du motif YPWM se glisse dans la poche hydrophobe formée par le motif TALE et stabilise ainsi l'interaction (Joshi et al., 2007; LaRonde-LeBlanc and Wolberger, 2003; Mann and Chan, 1996; Passner et al., 1999) (Figure 22).

Des études plus récentes précisent que, la formation du complexe PBC-Hox-DNA, ne se résume pas à l'unique interaction YPWM-TALE. Plusieurs articles ont mis en évidence qu'une mutation dans le motif YPWM de Ubx n'abolie pas la fixation coopérative avec les protéines PBX *in vitro*, ni un certain nombre de fonctions de Ubx *in vivo* (Galant et al., 2002; Merabet et al., 2003). D'autres résultats, en culture cellulaire et chez les embryons de drosophile et de poulet, montrent que trois protéines Hox sur 12 utilisent le motif hexapeptide (HX = YPWM) de manière prédominante, pour établir les interactions PBC-Hox. De plus, pour une large majorité des protéines Hox étudiées, la mutation du motif HX n'aboutit pas à l'altération significative de leur interaction avec les protéines PBC. L'HX est souvent et largement superflu pour l'assemblage des complexes PBC-Hox de drosophile (Hudry et al., 2012) ou humains (Dard et al., 2018). Une étude fonctionnelle récente sur la protéine Hox Abda confirme ces conclusions (Merabet et al., 2011). Plusieurs expériences ont été réalisées sur un ensemble d'évènements contrôlés par Abda. L'évaluation de la régulation des gènes, du phénotype, et des traits comportementaux, a permis de tirer des conclusions cohérentes sur l'HX et sa « dispensabilité » pour la formation des complexes PBC-Hox (Merabet et al., 2011).

Les protéines PBC semblent donc avoir d'autres modes d'interaction avec les protéines Hox, en plus de l'assemblage classique YPWM-TALE. Ces mécanismes d'interaction variés, sont à l'origine d'un autre niveau de spécificité des complexes PBC-Hox, permettant de reconnaître une panoplie de gènes cibles différents. En

effet, la reconnaissance des séquences *cis*-régulatrices pourrait dépendre du mode d'interaction utilisé (Merabet and Mann, 2016).

La structure des complexes PBC-Hox

Des structures aux rayons X sont disponibles pour quatre complexes PBX-Hox-DNA différents (Hoxb1, Scr, Ubx et Hoxa9). Les HDs des Hox, au sein des complexes, reconnaissent l'ADN en utilisant les mêmes contacts observés pour les structures monomériques. Pour les quatre complexes, le motif YPMW se loge dans la poche hydrophobe TALE présente dans l'HD des protéines PBC (**Figure 19 et Figure 22**). Les interactions avec les protéines PBC et l'ADN sont donc très similaires entre ces différentes protéines Hox. Cependant, cette vue de la structure des complexes PBC-Hox-DNA est incomplète, en partie car réalisée à partir de fragments de protéine. En effet, il existe d'autres motifs qui servent d'intermédiaire pour ce type d'interaction (voir plus loin) (Merabet et al., 2007). Cependant, aucune information structurale avec les partenaires complets n'est disponible à ce jour.

La structure des complexes trimériques PBC-Hox-ADN

L'importance de la structure des complexes PBC-Hox pour la reconnaissance de séquences spécifiques a été étudiée en détail, comme abordé précédemment. Cependant, la structure de l'ADN lui-même a aussi une influence sur le mode de reconnaissance des protéines Hox. Il est connu que, pour d'autres complexes ADN-protéines, la flexibilité de l'ADN, son accessibilité et la forme du sillon, influencent la fixation des complexes (Merabet and Mann, 2016). Ce phénomène est aussi observable pour les complexes ADN-Hox.

La régulation du gène *forkhead* (*fkh*), par la protéine Hox Scr, en est un exemple illustratif. L'enhancer *fkh250* contient un site de fixation PBC-Hox, reconnu par l'hétérodimère Scr/Exd. Dans cette étude, une séquence consensus pour ce site (*fkh250con*) de fixation a été créée. Il faut noter que tous les complexes PBC-Hox peuvent se lier à cette séquence, contrairement à la séquence *fkh250*, spécifique du complexe Scr/Exd (Mann et al., 2009). Des structures cristallographiques ont révélé des contacts ADN-protéine supplémentaires, pour le complexe Exd-Scr-*fkh250*, absents en présence de la séquence *fkh250con* (**Figure 22A et B**). Ces contacts sont établis par le bras N-terminal de l'HD de Scr, ainsi qu'un résidu présent dans la région de liaison (linker) entre le motif YPWM et l'HD (**Figure 19A et Figure 22B**). Ces deux chaînes d'a.a sont insérés dans le petit sillon du site de fixation *fkh250* (Joshi et al., 2007). Le petit sillon concerné est significativement plus étroit, que celui observé dans la région analogue, *fkh250con* (**Figure 22A et B**). Cela suggère qu'une différence subtile dans la structure de l'ADN peut participer à la spécificité de fixation des protéines Hox. Dans ce

contexte, l'interaction entre Scr et Exd est requise pour le positionnement des résidus dans le petit sillon. La liaison paralogue-spécifique de Scr, sur le site *fkf250*, dépend de trois caractéristiques distinctes : (1) une structure particulière de la double hélice d'ADN ; (2) des résidus paralogue-spécifiques dans l'HD de Scr et d'un linker qui s'insère dans cette structure ; (3) l'interaction Scr/Exd (Mann et al., 2009).

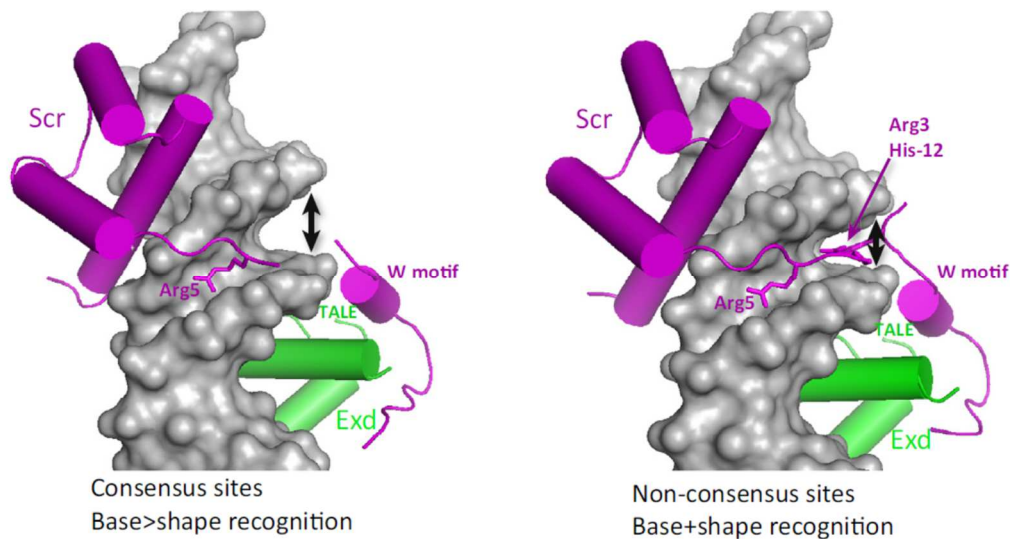


Figure 22 : Spécificité de Scr/Exd pour l'enhancer *fkf250*. Structures 3D illustrant la reconnaissance du site de fixation non-paralogue-spécifique (*fkfcons*, à gauche) et du site paralogue-spécifique (*fkf*, à droite), par la protéine Hox Scr et son cofacteur Exd. La fixation des complexes Scr/Exd sur le site *fkf* implique des résidus supplémentaires (Arg3 et His-12) et la reconnaissance d'un petit sillon plus étroit (doubles flèches noires). Les coordonnées proviennent de Protein DataBase (PDB), structures 2r5y et 2r5z, respectivement. D'après (Merabet and Mann, 2016).

Cet exemple ne peut être généralisé sans preuves expérimentales. Cependant, quelques connaissances indiquent la possibilité d'une telle généralisation. En effet, les bras N-terminaux et les régions linker, sont conservées au cours de l'évolution, de manière paralogue-spécifique (Joshi et al., 2007; Morgan et al., 2000). De plus, une autre structure PBC-Hox : Pbx-Hoxa9, ancre également des résidus du bras N-terminal dans le petit sillon de l'ADN (LaRonde-LeBlanc and Wolberger, 2003). Ces contacts sont aussi dépendants de l'interaction YPWM-Pbx. La distance entre le motif YPWM et l'HD varie d'une protéines Hox à l'autre et serait, par conséquent, un bon candidat pour moduler la fixation des protéines Hox, sur le séquences cibles (Kornfeld et al., 1989; Merabet et al., 2003; O'Connor et al., 1988).

Ces informations vont dans le sens d'une généralisation potentielle de la reconnaissance du petit sillon de l'ADN par les complexes PBC-Hox, afin d'accroître leur spécificité d'action, ce qui a récemment été confirmé pour plusieurs protéines Hox (Kribelbauer et al., 2020).

La comparaison de la structure (rayons X) de complexes trimériques AbdB-Exd-ADN, où le site de fixation est légèrement variable, a permis l'identification

d'un mécanisme d'encodage des diverses affinités, dans les séquences d'ADN. En effet, dans cette étude, les deux sites de plus forte affinité, ont une largeur du petit sillon qui correspond à celle de l'ADN présent dans les structures cristallines, où AbdB-Exd est fixé. Et inversement pour les deux sites de plus faible affinité. Les différences d'affinité, sont la conséquence de différences intrinsèque dans la forme de l'ADN, avant fixation des protéines (Zeiske et al., 2018).

Plus généralement, les protéines Hox antérieures préfèrent les séquences d'ADN avec deux petits sillons de largeurs minimales. En revanche, les protéines Hox postérieures ont une préférence pour les séquences composées d'un seul petit sillon de largeur minimal (Abe et al., 2015; Slattery et al., 2011). Grâce à la comparaison des bras N-terminaux de toutes les structures disponibles des protéines Hox (AbdB, HoxA9, Ubx, Scr et HoxB1), une autre différence antérieur/postérieur apparaît. La conformation des bras N-terminaux à l'intérieur du petit sillon, n'est pas la même entre les protéines Hox antérieures et postérieures (Zeiske et al., 2018).

Enfin, l'accessibilité à la chromatine et la sélection des cibles par les protéines Hox sont fortement liées. Dans un contexte de chromatine fermée, la fixation des protéines Hox est hautement sélective, alors que dans un environnement chromatinien ouvert, la fixation des Hox se montre peu sélective (fixation par la plupart ou la totalité des protéines Hox). Les régions de liaison insérées dans la chromatine relativement inaccessible sont, en général, de haute affinité. Les sites de faible affinité sont souvent retrouvés dans une chromatine plus accessible. Ceci est cohérent avec le modèle de spécificité des Hox, basé sur la capacité des différentes protéines Hox, à entrer en compétition avec la chromatine et ainsi accéder, ou non, aux sites de fixation (Porcelli et al., 2019).

Outre un rôle important des protéines de la famille TALE pour la reconnaissance des sites de fixation des protéines Hox, ces cofacteurs permettent aussi de réguler correctement l'état « activation » ou « répression » du gène cible. Dans ce cas, comment le choix entre activation et répression est-il fait ? Une possibilité serait l'utilisation, par les protéines Hox, de répresseurs dédiés. Une autre possibilité, de plus en plus étudiée, est celle de la présence de cofacteurs additionnels, liés aux éléments ciblés par les protéines Hox. Enfin, comme vu précédemment, les cofacteurs TALE ne sont pas toujours requis pour assurer les fonctions spécifiques des protéines Hox. Celles-ci établissent donc des partenariats, avec d'autres types de cofacteurs, indépendamment de la liaison avec les protéines PBC.

II.2.4. Les autres cofacteurs des protéines Hox

Des approches par génétique et protéomique indiquent que le panel de collaborateurs potentiels des protéines Hox est vaste (Kataoka et al., 2001; Luo et al., 2004; Plaza et al., 2008; Prévôt et al., 2000). Ceci est cohérent avec le fait que les protéines Hox jouent des rôles dans de nombreux contextes développementaux. Employer différents types de cofacteurs semble être une option adéquate.

II.2.4.1. Les protéines Hox en partenariat avec la machinerie transcriptionnelle

Il y a plus de trente ans déjà, des données génétiques ont identifié des mutations de l'ARNPII qui phénotypaient un mutant de *Ubx* (haploinsuffisance) (Mortin et al., 1992). Par conséquent, *Ubx* pourrait interagir directement avec des composants de la machinerie de transcription. Plus récemment, il a été montré que le motif HX de la protéine Hox Antp, établit des contacts fonctionnels avec Bip2 (TAF3, TATA-binding-associated-factor), un facteur associé à la fixation sur la boîte TATA (Prince et al., 2008). Le complexe Mediator, composant majeur de la machinerie de l'ARNPII, est aussi lié aux protéines Hox. Les sous-unités Med13 et Med19 sont requises pour le fonctionnement des protéines Hox (Boube et al., 2000; Boube et al., 2014).

A l'échelle du génome, la formation du complexe de pré-initiation de l'ARNPII (PIC), survient sur la majorité des gènes, qu'ils soient activement, peu ou non transcrits. De tels gènes montrent une accumulation de l'ARNPII en aval du TSS. Les ARNPII sont engagées dans la transcription mais dans un état de pause (Adelman and Lis, 2012). Ce phénomène facilite l'induction rapide de la transcription des gènes développementaux, ou en réponse à un stimulus extérieur. C'est aussi un avantage pour le réglage fin, du niveau d'expression des gènes. Il est intéressant de noter que les protéines Hox ont un rôle dans la sortie de pause de l'ARNPII. Avant l'arrivée de la protéine HoxB1 sur le promoteur du gène *HoxB1*, le complexe Pbx/Meis et l'ARNPII, déjà en place, ne sont pas suffisants pour lancer la transcription. Le recrutement ultérieur de la protéine HoxB1, autorise le lancement de l'ARNPII en pause, provoquant l'initiation de la transcription (Rezsohazy et al., 2015a).

Un autre exemple montre que AbdA et *Ubx* présentent des motifs ciblés par les facteurs de pause de la transcription M1BP et le facteur GAGA (GAF). M1BP contrôle majoritairement des gènes impliqués dans des processus cellulaires de base, alors que le facteur GAF est plutôt impliqué dans le contrôle de gènes morphogénétiques et développementaux (Li and Gilmour, 2013). GAF s'associe à la chromatine compactée pour la répression et participe au remodelage des nucléosomes pour l'activation (Adkins et al., 2006). La fixation de AbdA sur les gènes ciblés par M1BP implique une réduction d'ARNPII en pause et une transcription plus productive. L'opposé est observé pour les gènes ciblés par GAF

(Zouaz et al., 2017). L'association des protéines Hox à ce type de FT permet donc d'introduire des états distincts de pause de l'ARNPII et ainsi d'impacter la régulation de la transcription au niveau du promoteur.

Les protéines Hox interagissent aussi à d'autres niveaux de la transcription. Un article publié cette année, a décrit des interactomes de Ubx, au sein de différents tissus de l'embryon de drosophile (évoqué précédemment, dans la partie sur la BioID). De manière surprenante, la plupart des interacteurs ne sont pas spécifiques du tissu et sont actifs dans de nombreux types cellulaires. En effet, la majorité des partenaires de Ubx sont des protéines ubiquitaires, qui font partie de complexes généraux du contrôle de l'expression des gènes. Cela inclue des régulateurs de l'environnement chromatinien, des protéines du complexe Polycomb et des régulateurs majeurs du traitement des ARNm et de la traduction en protéines (Carnesecchi et al., 2020). Ubx semble donc agir comme une plateforme protéique flexible, qui intègre de multiples informations de régulation. Le domaine désordonné des protéines Hox, est un candidat potentiel pour bâtir les contacts avec le large pannel de partenaires révélés. Les microenvironnements, décrits dans la première partie, renforcent cette hypothèse (Tsai et al., 2017).

II.2.4.2. Les protéines Hox en proche relation avec les régulateurs de la chromatine

Il existe un chevauchement entre les sites de fixation de FT et l'accessibilité à la chromatine (Li et al., 2011). Dans le cas de la régulation du gène *Distalless (Dll)*, les protéines Ubx et AbdA sont capables de moduler la conformation de la chromatine, via l'interaction avec le facteur GAF cité précédemment ou l'association avec des nucléosomes contenant le variant d'histone H2Av (Agelopoulos et al., 2012). Ces résultats suggèrent un rôle des protéines Hox, dans la définition des caractéristiques de la chromatine, cruciales pour la régulation génique. De plus, chez le poisson zèbre, le complexe HoxB1-Pbx-Meis lié au promoteur du gène HoxB1, recrute l'histone déacétylase (HDAC)/CBP. Le taux d'acétylation des histones H4, est ainsi, précisément contrôlé (Choe et al., 2009).

II.2.4.3. Les cofacteurs modificateurs des protéines Hox

Les fonctions versatiles des protéines Hox sont aussi le résultat de modifications post-traductionnelles. Par exemple, Ubx possède une isoforme phosphorylée (Gavis and Hogness, 1991), de même pour Antp et Scr. Cette modification entraîne des changements dans l'activité de ces protéines Hox (Berry and Gehring, 2000; Jaffe et al., 1997). Chez les vertébrés, la protéine HoxA10 réprime la transcription de gènes spécifiques dans les cellules myéloïdes indifférenciées. La phosphorylation/déphosphorylation de certaines tyrosines de l'HD de la protéine HoxA10, régule son activité. En effet, la phosphorylation des tyrosines empêche l'interaction entre l'HD et un autre domaine de la protéine

HoxA10. Ceci diminue la capacité de fixation de HoxA10 à l'ADN et implique un taux de transcription accru des gènes cibles de HoxA10 (Eklund et al., 2002).

Les modifications post-traductionnelles comme l'ubiquitylation, la sumoylation et l'acétylation, sont de plus en plus étudiées. Leur impact sur l'activité des protéines Hox est encore à la base de nombreux questionnements (Rezsohazy et al., 2015a).

II.2.4.4. Les petits motifs comme plateforme de régulation des interactions

Lors de la description des interactions PBC-Hox, dans une partie précédente, la « dispensabilité » du motif YPWM ou HX a été évoquée. De plus, une mutation dans ce motif peut aussi renforcer des interactions, voire, en créer de nouvelles. Un gain d'interaction est observé chez plusieurs protéines Hox de drosophile, souris et anémone (Hudry et al., 2012; Hudry et al., 2014). Cette propriété est donc conservée au sein du règne animal. Le motif HX apparaît également comme un acteur limitant le nombre d'interactions ; sa mutation entraînant un nombre accru et/ou de nouvelles interactions pour plusieurs protéines Hox et différents types de FT dans l'embryon de drosophile (Baëza et al., 2015a). Ces observations peuvent par exemple expliquer que la mutation du motif HX dans la protéine AbdA convertit son activité de répresseur en une activité d'activateur du gène cible *decapentaplegic (dpp)* (Merabet et al., 2011).

Le motif HX des protéines Hox, n'est pas toujours requis pour établir des interactions avec leurs cofacteurs. En effet, d'autres petits motifs ou SLiMs (Short Linear Motifs) sont aussi des acteurs importants de l'assemblage des protéines Hox avec leurs partenaires. Les régions désordonnées des protéines sont les plus enrichies en SLiMs (Trudeau et al., 2013) (**Figure 23**). Ces motifs ont une longueur comprise entre cinq et dix résidus, et sont particulièrement impliqués dans les interactions faibles et transitoires, avec des cofacteurs spécifiques du contexte cellulaire (Davey et al., 2015; Dinkel et al., 2016). Les SLiMs participent à l'auto-inhibition des interactions avec l'ADN et d'autres protéines (Lee et al., 2005; Padrick and Rosen, 2010; Pufall and Graves, 2002), ce qui est cohérent avec les observations faites avec la mutation du motif HX des protéines Hox.

Les protéines Hox Ubx et AbdA possèdent un autre petit motif, en aval de l'HD, appelé UbdA. Comme le motif HX, le motif UbdA permet l'interaction avec le cofacteur canonique Exd (Foos et al., 2015; Merabet et al., 2007). Il est aussi requis pour limiter le potentiel d'interaction de ces deux protéines Hox (Baëza et al., 2015a). Les SLiMs HX et UbdA, sont utilisés comme des modules d'interaction, spécifiques du contexte cellulaire. Les SLiMs sont aussi sujets aux modifications post-traductionnelles. C'est un autre mécanisme potentiel, pour accroître la spécificité des protéines Hox dans différents contextes.

Il est possible de prédire la présence de SLiMs dans les protéines. Par exemple, la protéine HoxB3 humaine contient au moins dix SLiMs prédits (Figure 23). Des expériences de délétion ont permis de mettre en évidence la présence d'au moins trois petits motifs d'interaction avec les protéines TALE (Dard et al., 2018). Il y a donc une redondance avec le motif HX. De plus, l'utilisation de ces SLiMs dépend du contexte cellulaire associé. Cette situation n'est pas exclusive de la protéine HoxB3, d'autres protéines Hox humaines possèdent également des motifs alternatifs au motif HX (Dard et al., 2018).

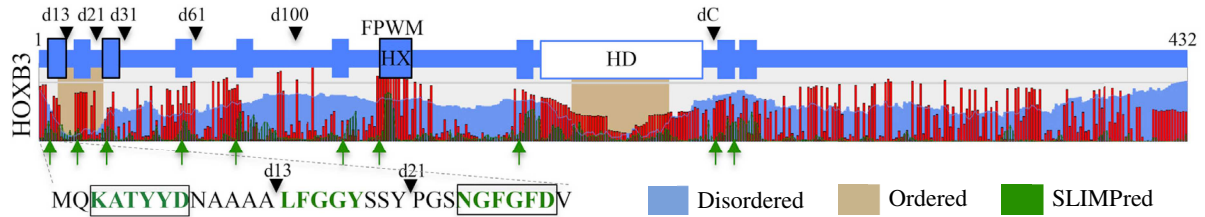


Figure 23 : Propriétés d'interactions alternatives entre les protéines TALE et la protéine HoxB3 humaine. Organisation globale de la protéine HoxB3 avec les SLiMs prédits conservés (pics verts et flèches vertes), les domaines structurés (boîtes marrons), et les longues régions désorganisées (pics bleus). Les pics rouges indiquent le niveau de conservation de chaque résidu au sein des espèces vertébrées. En haut de la figure, une représentation schématique de la protéine HoxB3 montre les délétions générées pour identifier les régions d'interaction avec la famille TALE. Les SLiMs sont schématisés par des boîtes bleues. Les boîtes entourées en noir indiquent les SLiMs impliqués dans l'interaction HoxB3-TALE. La séquence de la partie N-terminale de HoxB3 est montrée avec deux motifs d'interaction alternatifs avec les protéines TALE (KATYYD et NGFGFD entourés). Les prédictions ont été obtenues via SliMPred0.9 : (http://bioware.ucd.ie/~compass/biowareweb/Server_pages/slimpred_legacy.php).

D'autres SLiMs, non identifiés à ce jour, ont probablement un rôle dans l'enrichissement de l'interactome des protéines Hox.

II.2.4.5. Recrutement de molécules non-protéiques par les protéines Hox

La forte plasticité de l'HD des protéines Hox est aussi reflétée par leur capacité à recruter des molécules non protéiques comme les ARN non codants (ARNnc) (Lam et al., 2014). Les ARNnc sont impliqués dans le contrôle de la transcription, par remodelage de la chromatine (Cajigas et al., 2015; Zhang et al., 2013) et par les modifications épigénétiques (Mercer and Mattick, 2013). Ils modulent aussi l'activité transcriptionnelle de protéines à HD, dont les protéines Hox. Les ARNnc sont reconnus comme étant des régulateurs critiques, de l'expression des gènes, au cours du développement et dans les maladies (Lam et al., 2014). De plus, les longs ARNnc (lncRNAs) pourraient être important pour l'organisation subnucléaire des facteurs impliqués dans la régulation de la transcription (Bobola and Merabet, 2017a). L'activité des protéines à HD, comme les protéines Hox, serait donc fortement influencée par leur localisation spatiale au sein du noyau. Ce qui est cohérent avec les nombreux corps nucléaires qui contiennent des FT (voir la partie précédente sur la localisation des FT).

III. La microscopie pour une meilleure visualisation des processus de régulation génique

III.1 La microscopie super-résolution: un outil indispensable pour dépasser la limite de diffraction

Les échelles spatiales et temporelles des processus et des molécules associées au bon fonctionnement des cellules, couvrent plusieurs ordres de grandeur (Figure 24A et B). Par exemple, les changements de conformation des protéines s'opèrent à une échelle inférieure à la milliseconde (ms) (Turkowsky et al., 2016) (Figure 24B). Afin de répondre aux demandes énergétiques de la cellule, les molécules comme l'ATP, qui ont une taille d'environ un nanomètre (nm) (Figure 24A), diffusent dans tout le volume cellulaire (du micromètre (μm) au millimètre (mm)) en quelques ms. Des machineries composées de plusieurs complexes protéiques réalisent et contrôlent des processus cellulaires qui peuvent durer de quelques secondes à quelques heures. Par exemple, la synthèse d'une protéine de centaine d'a.a par les ribosomes est menée en quelques secondes (Figure 24B), alors que la réplication du génome entier de la bactérie *Escherichia coli* requiert quarante minutes (min) (Turkowsky et al., 2016) (Figure 24B).

L'étude qualitative et quantitative de processus qui impliquent des entités de tailles diverses et qui se déplacent à des vitesses variables, nécessite des capacités d'observation spécifiques de chaque contexte. Pour accéder à ce type de données, l'instrumentation utilisée doit procurer une vue tridimensionnelle (3D) tout en gardant des détails suffisants pour une exploration à haute résolution. En fonction de la question biologique posée, il est important de trouver le bon équilibre entre résolution temporelle et résolution spatiale. De plus, les échantillons biologiques étant fragiles, il est nécessaire d'utiliser une technique la moins invasive possible.

De nos jours, la microscopie à fluorescence apporte une nouvelle vision, ou une visualisation plus précise, des processus cellulaires. Notamment grâce au développement de la microscopie de super-résolution (SR). Ce type de microscopie permet de zoomer sur des structures intracellulaires, auparavant non résolues. Elle est aussi applicable aux cellules vivantes, ainsi qu'aux tissus et même aux organismes multicellulaires (Hell et al., 2015; Liu et al., 2015). La microscopie SR contourne la limite de diffraction (Figure 24A) par différents mécanismes. Ces méthodes ne sont pas encore des techniques de routine, mais certaines sont déjà en voie de le devenir.

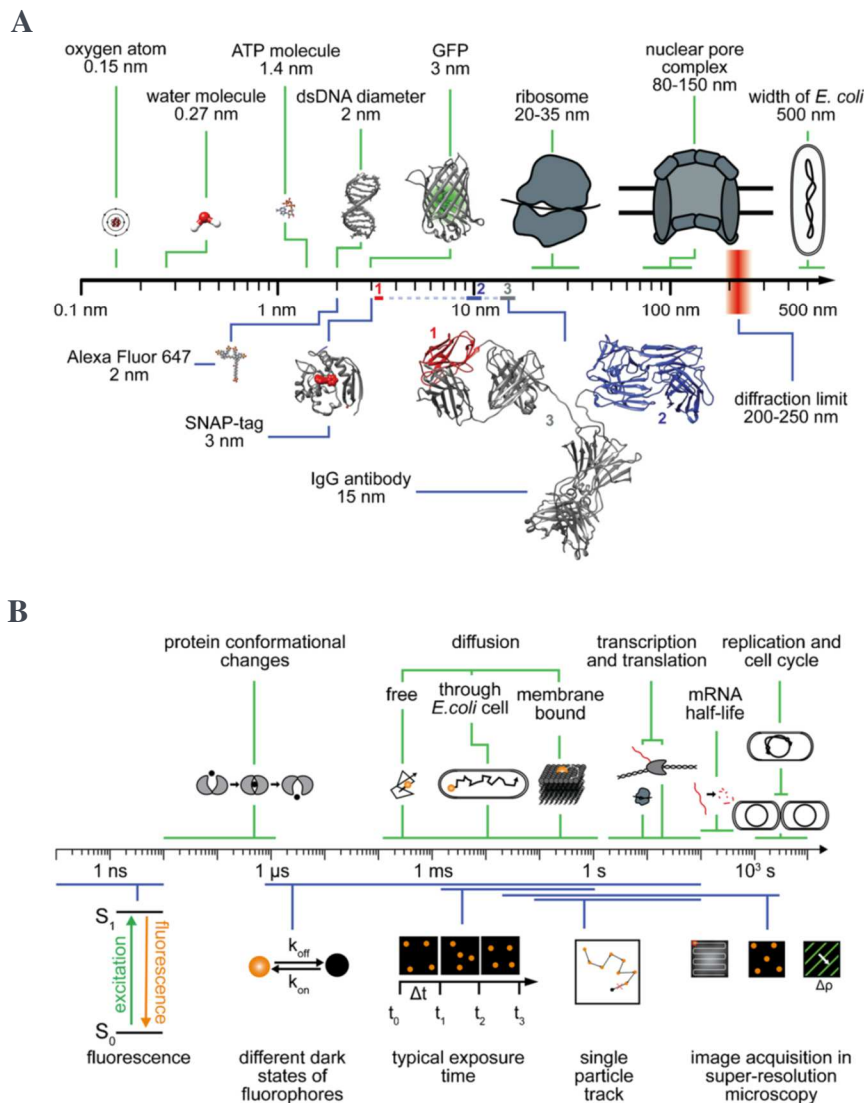


Figure 24 : Echelles spatio-temporelles en science de la vie et en microscopie. (A) Différentes structures submicrométriques sont représentées sur l'axe. Au-dessus de l'axe, en vert, sont représentées des structures biologiques de diverses tailles (de 0,15 nm à 500 nm). En-dessous de l'axe, en bleu, sont représentées des structures « techniques » utilisées en microscopie de fluorescence. L'anticorps IgG (15 nm, (3)) contient deux structures : la région de fixation de l'antigène (10 nm, en bleu (2)) et le domaine variable unique (3 nm, en rouge, (1)). Les nanobodies des camélidés sont issus de ce domaine. Les structures proviennent de la plateforme PDB (GFP 1KYS, IgG 1IGT, SNAP 3KZZ, DNA 4LEY) et PubChem (ATP CID 5957, Alexa Fluor 647 CID 102227060). **(B)** Echelles temporelles de divers processus biologiques majeurs (au-dessus de l'axe, en vert) et d'événements physiques ainsi que certaines échelles temporelles associées à quelques procédures de microscopie (en-dessous de l'axe, en bleu). Schéma issu de (Turkowsky et al., 2016).

Afin de répondre au mieux à l'hypothèse de recherche, il est important de choisir le plan expérimental et l'instrumentation les plus appropriés. Dans cette partie, je focaliserai sur les trois techniques de microscopie SR les plus répandues, à savoir : la microscopie à épuisement d'émission stimulée (STED) (Klar and Hell, 1999), la microscopie par illumination structurée (SIM) (Gustafsson, 2000), et la microscopie de localisation (SMLM) (Betzig et al., 2006; Heilemann et al., 2008; Rust et al., 2006).

III.1.1 Le principe de la microscopie super-résolution

L'image d'un point à travers l'objectif d'un microscope n'est pas un point mais une tâche, appelée « Point Spread Function » (PSF) ou fonction d'étalement du point (Figure 25A). La résolution maximale d'un système optique a été définie en 1896 par Lord Rayleigh. Elle correspond à la distance minimum (d) entre deux objets pouvant être séparés en deux sources individuelles (Figure 25B). Pour un

microscope à fluorescence, cette distance d dépend de deux critères : la longueur d'onde de la lumière (λ) et l'ouverture numérique (ON) de l'objectif utilisé (Rayleigh, 1896). Plus l'ON de l'objectif est grande, plus la distance d diminue, c'est-à-dire que la résolution augmente. Les longueurs d'onde plus grandes, comme l'infrarouge, augmentent la distance d , donc diminuent la résolution, mais pénètrent mieux dans les tissus. La microscopie confocale améliore la résolution grâce à l'introduction d'un pinhole dans le chemin optique. Celui-ci permet d'arrêter la lumière hors focus, visible en microscopie d'épifluorescence et qui provoque un effet « flou » sur l'image (Figure 25C). L'intensité de fluorescence est plus faible mais l'avantage pour l'imagerie 3D est instantané (Konig, 2000).

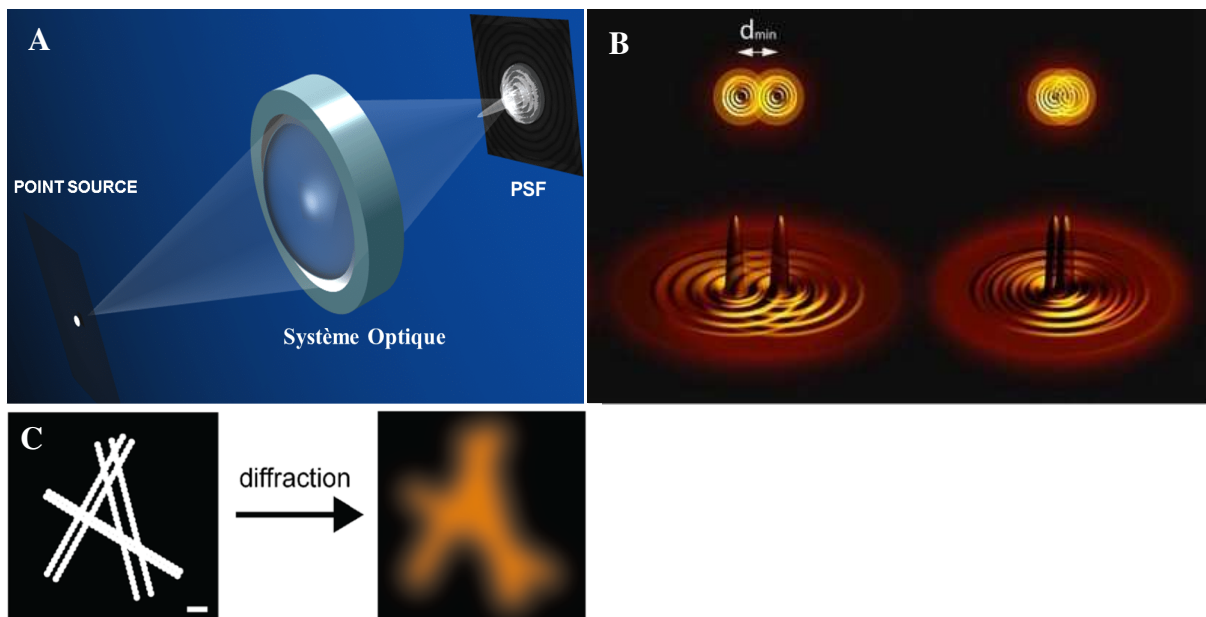


Figure 25 : Principe de la limite de diffraction. (A) L'image d'un point source formée par un système optique dans le plan de l'image est appelée « Point Spread Function » (Fonction d'étalement du point). L'image subit les effets de la diffraction. Schéma issu de www.gatinel.com (B) La tâche d'Airy (PSF) correspond à l'image d'un point lumineux par un microscope. Les deux tâches d'Airy correspondant aux deux objets sont séparées lorsque le maximum d'intensité de l'un correspond au minimum de l'autre. D'après la thèse de (D'Orlando, 2015). (C) A gauche, schéma de six filaments décorés de fluorophores (points blancs rapprochés). Barre d'échelle = 200 nm. A droite, image typique de cette structure obtenue par microscopie en fluorescence conventionnelle. La résolution de l'image est limitée par la diffraction de la lumière.

La microscopie SR n'utilise pas de pinhole pour bloquer la lumière hors focus. En effet, les techniques comme la microscopie STED ou SIM se servent d'illuminations structurées pour moduler la fluorescence des molécules et éviter l'émission de fluorescence simultanée. Pour la microscopie SMLM, la méthode est basée sur l'activation stochastique des fluorophores.

III.1.2. Les méthodes de SR les plus utilisées : STED, SIM, SMLM

III.1.2.1. Stimulated-emission depletion microscopy (STED)

Pour les microscopes à balayage laser, comme le confocal, le volume d'illumination correspond à la taille de la PSF, c'est-à-dire 250 nm en largeur/longueur (axes X et Y) et 500 nm en hauteur (axe Z). En théorie, il est possible de contourner la limite de diffraction via la réduction de la taille du volume d'illumination. En effet, dans cette situation, seule une fraction des fluorophores est éclairée simultanément. Par conséquent, tous les fluorophores n'émettent pas leur fluorescence en même temps, ce qui permet d'augmenter la résolution (image moins « floue »). C'est la méthode utilisée pour la microscopie STED.

Pour cette technique, deux lasers simultanés sont nécessaires. Le laser d'excitation (comme pour la microscopie confocal), qui possède son propre volume d'illumination et le laser de déplétion (**Figure 26**). Les molécules présentes à la périphérie du volume d'excitation peuvent être éteintes, de manière sélective et réversible, par un laser de forte intensité (laser de déplétion) dont la forme de sa PSF est en « donut ». La superposition des PSF d'illumination des deux lasers forment un volume d'illumination réduit, provoquant le gain de résolution final (**Figure 26**). L'échantillon est scanné par ce volume d'illumination restreint, offrant une image super-résolue, en direct. Aucune étape post-acquisition n'est nécessaire pour atteindre cette résolution, contrairement au SIM et SMLM. La microscopie STED, comme la microscopie confocal, permet d'effectuer des sections optiques afin d'obtenir la reconstruction 3D de l'échantillon (Turkowsky et al., 2016). La résolution de ce système est directement proportionnelle à l'intensité du laser de déplétion. Les intensités nécessaires sont de l'ordre de 0.1–1 GWcm⁻², contre quelques kW/cm² pour la microscopie confocal ou de localisation (SMLM) (Blom and Widengren, 2017; Vicidomini et al., 2011).

Les fluorophores sont aussi sujets à de nombreux cycles d'excitation/déexcitation à de fortes intensités laser. Les fluorophores utilisés pour le STED doivent donc être « extraordinairement » photostables. Sur des échantillons très stables comme le diamant, la résolution peut atteindre moins de 10 nm (Rittweger et al., 2009). Cependant, une telle intensité de laser ne peut être appliquée sur des échantillons biologiques. La résolution atteinte est limitée entre 30 et 100 nm en raison du photobleaching des fluorophores utilisés et de la phototoxicité pour les cellules (Vangindertael et al., 2018). A ses débuts, la microscopie STED nécessitait un type de laser pulsé avec un taux de répétition très haut et donc coûteux (Klar et al., 2000). Depuis quelques années, la plupart des microscopes STED sont devenus plus accessibles, grâce à l'utilisation de laser pulsés avec des fréquences de répétitions plus faibles et donc moins coûteux. Les

parties optiques qui procurent la forme en donut du laser de déplétion ont aussi été simplifiées (Reuss et al., 2010; Wildanger et al., 2009a).

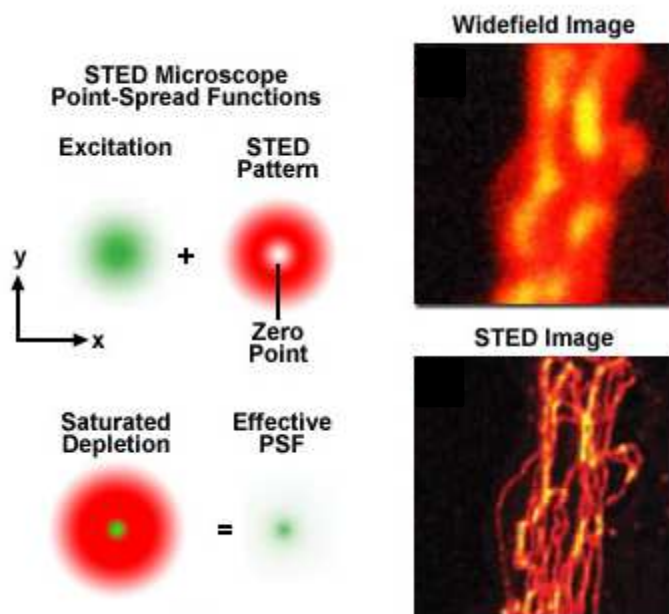


Figure 26 : Principe de la microscopie STED. A gauche. Le volume d'illumination est produit par le laser d'excitation (en vert) et le laser de déplétion (en rouge). Le volume d'illumination du laser vert d'excitation est superposé à celui du laser de déplétion rouge (en forme de donut). Cela réduit drastiquement la PSF finale (Effective PSF). A droite. Comparaison d'une image en microscopie à champ large conventionnelle (en haut) et d'une image en microscopie STED. La structure imagée correspond à des microtubules marqués par l'Alexa Fluor 594. Cet exemple illustre le gain de résolution apporté par la microscopie STED. Schéma issu de : <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/tutorials/superresolution/stedconcept/indexflash.html>

L'un des premiers exemples de microscopie STED appliquée à un système biologique, détaille les neurones de l'hippocampe qui expriment la protéine fluorescente jaune (YFP). La résolution latérale atteinte est de 70 nm et la résolution temporelle de 20 secondes par image (Nägerl et al., 2008). L'imagerie a permis de révéler les changements morphologiques des épines dendritiques lors de l'ajout d'un composé chimique. La survie des neurones n'a pas été affectée par l'intensité du laser de déplétion (réduite pour l'imagerie live, mais impact la résolution atteinte). Dans une autre étude, la microscopie STED autorise la visualisation du regroupement de la synaptotagmine à l'intérieur de vésicules synaptiques. Dans ce cas, la résolution atteinte est de 45 nm (Willig et al., 2006b).

Plus la profondeur de l'échantillon est grande, plus la forme en donut du laser de déplétion se détériore. L'impact de l'épaisseur du tissu, sur la diffraction de la lumière dans l'échantillon, est donc plus visible qu'en microscopie confocale (HELL et al., 1993). De même pour le « mismatching » des indices de réfraction entre le milieu de montage, le verre et le milieu d'immersion de l'objectif. Il est donc recommandé d'utiliser des milieux de montage et d'immersion contenant tous deux du glycérol pour diminuer les différences d'indice de réfraction (Berning et al., 2012). L'observation par microscopie STED peut s'effectuer jusqu'à des profondeurs de 15 μm au sein des tissus. Ceci a été montré par une étude de la mobilité dendritique de neurones exprimant la YFP, dans le cerveau d'une souris anesthésié mais vivante (Berning et al., 2012). Les variants de la YFP et les fluorophore organiques correspondants sont les plus utilisés en microscopie STED.

Cependant, la GFP peut aussi convenir mais avec une résolution plus faible, autour de 70 nm (Willig et al., 2006a).

La microscopie STED multicolore est plus complexe. En effet, la plupart des systèmes STED multicolores, sont équipés d'un couple de laser excitation/déplétion pour chaque fluorophore (Figure 27A). Et chaque couple doit être parfaitement aligné dans le chemin optique. De plus, la résolution est différente dans chaque canal (Donnert et al., 2007) (Figure 27A). Malgré ces défis techniques, la microscopie STED deux-couleurs a permis de démontrer la colocalisation entre la synaptophysine (ATTO532) et la synaptotagmine (ATTO647N) dans les neurones en culture (Figure 27B). Les résolutions atteintes sont 25 nm pour le rouge et 65 nm pour le rouge lointain (Donnert et al., 2007). Dans le même article et avec les mêmes fluorophores, les auteurs ont montré, pour la première fois, l'organisation de la protéine mitochondriale Tom20 en nanoclusters à l'intérieur de la mitochondrie. Dans ce cas, l'acquisition des deux couleurs séparément était nécessaire. Une étape post-acquisition était ensuite requise pour fusionner les deux canaux. Cette méthode n'est donc pas adaptée à l'observation des dynamiques cellulaires. Plus récemment, un système de microscopie STED a été développé pour exciter et déléter deux (Göttfert et al., 2013; Tønnesen et al., 2011), voire quatre (Winter et al., 2017) fluorophores distincts, par la même paire de laser d'excitation et déléter.

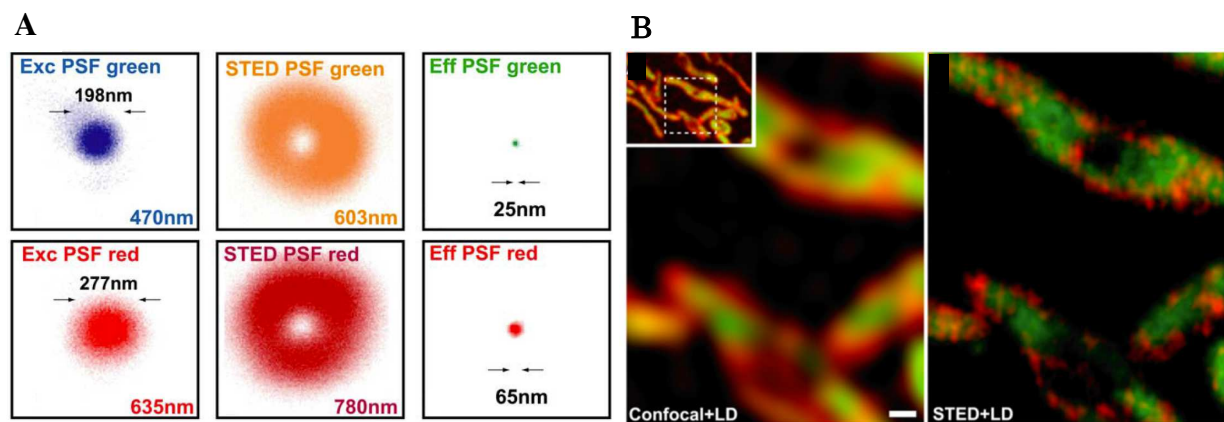


Figure 27 : Microscopie STED deux-couleurs. (A) La tâche bleue et le donut orange représentent les PSF du laser d'excitation et du laser de déléter dans le canal vert, respectivement. Les PSFs des lasers d'excitation et de déléter pour le canal rouge sont représentés par la tâche rouge et le donut rouge foncé. Les deux panneaux de droite montrent les PSF effectives qui résultent de la superposition du volume d'illumination des lasers d'excitation et de déléter. La résolution atteinte pour le canal vert est de 25 nm contre 65 nm dans le canal rouge. (B) Mitochondries avec un marquage contre une ATP synthase (F₁F₀ATP synthase) en vert et le complexe TOM en rouge. Contrairement au confocal (gauche), le STED (droite) résout les clusters de complexes TOM. L'encadré en haut à gauche représente l'image à faible grossissement. Le cadre en pointillés blancs montre la zone montrée dans les images zoomées. Barre d'échelle = 200 nm. Figure adaptée de l'article (Donnert et al., 2007).

La microscopie STED peut être améliorée pour l'imagerie 3D, où la résolution axiale approche la résolution latérale. Deux pièces optiques permettent d'implémenter la forme en donut sur les deux axes. Une légère perte de résolution est observée dans la direction latérale (45 nm au lieu de 20 nm), au profit de la résolution axiale qui atteint 108 nm, une amélioration d'un facteur 5 (Wildanger

et al., 2009b). Dans les tissus fixés, la microscopie STED a permis la visualisation du réseau d'actine des synapses à une profondeur de 120 μm et avec une résolution entre 60 et 80 nm (Urban et al., 2011). Cette année, une publication a montré la possibilité de combiner la microscopie 3D-STED avec la modalité deux-couleurs (Fellermann et al., 2020).

Des alternatives à la microscopie STED permettent de contourner le problème de photobleaching provoqué par l'intensité forte du laser de déplétion. Notamment, la microscopie RESOLFT (reversible saturable optical fluorescence transitions) qui utilise des fluorophores photo-réversibles (rs), comme l'EGFP réversible (rsEGFP). Les intensités nécessaires sont de l'ordre du W/cm^2 jusqu'au kW/cm^2 . Cette technique atteint une résolution latérale de 65 nm et une résolution axiale entre 110 et 150 nm (Testa et al., 2012).

Pour améliorer la résolution temporelle, une méthode de STED parallélisée a été développée. Entre quatre (Bergermann et al., 2015) et 2000 (Bergermann et al., 2015) centres de déplétion sont mis en parallèle pour augmenter la vitesse d'acquisition. Cela permet d'agrandir le champ d'observation avec une résolution de 80 nm. Ce type de méthode a été appliqué pour l'imagerie du squelette de kératine des grandes cellules Ptk2 (Chmyrov et al., 2013).

III.1.2.2. Microscopie par illumination structurée (SIM)

La microscopie SIM utilise des motifs régulièrement espacés, dont la fréquence et la phase sont connues, pour illuminer l'échantillon (Gustafsson, 2000; Jost and Heintzmann, 2013). L'éclairage structuré augmente virtuellement l'ouverture numérique de l'objectif. Comme expliqué précédemment, ceci améliore la résolution. Pour comprendre le fonctionnement de la microscopie SIM, il faut connaître les bases sur l'espace de Fourier. Un signal sinusoidal, sur une dimension (1D), est caractérisé par trois propriétés : la fréquence, l'amplitude et la phase. Celles-ci peuvent être tracées sur un graphique représentant le domaine de fréquence. Ce graphique est appelé transformée de Fourier du signal d'origine. Le même principe peut être appliqué aux images 2D, qui sont une superposition de fréquences spatiales avec diverses orientations. Dans une transformée de Fourier équivalente à l'image d'origine, la distance à partir du centre vers l'extérieur indique la fréquence alors que l'intensité illustre l'amplitude (**Figure 28A**, carré de droite). La transformée de Fourier est un processus réversible. Il est possible de passer de l'image d'origine à la transformée et inversement.

Les détails d'une image sont des fréquences hautes, par conséquent localisées aux extrémités de la transformée (Vangindertael et al., 2018) (**Figure 28B**). Un microscope possède une ON limitée en taille ce qui cause la perte des détails dans l'image. Cependant, il est possible d'illuminer l'échantillon avec un

motif connu et ce, dans différentes directions. Le motif est décalé et pivoté à plusieurs reprises. Ce processus génère des interférences appelées franges de Moiré (**Figure 28C**). Ce motif permet de transformer les hautes fréquences (détails) en fréquences plus basses, détectables par le système optique. Comme le motif d'illumination est connu, les fréquences originales de l'échantillon peuvent être retrouvées par calculs mathématiques. Dans l'espace de Fourier, cela revient à étendre l'ouverture d'origine dans la direction du motif d'illumination. Le déplacement du motif permet donc d'étendre l'ouverture dans toutes les directions de l'espace de Fourier (**Figure 28D-G**) (Gustafsson, 2000).

La résolution latérale est multipliée par deux en comparaison à la microscopie confocale. La résolution axiale est améliorée (d'un facteur 2 également), si le motif utilisé est aussi structuré dans cette direction. Dans ce cas, on parle de 3D-SIM (Chen et al., 2020; Gustafsson et al., 2008). La 3D-SIM a révélé l'ultrastructure de la chromatine de noyaux eukaryotes dont les chromosomes ont été marqués par hybridation in situ en fluorescence (FISH) (Markaki et al., 2012).

Les échantillons préparés pour la microscopie classique confocale peuvent être utilisés pour la microscopie SIM également. Les fluorophores utilisés doivent être photostables et très brillants pour des résultats optimaux. La plupart des fluorophores modernes conviennent pour cette technique (Vangindertael et al., 2018) (**Tableau 2**). Les PFs sont plus sensibles au photobleaching, cependant, une étude sur le rôle de la protéine SNARE VAMP8 dans l'activité cytotoxique des lymphocytes, montre que leur utilisation est possible en microscopie SIM (Marshall et al., 2015).

Une étape post-acquisition est nécessaire pour générer l'image finale. Des logiciels de reconstruction d'images simples d'utilisation existent. La microscopie SIM est donc l'une des techniques de super-résolution les plus accessibles. Les images obtenues pour le cytosquelette d'actine de cellules HeLa illustrent le gain de résolution atteignable (d'un facteur 2) (Gustafsson, 2000). L'imagerie en cellules vivantes est aussi réalisable (Hirvonen et al., 2009; Kner et al., 2008) ainsi qu'en multicolore (Frolikova et al., 2020; Schermelleh et al., 2008). Il est même possible d'observer des organismes vivants (York et al., 2012). Cependant, la profondeur maximale observable se situe à environ 20 μm de la surface. En effet, les motifs d'illumination se dégradent au cours de la traversée de l'échantillon (Mandula et al., 2012).

Il est important de noter que la présence d'artefacts au sein de l'image est commune. Ils proviennent d'une acquisition ou d'algorithmes imparfaits (Turkowsky et al., 2016). Ils doivent être pris en compte, évités ou corrigés. Par

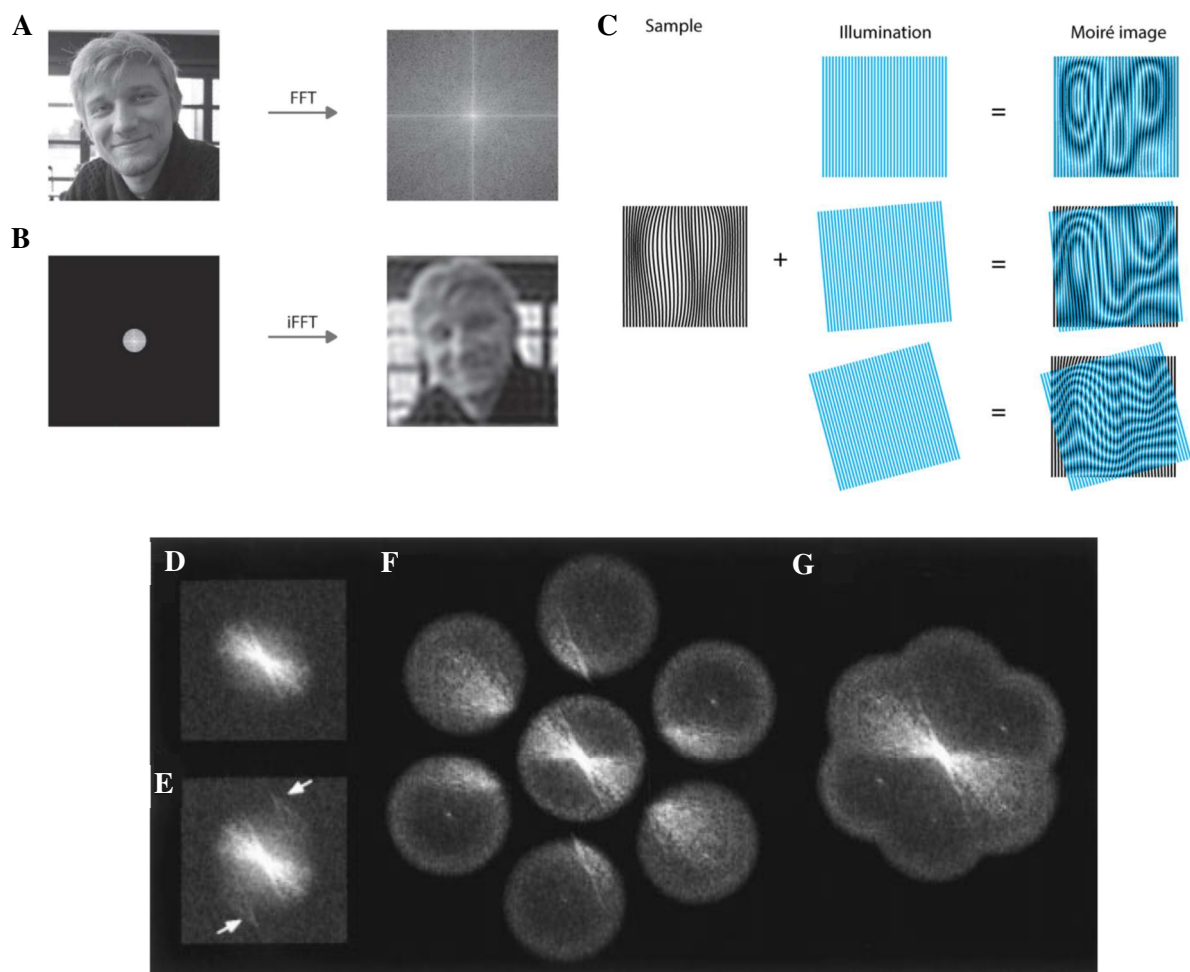


Figure 28 : L'espace de Fourier et les franges de Moiré. (A) Photographie d'une personne (à gauche) et l'image correspondante en transformée de Fourier (à droite). (B) Les informations de basses fréquences se trouvent au centre de la transformée de Fourier, alors que les informations de hautes fréquences (détails) se trouvent vers l'extérieur. Si les hautes fréquences de l'images sont éliminées dans la transformée (image de gauche), les détails sont perdus dans l'image correspondante (image de droite). (C) Lorsqu'un échantillon contenant des caractéristiques avec de hautes fréquences spatiales (à gauche) est illuminé par un motif d'illumination connu et périodique (au centre), des franges de Moiré apparaissent (à droite). Ces franges ont une fréquence spatiale plus basse qui peuvent être résolues par le système optique. Le changement d'orientation du motif d'illumination (au centre) change l'apparence des franges de Moiré et permet de révéler les détails dans toutes les orientations de l'espace. Illustrations issues de (Vangindertael et al., 2018). (D-E) Transformées de Fourier d'une image d'un objet en microscopie par illumination normale (D) et celle du même objet en microscopie par illumination structurée (E). Les deux images contiennent des informations provenant uniquement de la région observable. Cependant, avec l'illumination structurée, l'image inclue des informations supplémentaires (flèches blanches) superposées aux informations de base. (F) A partir de sept ou neuf images de ce type, sept composants avec différentes informations peuvent être séparés par le calcul et recombinaés à leurs propres positions (G). Les données recombinaées sont ensuite re-transformées dans l'espace réel. La reconstruction contient le double d'informations en comparaison à l'image conventionnelle, ce qui double la résolution de l'image. Issu de (Gustafsson, 2000).

exemple, des bandes/rayures dans l'image SIM reconstruite émergent du photobleaching, de la dérive de l'échantillon (drift) ou encore des vibrations. Des différences d'indices de réfraction créent des halos ou un dédoublement de certains objets de l'image (Schaefer et al., 2004). Comme évoqué précédemment, plusieurs déplacements des motifs sont nécessaires pour compléter les détails de l'image. Cela requiert des temps d'exposition prolongés à des intensités laser relativement hautes. La phototoxicité est une réelle préoccupation de cette technique. En effet, la lumière induit des dommages cellulaires, notamment lors de l'observation

d'échantillons *in vivo* (Marx, 2013; Waldchen et al., 2015). Des améliorations sur ces différents points contribuent à la réduction du temps d'acquisition et de reconstruction, jusqu'à quelques secondes seulement (Vangindertael et al., 2018).

STED								
	Name	Appl.	Exc (nm)	Em (nm)	STED (nm)	Structure	ϵ ($M^{-1} * cm^{-1}$)	ϕ
Fluorescent proteins	Citrine	[23]	516	529	595	m	77 000	0.76
	eYFP	[30]	514	527	598	m	84 000	0.61
	Dronpa	[31]	503	517	488 (405)	m	95 000	0.85
	eGFP	[30]	488	510	575	m	55 000	0.6
Organic dyes	SiR (§)	[87]	652	674	775	r	100 000	0.32
	ATTO 647N	[22]	646	664	750	r	150 000	0.65
	AberriorStar635P	[29]	635	651	750-780		125 000	0.92
	ATTO 594	[29]	603	626	775	r	120 000	0.85
	Alexa Fluor 594	[88]	590	617	690	r	92 000	0.66
	ATTO 565	[22]	564	590	640-660	r	120 000	0.9
	Aberrior Star 488	[89]	503	524	585-605		64 500	0.89
	Alexa Fluor 488 (§)	[23]	495	519	592	r	83 000	0.92
	Aberrior Star 440SXP	[89]	432	511	590-620		33 000	0.57

Tableau 2 : Liste des fluorophores recommandés et prometteurs pour la microscopie super-résolution STED. Issu de (Turkowskyd et al., 2016).

Pour améliorer la résolution temporelle et ainsi autoriser l'étude de mécanismes dynamiques, une autre génération de motifs d'illumination a été développée. Les grilles de motifs sont remplacées par des modulateurs spatiaux de lumière (SLMs). Un SLM génère différents motifs en quelques millisecondes. Ceci permet d'atteindre une vitesse de quatorze image par seconde (Fiolka et al., 2012; Kner et al., 2008). Grâce à cette méthode, l'imagerie 3D à l'intérieur d'organismes vivants comme la drosophile ou le nématode, devient envisageable (Förster et al., 2014; Shaw et al., 2015). De plus, récemment, le développement d'un traitement d'image et d'un système SIM rapide ont permis d'obtenir l'image super-résolue en temps réel en cellules vivantes (Mueller, 2019).

Enfin, une technique nommée SSIM pour SIM saturé a été développée pour dépasser le facteur 2 de résolution du SIM classique. La résolution atteinte est de 50 nm mais ne peut être appliquée à des échantillons biologiques (Gustafsson, 2005).

III.1.2.3. Single-molecule localization microscopy

Deux points sources plus proches que la largeur de leur PSF ne sont pas distinguables (Vangindertael et al., 2018). Cependant, une PSF isolée peut être

décrite par une distribution d'intensité Gaussienne. Ce procédé permet d'identifier le centre exact de l'émetteur correspondant, même s'il se situe entre deux pixels de la caméra. Si la majorité des émetteurs fluorescents de l'échantillon se trouvent dans un état noir et qu'un petit sous-ensemble de cette population (en général <1%) est rallumée, la probabilité d'avoir deux émetteurs à proximité immédiate est très faible. Dans ces conditions, les fluorophores de l'échantillon « clignotent » (blinking) et chaque émetteur unique est localisé avec précision (**Figure 29**). Différents algorithmes de localisation existent. Ils sont adaptés pour la vitesse, la 2D, la 3D ou encore aux images avec un faible rapport signal sur bruit (SNR) (Sage et al., 2015). La localisation des molécules uniques est effectuée sur des dizaines de milliers d'images, jusqu'à l'épuisement des molécules fluorescentes ou l'apparition de la structure observée (**Figure 29**). La superposition de toutes les images permet de reconstruire l'image finale super-résolue. Cette approche est appelée microscopie de localisation de molécules uniques (SMLM) (Vandenberg et al., 2015) (**Figure 29**).

De nouvelles revues présentent une vue d'ensemble des fluorophores photoswitchables adaptés à la microscopie SMLM (Li and Vaughan, 2018; Zhang and Raymo, 2020). La microscopie SMLM est un outil précieux pour l'étude de structures et/ou de fonctions biologiques à l'échelle nanométrique. La résolution atteinte est étroitement liée à la précision de localisation (Deschout et al., 2014). Celle-ci dépend en grande partie du nombre de photons détectés pour chaque émetteur. Le bruit de fond, la brillance des fluorophores et le photobleaching sont donc des paramètres limitants (Shaner et al., 2005).

Une illumination spéciale appelée fluorescence par réflexion interne totale (TIRF) limite le bruit de fond présent dans les échantillons (Axelrod, 2016). L'illumination TIRF est effectuée à un angle critique où la lumière est réfléchiée par l'interface verre/échantillon. Seule des ondes évanescentes pénètrent dans l'échantillon et excitent les fluorophores présents en surface, sur une épaisseur de 150 à 250 nm (Tokunaga et al., 2007). Par conséquent, les fluorophores dans la « partie haute » de l'échantillon ne sont pas excités et ne produisent pas de fluorescence hors focus (bruit de fond). Cette technique est applicable à des échantillons fins comme une couche de cellules en culture, des bactéries ou des organelles isolées. Pour des échantillons plus épais, une alternative existe : l'illumination en feuillet optique hautement incliné et laminé (HILO) (Tokunaga et al., 2007). Cette méthode a mis en évidence l'interaction entre l'importine- β -GFP et les complexes des pores nucléaires, à une profondeur de plusieurs micromètres, au sein d'embryons de *C.elegans* (Tokunaga et al., 2007).

Il est possible de calculer la résolution/précision de localisation en fonction du nombre de photons détectés. En théorie, pour une résolution de 80 nm, 100 photons par émetteur sont requis. Si le nombre de photons détectés augmente, par

exemple 440 photons, la précision de localisation atteint 20 nm (Deschout et al., 2014). En plus du nombre de photons détectés, une densité suffisante d'émetteurs est indispensable (Deschout et al., 2014; Legant et al., 2016). Cette densité a également une limite supérieure. En effet, trop d'émetteurs mènent à une résolution moindre car le maintien d'un clignotement suffisamment espacé devient difficile (Hess et al., 2006; Legant et al., 2016).

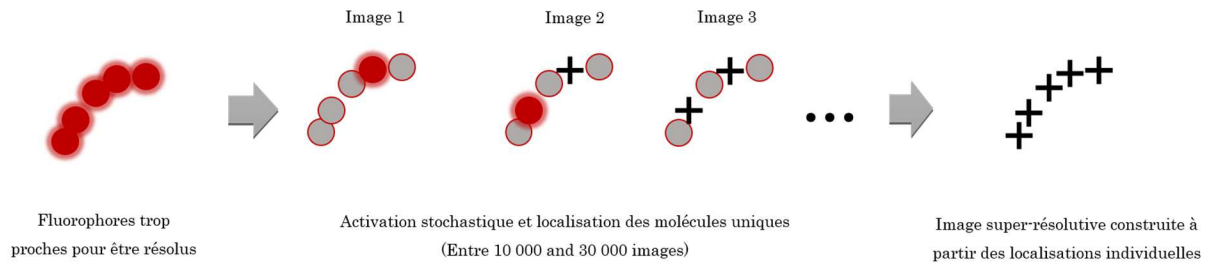


Figure 29 : Principe de la microscopie SMLM. Les points rouges avec un halo représentent les PSF de fluorophores excités. Lorsqu'ils sont trop proches les uns des autres et émettent de la fluorescence en même temps, leurs PSF respectives se chevauchent. Par conséquent, les objets ne sont pas séparables les uns des autres provoquant une image floue (à gauche). Cependant, l'activation stochastique d'une portion des molécules fluorescentes (au centre) permet de localiser avec précision l'émetteur. En effet, dans ce cas, tous les fluorophores n'émettent pas leur fluorescence simultanément mais de manière décalée dans le temps. Ainsi, la probabilité que deux fluorophores très proches émettent en même temps est faible. Le processus d'activation/excitation est répété sur des dizaines de milliers d'images. L'ensemble des localisations individuelles permet de reconstruire l'image finale super-résolue (à droite).

L'instrumentation pour la microscopie SMLM demande des sources lasers puissantes et un objectif avec une large ON. Les caméras de détection sont souvent très sensibles et permettent la détection de quelques milliers ou centaines de photons. Divers systèmes SMLM prêts à l'emploi sont accessibles. L'ajout d'éléments optiques autorisent la microscopie SMLM en 3D : les lentilles cylindriques modifient la forme de la PSF en fonction de la position axiale (Z), l'utilisation de deux objectifs pour créer des interférences du signal caractéristiques de la position en Z et encore d'autres méthodes de modulation de phase ont été développées (Liu et al., 2015).

Il existe deux types principaux de microscopie SMLM. La différence entre les deux réside dans la stratégie pour atteindre le clignotement des fluorophores. Pour la microscopie de localisation par photo-activation (PALM), le clignotement est atteint grâce à l'activation des PFs par un laser UV (Betzig et al., 2006), alors que la microscopie optique stochastique de reconstruction (STORM) est basée sur le clignotement inhérent ou induit de fluorophores organiques (Heilemann et al., 2008; Rust et al., 2006; Vangindertael et al., 2018).

La microscopie PALM

Ce type de microscopie super-résolution repose sur l'utilisation de protéines fluorescentes photo-commutables/switchables. Ce phénomène peut être irréversible (off \rightarrow on) ou réversible (on \leftrightarrow off). Par exemple, la GFP photo-activable (PA-GFP), l'une des premières en son genre (Patterson and Lippincott-

Schwartz, 2002), est activée suite à une exposition à la lumière UV, puis excitée par une source laser cyan-vert. Après l'émission des photons, la PA-GFP se retrouve dans un état noir définitif (bleaching irréversible). La protéine fluorescente Dronpa est aussi photo-activable mais peut effectuer plusieurs cycles d'activation/excitation (réversible) avant de s'éteindre définitivement (Flors et al., 2007). Enfin, il existe des PFs photo-convertibles. La plus connue/utilisée est la protéine mEOS, chaque conversion du vert au rouge (irréversible) est considérée comme un évènement de clignotement, détecté dans le canal rouge (McKinney et al., 2009). Certaines protéines fluorescentes photo-activables (PA-FPs) requièrent des conditions spécifiques pour un repliement et un clignotement correct. Par exemple, la PAmCherry a besoin d'oxygène pour son activation, elle ne peut donc être utilisée dans un milieu privé d'oxygène (Endesfelder et al., 2011; Subach et al., 2009a). Une vue d'ensemble des PA-FPs communément exploitées est disponible dans différents articles (Dedecker et al., 2013; Nienhaus and Ulrich Nienhaus, 2014; Shcherbakova et al., 2014). Un aspect peu connu des PFs classiques, comme la GFP et ses dérivés, dont la YFP, présentent aussi des caractéristiques de clignotement (Dickson et al., 1997). La GFP et la YFP ont déjà été exploitées en SMLM mais peu fréquemment (Jusuk et al., 2015; Lemmer et al., 2008; Lemmer et al., 2009; Lukeš et al., 2018).

Les réseaux de kératine et de vimentine ont été imagés dans des cellules HeLa, en microscopie PALM. La PF mEOS2 a permis d'atteindre une résolution de 11 nm (McKinney et al., 2009) (Figure 30). Shroff et al. ont développé le PALM en cellules vivantes pour imager les processus dynamiques qui surviennent à des échelles de temps similaire à la durée d'une acquisition PALM (entre 10 minutes et quelques heures). Cette technique a permis de capturer les dynamiques d'adhésion de cellules par la visualisation de la distribution de la paxillin-EosFP au cours du temps (Shroff et al., 2008). Le réarrangement de la paxillin se produit à raison de 120 nm par minute, ce qui permet de visualiser le processus à une résolution de 60 nm (Shroff et al., 2008).

De manière plus générale, cette méthode est appelée sptPALM (single particle tracking PALM) (Manley et al., 2008). Après le calcul des localisations, les trajectoires des molécules uniques sont tracées, permettant le suivi des molécules (tracking) uniques au sein de l'échantillon. Cela indique si une molécule diffuse rapidement ou si elle est plutôt immobile (Heidbreder et al., 2012). Le tracking des molécules est aussi possible en PALM deux-couleurs. Les observations ont mis en évidence la diffusion des molécules EGFR au sein des domaines membranaires riches en clathrine (Subach et al., 2010). D'autres exemples montrent que le sptPALM peut s'adapter à une grande diversité de systèmes biologiques (Frost et al., 2010; Rossier et al., 2012; Sanamrad et al., 2014).

Différentes couleurs de PA-FPs permettent de marquer différentes protéines simultanément. Cela rend possible l'étude d'interactions potentielles en PALM multicouleurs (Nienhaus and Ulrich Nienhaus, 2014). L'activité transcriptionnelle dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana* a été étudié par microscopie PALM deux couleurs et en 3D. Cela a permis de déterminer les distributions et le nombre de copie de l'ARN polymérase ainsi que certains FT (Schubert and Weissart, 2015).

Bien que plus rare, la microscopie PALM est aussi adaptable à l'imagerie des tissus et d'organismes entiers comme l'embryon de drosophile. En 2015, un chapitre a décrit un protocole précis, de la préparation des échantillons à l'imagerie PALM et l'analyse des images (Truong Quang and Lenne, 2015). Dans cette étude, la protéine d'adhésion inter-cellulaire E-cadhérine est fusionnée à la PF mEosFP1. Les images ont été acquises en illumination HILO. Ce protocole peut aussi être utiliser pour d'autres organismes comme le poisson zèbre et le nématode (Truong Quang and Lenne, 2015).

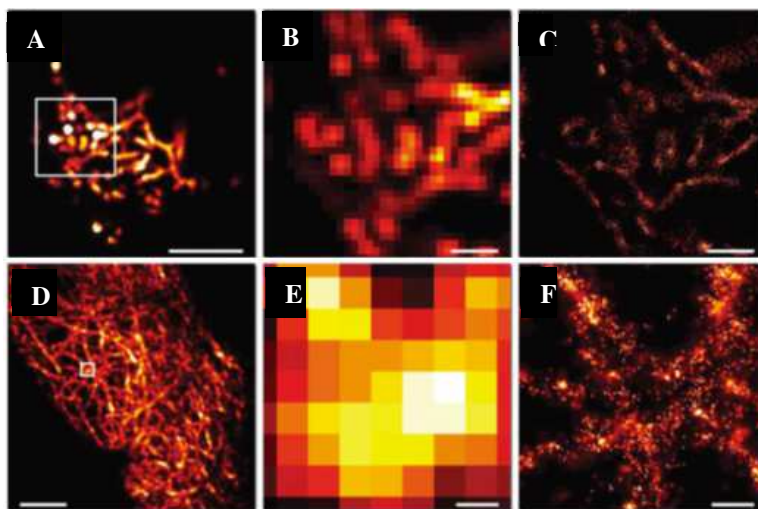


Figure 30 : Exemples de deux protéines de fusion avec mEos2 observées dans les cellules HeLa. Les panneaux de gauche (A et D) montrent des images en microscopie conventionnelle avec une illumination TIRF. Au centre, les images correspondent à un zoom des régions encadrées sur les images précédentes (B et E). Les images correspondantes en microscopie PALM sont montrées dans les panneaux de droite (C et F). Le gain de résolution est flagrant en comparant les images (B) et (C) ou (E) et (F). (A-C) La protéine mEos2 est fusionnée à la vimentine. (D-F) La protéine mEos2 est fusionnée à la kératine. Barres d'échelle (A et D) = 5 μ m. Barres d'échelle (B et C) = 1 μ m. Barres d'échelle (E et F) = 200 nm. Images issues de (McKinney et al., 2009).

La microscopie STORM

Introduite par le groupe de Xiaowei Zhuang, la microscopie STORM utilise des fluorophores organiques pour marquer les structures d'intérêt. Les fluorophores organiques clignotent spontanément lorsqu'ils sont dans un milieu de montage spécifique. Il existe de nombreux milieux pour le STORM mais l'objectif est identique. Le milieu permet de dégrader les espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites par le passage de l'état excité à l'état relaxé des fluorophores. Sans ROS, l'émission de fluorescence est plus stable et l'échantillon mieux préservé (DeRosa and Crutchley, 2002; Van De Linde and Sauer, 2014). Pour éviter le photobleaching causé par l'accumulation des ROS, l'oxygène est dégradé par un système enzymatique, comme la combinaison de la glucose-oxydase avec du

glucose (GLOX), ajouté au milieu (Kishino and Yanagida, 1988). Cependant, la réaction GLOX diminue le pH de la solution au cours du temps. Mais d'autres milieux STORM plus récents n'ont pas ce problème (Provost et al., 2019; Senavirathne et al., 2015). De plus, le Vectashield, milieu de montage très populaire, est aussi un candidat pour induire le clignotement de certains fluorophores (dont l'Alexa Fluor 647), même si le mécanisme sous-jacent n'est pas encore identifié (Arsié et al., 2020; Olivier et al., 2013).

Il est important de noter que les dérivés de cyanines (Cy) comme Cy2, Cy3, Cy5 et l'Alexa Fluor 647 clignotent de façon optimale dans un milieu sans oxygène. Cependant, ce n'est pas le cas pour les rhodamines comme les Alexa Fluor 488, 555 et 568 ainsi que l'ATTO488 (Nahidiazar et al., 2016). Le même milieu ne peut donc être utilisé pour différents types de fluorophores. Le milieu est un paramètre important pour la microscopie STORM puisque le clignotement en dépend. Dans certains cas, l'exposition à la lumière UV est nécessaire pour déclencher le clignotement. Des revues existent déjà sur les différentes combinaisons de milieu et de fluorophores à utiliser pour le STORM (Endesfelder et al., 2011; Laine et al., 2015; Van De Linde et al., 2009; Van De Linde et al., 2011).

Deux possibilités existent pour le marquage des structures par les fluorophores organiques. L'immunomarquage de la protéine endogène ou l'expression d'une protéine de fusion dont le tag spécifique est reconnu par un petit peptide couplé au fluorophore. L'imagerie *in vivo* est seulement possible avec l'utilisation des tags, puisque l'immunomarquage requiert des étapes de fixation et de perméabilisation des cellules (Schnell et al., 2012). De plus, les anticorps primaires et secondaires ont chacun une taille non négligeable de 10 nm (Opazo, 2014). Cette distance supplémentaire est à prendre en considération lors de l'interprétation des structures. Quelques études ont montré l'avantage des anticorps de camélidés (nanobodies) pour améliorer le marquage (pénétration de l'anticorps et taille) (Deschout et al., 2014; Opazo, 2014; Ries et al., 2012). Par exemple, le développement de nanobodies anti-GFP ou anti-RFP est particulièrement intéressant. En effet, des banques de plasmide et de lignées cellulaires qui expriment la GFP ou la mCherry sont souvent accessibles. Les nanobodies étendent leur utilisation à la microscopie super-résolution (Ries et al., 2012). Pour les tags, les plus utilisés sont le tag tetracystéine (Griffin et al., 1998), le tag eDHFR (Miller et al., 2005), les tags CLIP et SNAP ou HaloTag (Gautier et al., 2008; Griffin et al., 1998; Keppler et al., 2004; Los et al., 2008), mais il en existe encore d'autres (Henriques et al., 2011). Je développerai l'utilisation de certains de ces tags plus loin.

La structure des pores nucléaires est généralement décrite grâce aux observations faites en microscopie électronique à transmission. La microscopie STORM permet aujourd'hui de révéler la structure symétrique du pore nucléaire

à l'aide d'un marquage de la protéine gp120. Dans cette étude, le fluorophore le plus utilisé en STORM : l'Alexa Fluor 647, a permis d'atteindre une résolution de 15 nm (Löschberger et al., 2012) (Figure 31).

Le réseau tridimensionnel des protéines structurales de l'axone : la spectrine, l'actine et l'adducine, a été observé en microscopie STORM 3D. La résolution offerte a montré la formation de structure en anneaux, répétées le long de l'axone (Xu et al., 2013). Une autre étude sur l'architecture des synapses tire profit du 3D-STORM trois-couleurs. Des analyses quantitatives de l'organisation de dix protéines synaptiques ont été réalisées sur des coupes de cerveaux de souris (entre 10 et 70 μm). Notamment, l'organisation entre les protéines Homer1, Bassoon et un troisième partenaire variable (Dani et al., 2010).

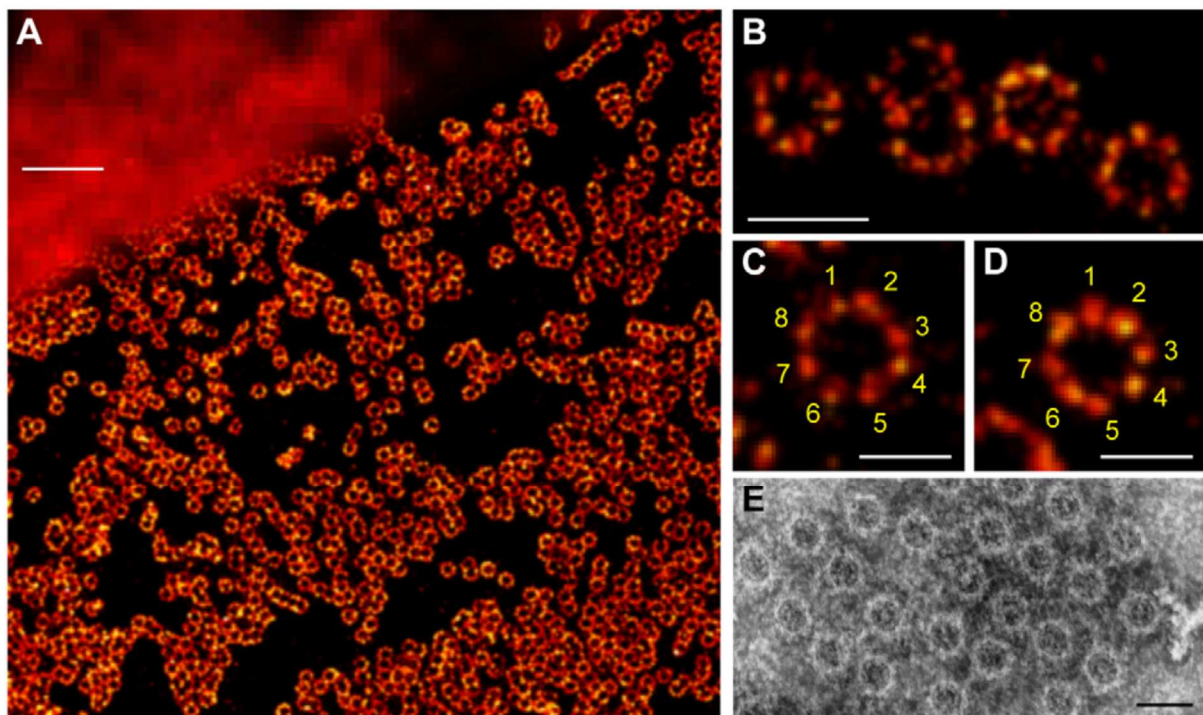


Figure 31 : Imagerie STORM de la protéine gp210 des complexes de pore nucléaire (NPC). (A) Comparaison entre l'image en microscopie conventionnelle (coin en haut à gauche) et l'image STORM. Les anneaux illustrent les protéines gp210 sur des enveloppes nucléaires isolées à partir d'ovocytes de *Xenopus laevis*. Un immunomarquage fluorescent contre les protéines gp210 avec un anticorps secondaire couplé à l'Alexa647 a permis de révéler ces structures. (B-D) Grossissement des structures circulaires fluorescentes pour souligner l'arrangement symétrique (8 répétitions) des protéines gp210 dans les pores nucléaires. (E) Les NPCs et leur structure symétrique sont généralement visualisés en microscopie électronique par coloration négative. Images issues de (Löschberger et al., 2012).

Une variante des méthodes SMLM : Point Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography (PAINT)

La méthode PAINT regroupe plusieurs types d'approches, toutes basées sur l'utilisation de bio-conjugués (Flors et al., 2009; Mizuno et al., 2011; Riedl et al., 2008; Sharonov and Hochstrasser, 2006). Les structures d'intérêt sont imagées par l'arrivée continue de sondes fluorescentes ou fluorogéniques (passage d'un état noir

à un état fluorescent suite à l'ajout d'un substrat spécifique), présentes dans la solution environnante (**Figure 32A**). La technique appelée DNA-PAINT est un cas particulier dans lequel, l'interaction de la sonde ADN fluorescente avec sa cible spécifique, dépend de la nature réversible de l'hybridation à l'ADN (Jungmann et al., 2014; Jungmann et al., 2016). C'est la nature réversible de ces interactions qui apparaît comme un clignotement lors de l'acquisition, non pas le comportement photo-physique des fluorophores (comme pour la microscopie PALM ou STORM). Les sondes synthétisées sont appelées Oligopaints et sont conçues pour être instable à température ambiante, élément indispensable pour un clignotement efficace. Tout organisme, dont le génome est connu, peut servir de modèle pour le design bioinformatique de ces oligonucléotides fluorescents. Le processus d'interaction réversible est théoriquement infini et n'est pas affecté par le photobleaching. De plus, le nombre de photons collectés est en principe illimité, ce qui améliore significativement la précision de localisation. L'acquisition des images est réalisée en illumination TIRF ou HILO afin de limiter au maximum le bruit de fond. Le taux de clignotement est facilement contrôlable car il dépend uniquement de la concentration en sonde et de leur diffusion. Ces paramètres sont prédictibles et donne un avantage considérable pour obtenir des informations quantitatives sur le nombre de sites de fixation sur une structure cible. Cela ouvre donc des possibilités pour l'imagerie quantitative d'échantillons biologiques (Jungmann et al., 2016).

Dans une étude récente, 2394 d'Oligopaints spécifiques de la région de 316 kb du complexe bithorax (BX-C) ont été synthétisés, pour leur visualisation dans des cellules de drosophiles. Des nanostructures de la chromatine, invisibles sur une image limitée par la diffraction, ont été révélées. En effet, dans une faible proportion de cellules, des filaments de chromatine, qui sortent du cluster central, forment des boucles (**Figure 32B**). Des régions plus courtes (5 kb d'une portion du locus HoxB chez la souris) peuvent aussi être marquées et révéler des structures d'une taille égale à 16 nm, avec seulement 106 Oligopaint (Beliveau et al., 2015) (**Figure 32C**).

La technique est aussi une alternative à l'immunomarquage classique. Les anticorps sont couplés à un fragment d'ADN complémentaire des Oligopaints. L'avantage majeur conféré par cette technique concerne l'imagerie multicolore. En effet, grâce à des cycles de marquage/rinçage, il est possible d'observer plusieurs structures avec des Oligopaints spécifiques mais couplés avec le même fluorophore (Jungmann et al., 2014) (**Figure 32D**).

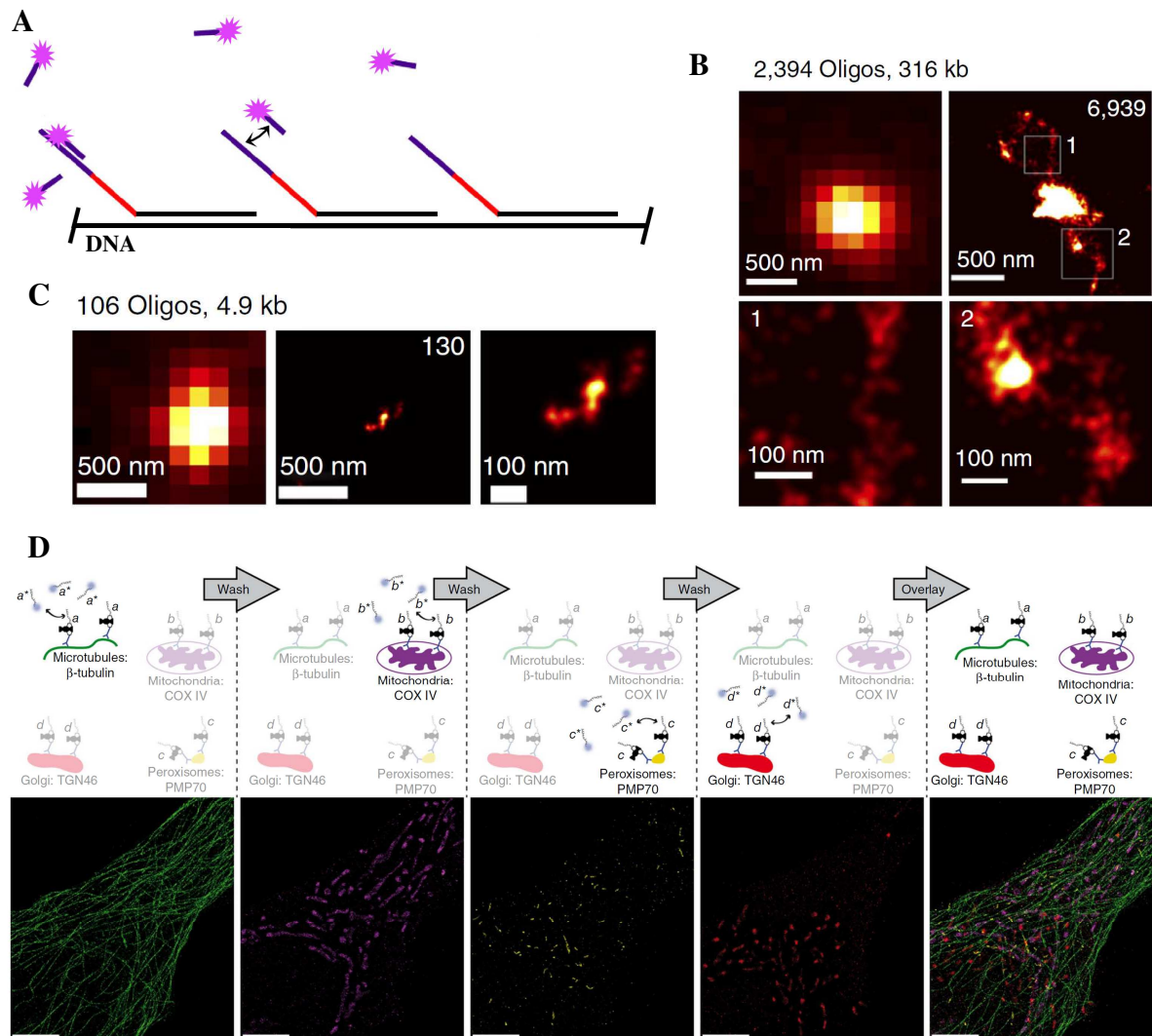


Figure 32 : Imagerie super-résolution avec Oligopaints et DNA-PAINT. (A) Schéma d'un marquage avec les sondes Oligopaints couplées à un fluorophore. Les sondes fluorescentes sont complémentaires d'une séquence ajoutée (en violet) à l'extrémité de la sonde spécifique de l'ADN d'intérêt (noir). La fixation des sondes fluorescentes est réversible et provoque le clignotement détecté pour la microscopie STORM. (B) Images du locus BX-C dans des cellules de drosophile. L'image en microscopie conventionnelle (en haut à gauche) correspond au même champ que l'image STORM (en haut à droite). En microscopie STORM, deux protrusions de l'ADN (boucles) sont visibles de part et d'autre du signal central intense. Ces structures sont invisibles en microscopie conventionnelle. (C) Images en microscopie conventionnelle (gauche) et STORM (centre et droite) d'une région de 5 kb (position 89B) dans une cellule de drosophile. Le panneau de droite représente un zoom du panneau central. Images issues de (Beliveau et al., 2015). (D) Imagerie super-résolution « Exchange-PAINT » multicolore en 2D sur cellules fixées. Chaque cible est marquée par un anticorps spécifique couplé à une « docking sequence » spécifique. Les sondes fluorescentes sont couplées à l'Atto655. A chaque étape (de gauche à droite), seule une sonde fluorescente spécifique est présente. Par exemple, pour la sonde a*, l'anticorps anti-tubuline est couplé à la « docking sequence a » et elle-seule est présente dans le milieu pour l'acquisition. Une étape de rinçage permet de passer à la structure b (ici les mitochondries) etc. Les structures c et d correspondent aux peroxisomes et l'appareil de Golgi, respectivement. La dernière image correspond à la superposition des quatre cibles où des fausses couleurs ont été ajoutées pour différencier chaque structure. Barres d'échelle = 5 μ m. (Jungmann et al., 2014).

III.2. La microscopie au service de la compréhension du génome et de sa régulation

III.2.1. L'organisation nucléaire à l'échelle super-résolutive

Les cellules eukaryotes possèdent un noyau de quelques micromètres contenant 2 mètres d'ADN linéaire. Malgré le remarquable degré de compaction, les informations contenues dans les séquences d'ADN sont maintenues. Des approches à large échelle ont suggéré une organisation hiérarchique de la chromatine : de la fibre de 10 nm jusqu'aux chromosomes qui occupent les territoires chromosomiques (TCs) de plusieurs mégabases (Mb), en passant par les boucles, les domaines topologiquement associés (TADs) et les compartiments A/B (A pour la chromatine ouverte et active et B pour la chromatine fermée et inactive transcriptionnellement) (Cremer and Cremer, 2001; Doğan and Liu, 2018) (**Figure 33**). Ce type de repliement a un impact sur les activités nucléaires comme la transcription, la réplication, le cycle cellulaire, la différenciation et le développement embryonnaire (Cardozo Gizzi et al., 2020).

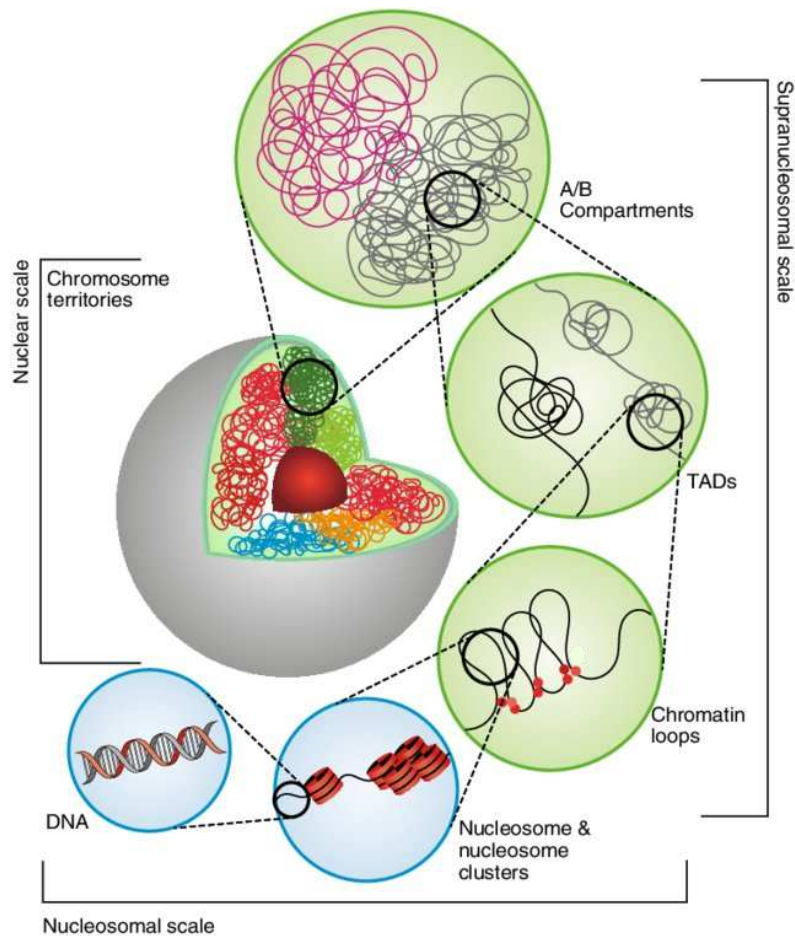


Figure 33 : Représentation schématique de l'organisation hiérarchique de la chromatine. Chaque chromosome occupe un sous-espace dans le noyau appelé « territoire chromosomique ». Ceux-ci peuvent être divisés en compartiments A et B distincts. Le compartiment A est enrichi en chromatine active alors que le compartiment B est enrichi en chromatine inactive. Les régions génomiques incluses dans les TADs montrent une interaction accrue en comparaison aux régions présentes dans d'autres TADs. Au sein des TADs, les éléments régulateurs forment des boucles pour atteindre leurs séquences cibles et contrôler leur activation/répression. L'ADN lui-même est enroulé autour des nucléosomes ce qui forme la chromatine. Schéma issu de (Doğan and Liu, 2018).

III.2.1.1. Le repliement de la chromatine et les régions chromosomiques à l'échelle super-résolutive

L'organisation de la chromatine

L'ADN génomique des cellules eukaryotes est enroulé autour d'un octamère d'histones. Ces protéines, chargées positivement, sont attirées par les charges négatives de l'ADN. Les histones H2A, H2B, H3 et H4 forment ensemble un nucléosome. Chaque nucléosome est relié à un autre par un linker d'ADN d'une taille variant entre 10 et 60 pb. Cet assemblage crée une structure répétée tous les 160-200 pb, appelée fibre de 10 nm. D'autres protéines, comme la protéine à hétérochromatine 1 (HP1) (Machida et al., 2018; Sanulli et al., 2019), se fixent sur cette fibre et ceci forme la chromatine (Olins and Olins, 2003). Les interactions décrites précédemment sont électrostatiques. Par conséquent, l'état électrostatique de l'environnement a une grande influence sur l'organisation et les dynamiques de la chromatine (Allahverdi et al., 2011; Dorigo et al., 2003; Hansen, 2002; Maeshima et al., 2018). L'interaction entre les nucléosomes permet la formation d'une fibre de chromatine de 30 nm de diamètre.

Au cours des dix dernières années, grâce au développement de l'imagerie et des technologies génomiques, la vision sur la chromatine est passée d'une structure statique et régulière à une structure dynamique et irrégulière (Cai et al., 2018; Nishino et al., 2012; Ohno et al., 2019; Ou et al., 2017; Ricci et al., 2015). La distribution des mouvements des nucléosomes montre deux populations distinctes : une fraction rapide et une fraction lente. La fraction rapide correspond aux nucléosomes en diffusion. Les interactions entre nucléosomes ainsi qu'avec d'autres protéines comme les lamines ou la cohésine organisent les nucléosomes dans les régions qui présentent une dynamique lente (Ashwin et al., 2019). Les nucléosomes sont regroupés en de multiples clusters, dont la taille typique est d'environ 220 nm de diamètre. A la périphérie du noyau et des nucléoles, le niveau de clustering est plus élevé. Cela est cohérent avec la préférence de l'hétérochromatine pour ces mêmes régions. Ce résultat est aussi corrélé à la cartographie obtenue dans l'étude de Lemaître and Bickmore en 2015 (Lemaître and Bickmore, 2015). Les mouvements locaux de la chromatine sont restreints par le complexe de la cohésine (Ashwin et al., 2019; Dion et al., 2013; Nozaki et al., 2017). Avec sa structure en anneau, il entoure les fibres de chromatine et autorise la formation de boucles ainsi que la cohésion entre chromatides sœurs (Nasmyth and Haering, 2005; Nishiyama, 2019) (**Figure 5**).

Plus récemment, une étude a montré le rôle de la machinerie transcriptionnelle dans le confinement local des mouvements de la chromatine dans le noyau. En effet, la déplétion de l'ARNPII, ou d'un autre facteur de régulation, provoque une augmentation de la motilité de la chromatine

(Nagashima et al., 2019), ce qui est cohérent avec le modèle des entreprises de transcription décrites dans la première partie de l'introduction.

Visualisation des dynamiques de la chromatine et des loci génomiques

Les mouvements à l'échelle du génome sont souvent étudiés via la fusion des histones avec une protéine fluorescente. Il est important de noter que les protéines fluorescentes ont une taille non négligeable et qu'elle pourrait avoir un effet sur le déplacement des histones. En super-résolution, le sptPALM est un candidat adapté au tracking des histones au sein des noyaux des cellules (Hihara et al., 2012; Nozaki et al., 2013). Une étude a combiné la microscopie PALM avec le tracking d'histones fusionnées à la PAmCherry, exprimées dans les cellules HeLa (Subach et al., 2009b). Les images acquises en illumination HILO ont permis d'examiner la répartition spatiale des histones dans les cellules vivantes.

Le mouvement de la chromatine peut aussi être observé grâce au système LacO/LacI-GFP. Les nombreuses insertions de répétitions de l'opérateur bactérien LacO, dans le génome, sont reconnues par la protéine LacI fusionnée à la GFP (Robinett et al., 1996). De même, le système ANCHOR (ou ParB/INT) suit la fixation des protéines ParB fluorescentes sur les séquences *INT* (< 1kb) insérées dans le génome (Chen et al., 2018; Germier et al., 2017; Saad et al., 2014) (**Figure 34**). Suite à la fixation spécifique de quelques protéines ParB, celles-ci s'oligomérisent autour du site de fixation et amplifie le signal. Récemment, le système CRISPR/dCas9 (deactivated Cas9) a permis de visualiser les mouvements de la chromatine à des sites spécifiques du génome (Chen et al., 2013; Gu et al., 2018; Ma et al., 2019).

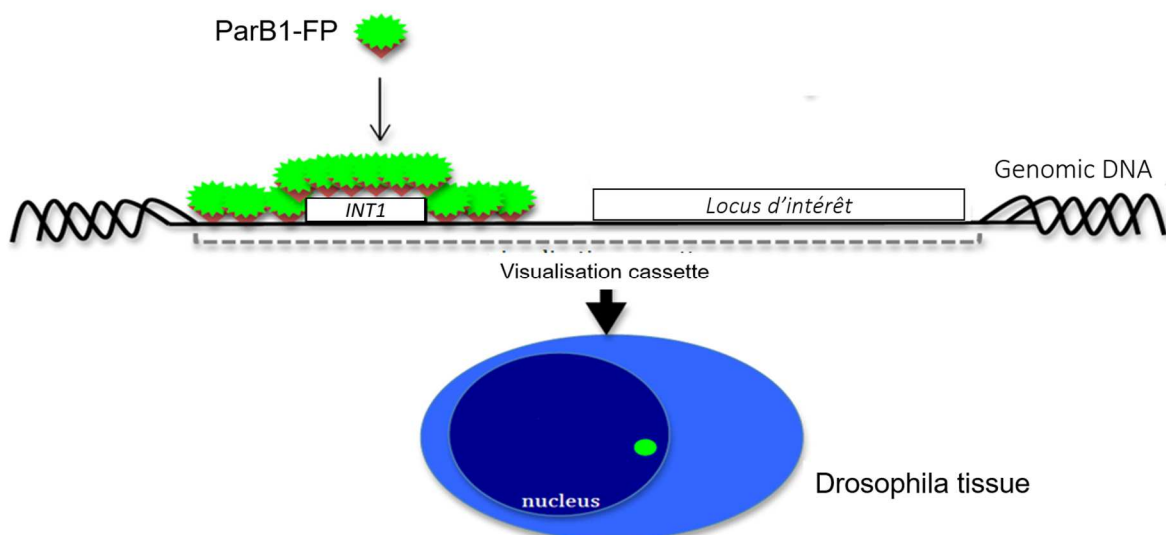


Figure 34 : Schéma explicatif du système ParB/INT. Les séquences *INT1* (trois répétitions en général) sont insérées à proximité du locus d'intérêt (par recombinaison chez la drosophile). Les protéines ParB1 fusionnées à une protéine fluorescente reconnaissent de manière spécifique quelques sites sur les séquences *INT1*. Lorsque quelques unes sont fixées, il y a oligomérisation autour du site de fixation, ce qui amplifie le signal fluorescent. Le locus d'intérêt est alors marqué indirectement et peut être localisé au sein du noyau des cellules.

Il faut être prudent dans l'interprétation des résultats fournis par ces différentes techniques. En effet, la fixation des protéines rapportrices fluorescentes pourraient inhiber les régions environnantes (Dubarry et al., 2011) et interférer avec les fonctions du génome (Ma et al., 2019; Saad et al., 2014; Zhang et al., 2015).

L'étude spatiale de cibles d'ADN spécifiques est aussi réalisable à l'aide du FISH en 3D. En fonction de la sonde utilisée, des territoires chromosomiques (TCs) entiers, des loci génomiques ou encore des oligonucléotides sont délimités (Cremer and Cremer, 2010; Foster and Bridger, 2005). Par exemple, une expérience de 3D-FISH combinée à la microscopie 3D-SIM, a révélé quelques interdigitations entre domaines chromatiniens de deux TCs voisins (chromosomes 11 et X) (Markaki et al., 2012) (Figure 35). Ce résultat est cohérent avec d'autres études antérieures (Olivares-Chauvet et al., 2011; Walter et al., 2003). Ces structures sont en accord avec les preuves montrant que la transcription peut se produire à travers différents TCs (Küpper et al., 2007; Niedojadlo et al., 2011).

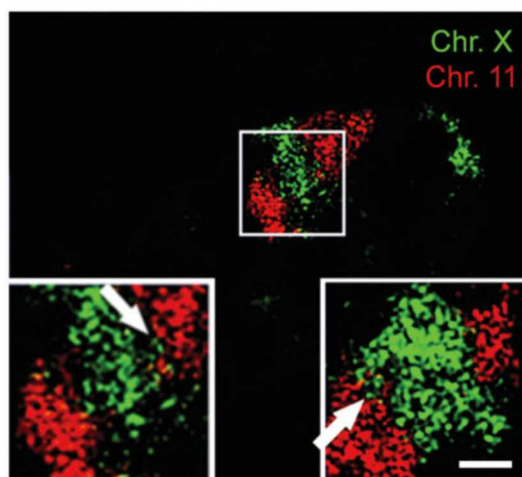


Figure 35 : Interdigitations entre les chromosomes 11 et X. Les chromosomes ont été marqués par FISH et imagés en 3D-SIM. Les images révèlent des interdigitations à la frontière entre les deux territoires chromosomiques mais pas à travers les territoires entiers. L'encadré de gauche représente un seul plan de l'image et la flèche blanche indique une zone de chevauchement entre les deux territoires. Le grossissement en bas à droite est une projection en z et montre également des interdigitations au bout de la flèche blanche. Image issue de (Markaki et al., 2012).

III.2.1.2. Les domaines topologiquement associés (TADs)

Généralités sur les TADs

Les TADs sont définis comme des régions enrichies en interactions entre des séquences d'ADN voisines. Ce type d'interaction a été révélé par des expériences de capture de chromatine de plus en plus résolues (3C, 4C, Hi-C). Les matrices générées représentent les TADs comme des carrés (ou triangles) sur la diagonale principale (Beagan and Phillips-Cremens, 2020; Dixon et al., 2012; Nora et al., 2012; Sexton et al., 2012) (Figure 36). Les TADs actifs ou inactifs s'associent les uns avec les autres et forment les compartiments A et B (évoqués en début de partie) (Rao et al., 2014; Schmitt et al., 2016).

La taille des TADs varie entre quelques dizaines de kb jusqu'à quelques Mb. Des loci génomiques appartenant au même TAD ont une probabilité d'interaction plus grande qu'avec d'autres loci présents à une autre localisation génomique. Les TADs témoignent d'une remarquable corrélations avec l'expression coordonnée de gènes (Dixon et al., 2012; Le Dily et al., 2014), les modifications épigénétiques d'histones (Dixon et al., 2012; Hou et al., 2012; Sexton et al., 2012), et la synchronisation de la réplication (Dixon et al., 2012; Pope et al., 2014). De plus, les TADs sont robustes d'un point de vue développemental et évolutif (Dixon et al., 2015; Nora et al., 2012; Vietri Rudan et al., 2015). Des boucles formées à la frontière des TADs sont proposées comme acteurs de l'isolation entre domaines voisins (Hug et al., 2017; Rao et al., 2014).

L'ensemble de ces informations montre que les TADs jouent un rôle central dans l'organisation des chromosomes et représentent une structure stable. Cependant, des données en cellules uniques, à l'échelle du génome, ont révélé une variabilité notable dans l'architecture des chromosomes, que ce soit à l'intérieur ou entre les TADs (Flyamer et al., 2017; Nagano et al., 2017). En effet, en cellules uniques, les contacts inter-TADs sont plus fréquents que sur les données d'ensemble de Hi-C (Flyamer et al., 2017).

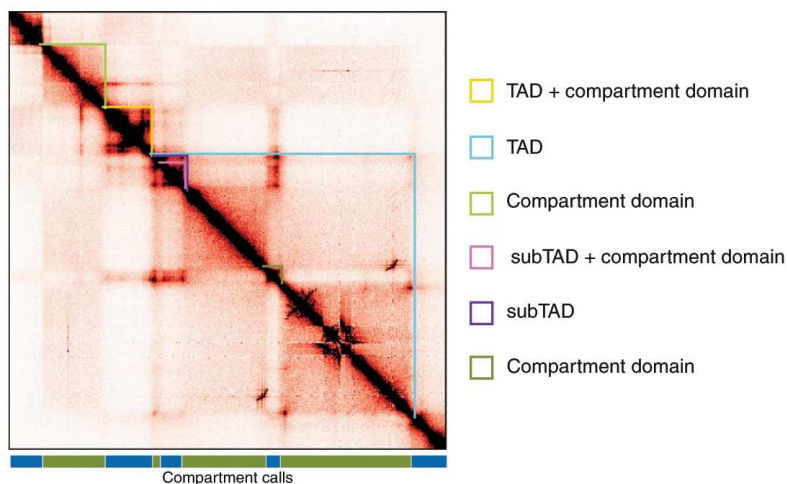


Figure 36 : Représentation en « heatmap » de l'organisation en compartiments, TADs et subTADs. Identification de différentes classes de domaines chromosomiques sur des données de Hi-C (résolution = 10 kb). Les compartiments (domaine chromosomique) correspondent à des domaines chromosomiques dont les bordures s'alignent aux signaux des compartiments A et B. Les subTADs sont inclus au sein de TADs plus grands. Illustration issue de (Beagan and Phillips-Cremens, 2020).

Visualisation des TADs à l'échelle super-résolutive

La microscopie STORM chez la drosophile et les mammifères supporte la présence de nanoclusters ou nanodomaines d'histones au sein du noyau. Notamment, les domaines de répression sont plus grands que les domaines actifs (Cattoni et al., 2017; Xu et al., 2018), en accord avec les données à large échelle (Filion et al., 2010).

Pour visualiser les TADs au sein de cellules uniques, il est possible d'utiliser le FISH et la technologie DNA-PAINT avec des Oligopaints couvrant une région de trois millions de pb sur le chromosome 2L de la drosophile (Szabo et al., 2018).

L'organisation nucléaire est ensuite imagée par 3D-SIM. Cette étude a mis en évidence trois types principaux de domaines épigénétiques :

- Des domaines actifs avec un enrichissement en triméthylation des lysines 4 sur l'H3 (H3K4me3) ainsi que la marque H3K36me3 et des histones acétylées.
- Des domaines de répression par les protéines PcG enrichis avec la marque H3K27me3.
- Des domaines inactifs qui n'ont pas d'enrichissement spécifique de composants épigénétiques.

La microscopie conventionnelle à champs large n'a pas révélé de structures internes à chaque domaine. Cependant, les images produites par 3D-SIM montrent que les régions sont organisées en séquences semi-continues de structures globulaires, ici définies comme nanocompartiments (nanodomains évoqués précédemment) (Szabo et al., 2018). Pour montrer la relation avec les TADs, la stratégie Oligopaints a été adaptée pour un marquage deux-couleurs (**Figure 37A**). Ceci permet de visualiser simultanément, la région de trois millions de pb et des TADs uniques. Les TADs inactifs forment des structures globulaires qui colocalisent avec les nanocompartiments décrits dans la région de 3 millions de pb (**Figure 37B et C**). Cela suggère que les TADs inactifs sont de réels domaines physiques. Les TADs actifs sont plutôt situés dans les zones de faible fluorescence de la région du chromosome 2L (**Figure 37D**). Cela indique qu'ils se trouvent dans des zones de chromatine plus ouverte, en accord avec un nombre restreint de contacts Hi-C en comparaison avec les domaines inactifs (Ghavi-Helm et al., 2014; Szabo et al., 2018).

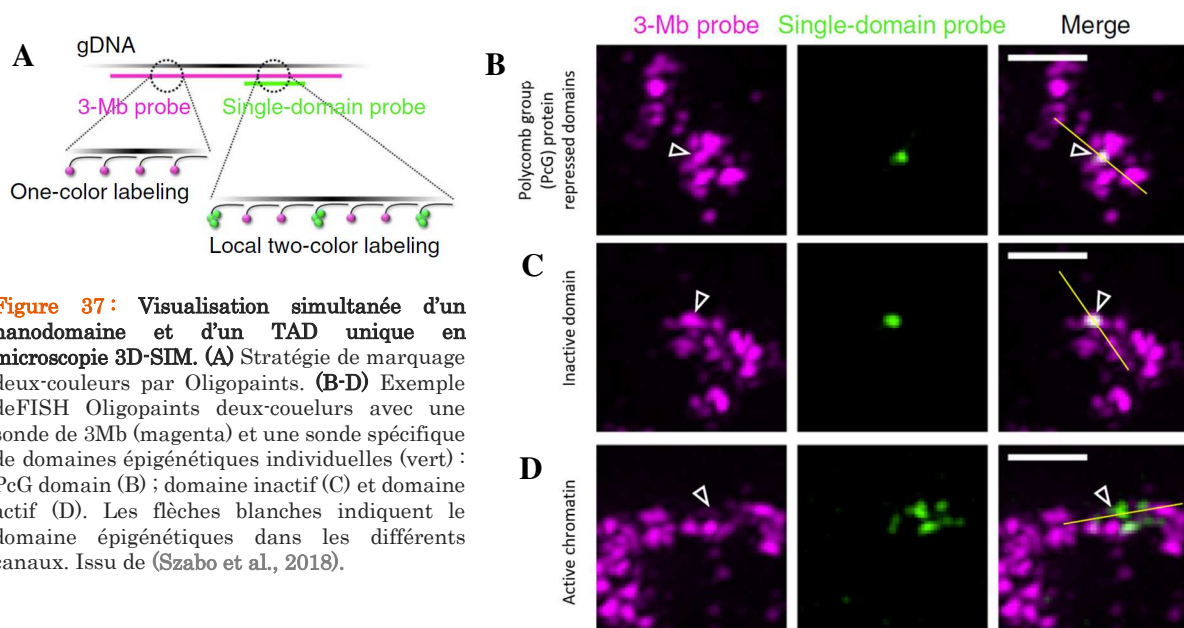


Figure 37: Visualisation simultanée d'un nanodomaine et d'un TAD unique en microscopie 3D-SIM. (A) Stratégie de marquage deux-couleurs par Oligopaints. (B-D) Exemple de FISH Oligopaints deux-couleurs avec une sonde de 3Mb (magenta) et une sonde spécifique de domaines épigénétiques individuelles (vert) : PcG domain (B) ; domaine inactif (C) et domaine actif (D). Les flèches blanches indiquent le domaine épigénétiques dans les différents canaux. Issu de (Szabo et al., 2018).

Les interactions intra-TADs abondantes ainsi que la faible proportion d'interaction de la chromatine active avec les TADs inactifs pourraient être suffisant pour créer un profil de chromatine formé d'une succession de domaines distincts basé sur les TADs. Cette conclusion réconcilie des observations antérieures utilisant la microscopie et le Hi-C (Cremer and Cremer, 2010; Hou et al., 2012; Rao et al., 2014; Stevens et al., 2017). Les données de cet article (Szabo et al., 2018) sont en corrélation avec la persistance des TADs au cours de l'interphase du cycle cellulaire. De plus, il a été montré que les contacts entre paires de loci au sein des TADs sont seulement deux ou trois fois plus élevés que les contacts inter-TADs. Cela montre qu'il suffirait d'une légère différence de niveau d'interaction pour aboutir à la ségrégation des TADs (Cardozo Gizzi et al., 2020). Des conclusions similaires ont été obtenues par l'observation de neuf TADs consécutifs sur chromosome humain par microscopie STORM (Nir et al., 2018).

La microscopie STORM a également permis de montrer que les frontières entre TADs varient d'une cellule à l'autre (Figure 38), mais gardent une préférence pour les sites de fixation du facteur CCCTC (CTCF) et de la cohésine (Bintu et al., 2018; Sofueva et al., 2013; Zuin et al., 2014). La déplétion de la cohésine abolit la présence des TADs à l'échelle d'une population entière, mais pas à l'échelle de cellules uniques ; seul le positionnement préférentiel des frontières est perdu. Ceci explique la perte des TADs au niveau de la population entière. Le modèle proposé de formation des TADs par une simple boucle d'extrusion (Fudenberg et al., 2016; Sanborn et al., 2015) ne mène pas à une forte ségrégation physique des domaines chromatiniens en cellules uniques (Fudenberg et al., 2016). La cohésine ne serait pas nécessaire à la formation et au maintien des domaines en cellules uniques. Cependant, la position des frontières des TADs est influencée par l'interaction cohésine-CTCF (Bintu et al., 2018). Le mécanisme de boucle d'extrusion pourrait fonctionner en parallèle pour former des interactions à voies multiples (des triplets de loci par exemple) (Allahyar et al., 2018; Busslinger et al., 2017; Haarhuis et al., 2017).

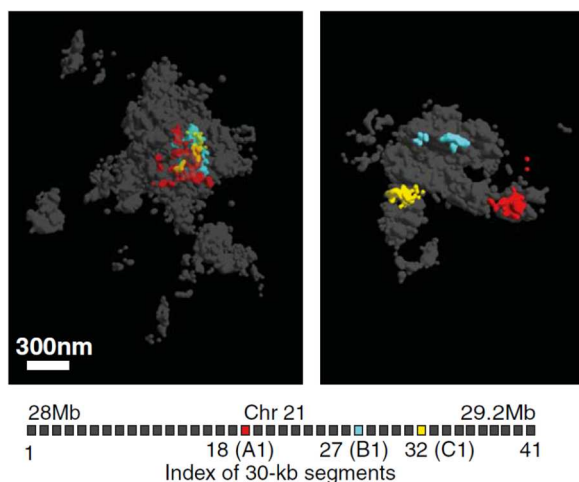


Figure 38 : Représentation d'une région génomique en 3D-STORM. Image 3D-STORM d'une région d'intérêt de 1,2 Mb sur le chromosome 21 de cellules IMR90. La région génomique entière est représentée en gris. Les éléments rouges, cyans et jaunes correspondent à trois segments spécifiques de 30 kb qui abritent des sites CTCF. Images issues de (Bintu et al., 2018).

III.2.1.3. La périphérie nucléaire et les domaines associés à la lamina (LADs)

L'organisation de la lamina nucléaire

La lamina nucléaire est un réseau protéique complexe situé sous l'enveloppe nucléaire interne, dans les cellules de métazoaires (Aebi et al., 1986; Goldberg et al., 2008). Ces observations ont été de nouveau confirmées par microscopie 3D-SIM, au sein de noyaux murins et humains (Schermelleh et al., 2008; Shimi et al., 2008). Les protéines structurales majoritaires de la lamina sont des filaments intermédiaires de type V : les lamines (Aebi et al., 1986; Fisher et al., 1986; Goldman et al., 1986; McKeon et al., 1986). Les filaments de la lamina s'organisent en une couche de 14 nm d'épaisseur (Turgay et al., 2017). Les lamines sont classifiées en deux groupes, en fonction de leurs séquences et de leurs propriétés structurales : les lamines de type A (LA, LC) et les lamines de type B (LB1, LB2) (Gerace et al., 1978; Gerace and Blobel, 1980). LA et LC sont dérivés de l'unique gène *LMNA*, ce sont des variants d'épissage (Lin and Worman, 1993). LB1 et LB2 sont codés par deux gènes, *LMNB1* et *LMNB2* (Hoger et al., 1990; Biamonti et al., 1992; Lin and Worman, 1995; Maeno et al., 1995). La drosophile est le seul modèle invertébré qui possède les deux types de lamines trouvées chez les mammifères (Klapper et al., 1997; Riemer et al., 1995; Schulze et al., 2005). Le gène *Lamin C*, code pour la lamine de type A et le gène *Lamin Dm0* code pour la lamine de type B (Riemer et al., 1995). Les lamines de type A sont exprimées dans la majorité des cellules somatiques différenciées (Fisher et al., 1986) alors que les lamines de type B sont exprimées de façon ubiquitaire et sont essentielles à la viabilité des cellules (Biamonti et al., 1992; Harborth et al., 2001; Pollard et al., 1990).

La lamina fournit un support structural à l'enveloppe nucléaires et est connecté au cytosquelette par le complexe LINC (linker of nucleoskeleton to cytoskeleton) (Meinke and Schirmer, 2015). Les rôles des lamines sont variés et incluent le maintien de la forme du noyau, le positionnement nucléaire, et l'organisation du génome. Les cellules déplétées en lamines A/C ou B1 montrent des altérations dans la structure du réseau et une malformation des noyaux (Guo et al., 2014; Shimi et al., 2008; Sullivan et al., 1999; Vergnes et al., 2004). Les maladies associées à une altération des lamines sont appelées laminopathies (Muchir et al., 2004; Novelli et al., 2002; Vigouroux et al., 2001). Certains cancers sont aussi associés à ce type de malformation nucléaire (Irianto et al., 2016; Sakthivel and Sehgal, 2016).

Les lamines sont composées d'un domaine principal en N-terminal (head domaine), d'une tige centrale en super-hélice (coiled-coil rod domain) et d'un domaine globulaire en C-terminal (tail domain) qui peut se fixer au nucléosomes *in vitro* (Stierlé et al., 2003). La polymérisation de la lamina nucléaire s'effectue par l'homodimérisation tête-bêche des monomères puis par l'assemblage des

polymères en filaments (Turgay et al., 2017). Les lamines de types B sont ancrées dans l'enveloppe nucléaire interne, contrairement aux lamines de type A. Les lamines A et C sont situées en périphérie, dans la lamina, mais aussi dans le nucléoplasme où elles interagissent avec la chromatine (Dechat et al., 2000; Dechat et al., 2010) et régulent sa mobilité (Bronshtein et al., 2015). De plus, les lamines peuvent subir des modifications post-traductionnelles qui contribuent à la stabilité et aux fonctions du réseau de lamines (Karoutas et al., 2019; Kochin et al., 2014; Simon et al., 2018).

Les récepteurs de la lamine B (LBR) fixent la lamine B (Figure 39) mais aussi la protéine CBX5 (H3K9me3-binding chromobox protein homolog 5) (Ye and Worman, 1996). Cela permet l'ancrage de l'hétérochromatine à l'enveloppe nucléaire (Solovei et al., 2013). D'autres protéines comme LAP2 (Thymopoiétin / lamina-associated polypeptide) et les émerines (LEMD2-3 / MAN1) créent aussi des liens entre lamines et chromatine (Foisner and Gerace, 1993). Ces protéines interagissent aussi avec une histone déacétylase (HDAC3), ce qui contribue à l'environnement répressif en périphérie nucléaire (Demmerle et al., 2012; Somech et al., 2005) (Figure 39). De même la méthylation des histones séquestre l'hétérochromatine au niveau de l'enveloppe nucléaire (Mattout et al., 2015; Towbin et al., 2012). Les multiples interactions de la chromatine avec la lamina

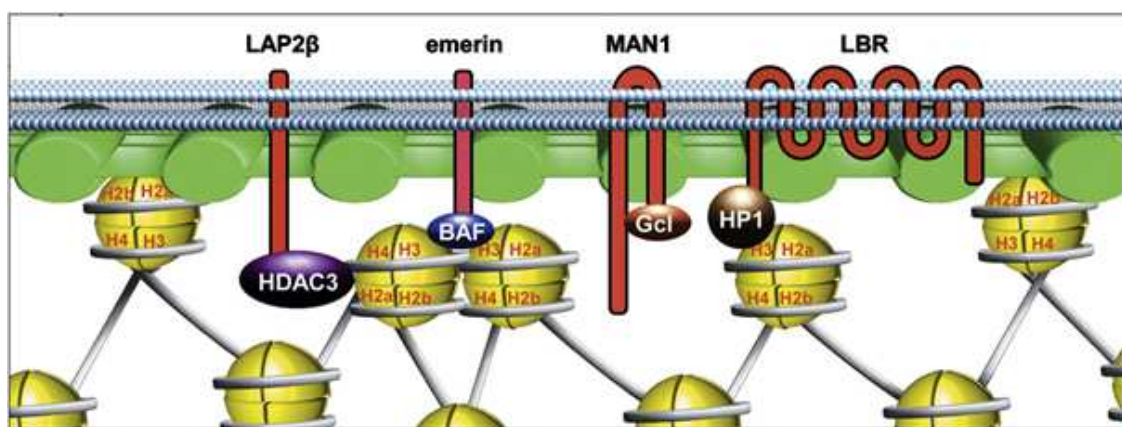


Figure 39 : Schéma récapitulatif des partenaires de la lamina. De nombreuses protéines transmembranaires de l'enveloppe nucléaire interne interagissent directement avec les polymères de lamine et/ou des protéines associées à la chromatine. Parmi elles, LAP2β interagit avec la protéine HDAC3. LAP2β, emerine et MAN1 interagissent toutes avec la protéine de crosslinking de la chromatine BAF et des répresseurs transcriptionnels comme Gcl (germ cell-less). LBR se fixe à la protéine HP1 et aux histones H3. Les lamines peuvent aussi interagir directement avec les histones H2A et H2B. Schéma issu de (Batrakou, 2011).

génèrent des « zones » concentriques d'expression génique avec un environnement de répression en périphérie (Rowley and Corces, 2018; Yao et al., 2011) et dans certains types cellulaires, la séquestration de loci tissus-spécifiques à proximité de l'enveloppe nucléaire (Shachar and Misteli, 2017).

Ces différents domaines en périphérie nucléaire et associés aux lamines sont regroupés sous le nom de LADs (Lamina Associated Domains) (Figure 40).

Les LADs, des domaines hétérogènes

Les LADs sont détectés à des densités variables dans tous les chromosomes. Ces domaines ont une taille comprise entre 100 kb et 10 Mb avec une taille médiane de 0.5-1 Mb (Briand and Collas, 2020). Les LADs contiennent jusqu'à 40%

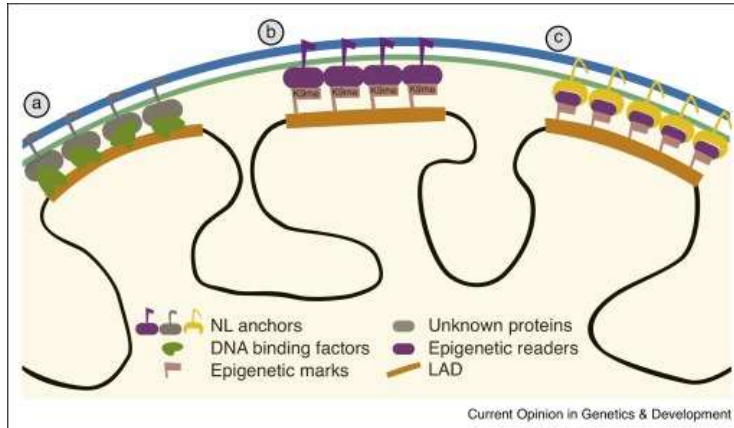


Figure 40 : Modèles d'interaction entre la lamina et les LADs. (a) Les facteurs de liaison à l'ADN (verts) reconnaissent certaines séquences dans les LADs. La fixation combinée de ces facteurs avec d'autres protéines non-identifiées pourrait conduire à l'interaction LAD-lamina. (b) Les facteurs épigénétiques (violets) avec une affinité pour les histones H3K9 méthylées et fixées à la lamina, comme Cec-4, ancrent les LADs à la lamina. (c) Les LADs sont ancrés à la lamina par l'interaction entre des protéines de la lamina (jaunes), comme PRR14, et des facteurs épigénétiques (violets), comme HP1 α , avec une affinité pour l'hétérochromatine. Modèles issus de (Yáñez-Cuna and van Steensel, 2017)

du génome, cependant, cela ne signifie pas que ces 40% sont ancrés à la lamina dans toutes les cellules d'une population. Ces domaines chevauchent des régions de faible densité génique (2-3 gènes par Mb, alors que la moyenne sur le génome humain est de \sim 8 gènes par Mb) et sont enrichis en chromatine des compartiments B (inactifs) (Luperchio et al., 2018; Zheng et al., 2018). En effet, les LADs sont riches en histones di ou triméthylés sur la lysine 9 (H3K9me2 et H3K9me3), caractéristiques de l'hétérochromatine constitutive (Figure 40). De plus, la plupart des gènes présents dans les LADs sont réprimés ou exprimés faiblement (Guelen et al., 2008; Lund et al., 2014). En effet, l'insertion de gènes rapporteurs dans les LADs est associée à une expression plus faible que dans une région inter-LAD (Akhtar et al., 2013).

Cependant, ce mécanisme n'est pas toujours aussi simple. Par exemple, l'expression d'un sous-ensemble de gènes spécifiques des lymphocytes T est associée au détachement des enhancers de la lamina, mais les gènes restent en périphérie (Robson et al., 2017). L'association à la lamina n'est donc pas le seul déterminant de la répression des gènes à la périphérie nucléaire. De plus, au moins 10% des gènes trouvés proches de la lamina, sont exprimés (Paulsen et al., 2019; Wu and Yao, 2017). Au final, trois classes de promoteurs ont été identifiés (Briand and Collas, 2020):

- Les promoteurs réprimés (repressed LAD promoters) qui deviennent actifs s'ils sont hors du contexte LAD.
- Les promoteurs « escaper », actifs au sein d'un LAD.
- Les promoteurs inactifs, indépendamment de leur localisation.

Les LADs semblent donc être des domaines hétérogènes en structure et en fonction. De plus, comme évoqué précédemment, toutes les lamines ne sont pas retenues en périphérie. En effet, une partie de la lamine A (lamine C chez la drosophile) circule au sein du nucléoplasme et interagit avec les LADs d'euchromatine qui colocalisent avec LAP2 (Briand and Collas, 2020; Gesson et al., 2016)). Des données de ChIP sur l'interaction des lamines A/C avec les LADs, montrent l'association typique avec l'hétérochromatine, mais contiennent aussi des gènes exprimés (Aughey et al., 2019; Lund et al., 2015). Les domaines d'interaction avec les lamines A/C pourraient donc jouer des rôles différents de la lamine B, pour l'organisation du génome et l'expression des gènes.

Visualisation de la lamina par microscopie super-résolution

Les expériences de DamID et de ChIP permettent d'identifier les séquences des LADs, mais ne fournissent pas d'information sur leur localisation nucléaire. Cependant la microscopie de fluorescence et notamment la microscopie super-résolution permet d'accéder à cette information.

La microscopie 3D-SIM en combinaison à une analyse d'image poussée, a montré que les lamines A, C, B1 et B2 forment des réseaux distincts au sein de la lamina de noyaux de cellules MEF (Mouse Embryo Fibroblasts) (Shimia et al., 2015). Cela n'exclue pas leur interaction. Le même type de microscopie a permis l'observation de milliers de trous dans le marquage DAPI, invisibles dans les images en épifluorescence correspondantes (Schermelleh et al., 2008). La taille, le nombre et la position de ces trous indiquent qu'ils représentent l'exclusion de l'ADN dans les pores nucléaires (NPCs). L'imagerie 3D-SIM multicolore montre une organisation en trois couches à la périphérie nucléaire (non résolue en microscopie confocale) (**Figure 41A**). De l'intérieur vers l'extérieur : le bord de l'hétérochromatine périphérique, une fine couche de lamina nucléaire (non homogène) et enfin le signal des NPCs « posés » sur la lamina (Schermelleh et al., 2008) (**Figure 41A**).

La distribution des lamines a aussi été décrite en 3D-PALM (Chen et al., 2014; Legant et al., 2016). Une protéine de fusion entre la lamine A et la PF photoconvertible Dendra2 permet le marquage de l'enveloppe nucléaire (**Figure 41B et B'**). L'imagerie 3D-PALM a révélé des détails structurels comme des tresses torsadées de lamine A au niveau de la surface interne de la lamina (Chen et al., 2014) (**Figure 41B**).

En 1979, des images de microscopie électronique à transmission (MET) ont décrits des invaginations de la lamina qui peuvent atteindre les nucléoles et contiennent des NPCs dans différents types cellulaires (Bourgeois et al., 1979). Plus récemment ces invaginations ont été imagées par microscopie STORM (**Figure**

41C, C' et C''). Elles sont en forme de tunnels et surviennent dans 30 à 50% des noyaux de cultures 3D de cellules épithéliales mammaires humaines (Schoen et al., 2017). Ces invaginations contiennent notamment des NPCs et la lamine B1, et sont associées à l'hétérochromatine. Des filaments du cytosquelette sont aussi retrouvés dans ces structures en tunnel (Jorgens et al., 2017). Les LADs sont connus pour interagir également avec ces invaginations (Broers et al., 1999; Dechat et al., 2000; Manilal et al., 1998). A ma connaissance, l'imagerie des LADs à l'échelle super-résolutive n'a pas encore été réalisée. La majorité des expériences pour visualiser la localisation des LADs sont effectuées par microscopie confocale ou MET (Erenpreisa et al., 2018; Pindyurin et al., 2018).

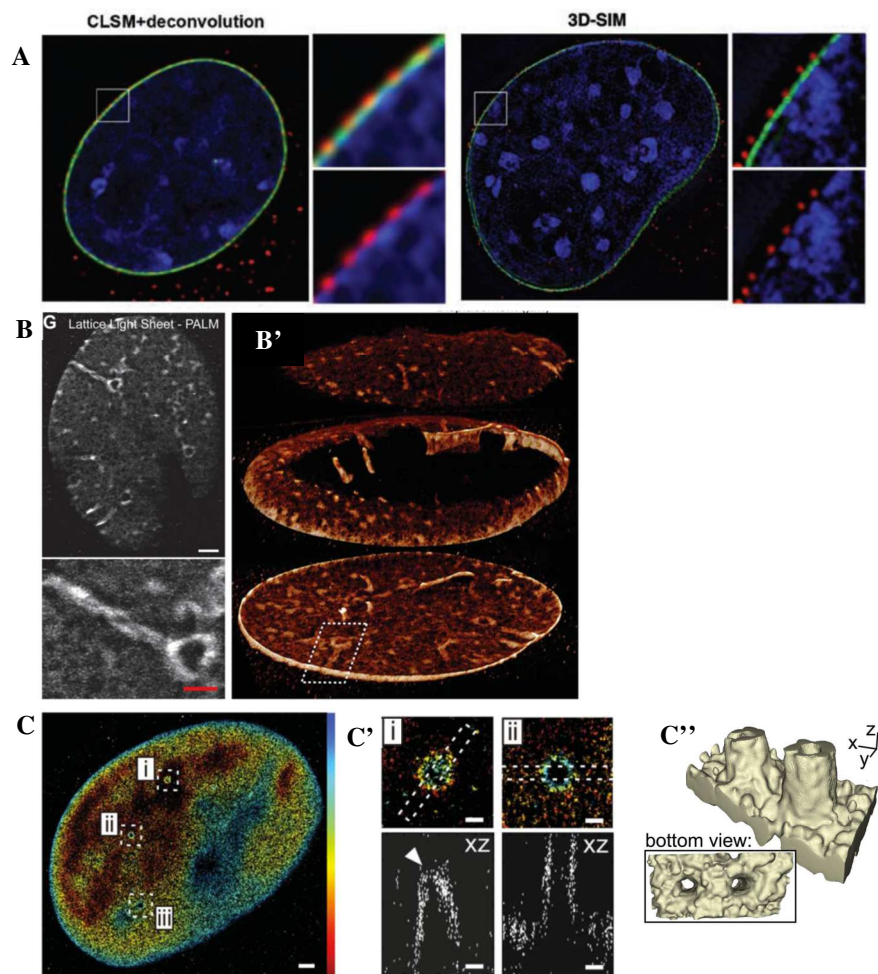


Figure 41 : Visualisation de la lamina et des invaginations à l'échelle super-résolutive. (A) Imagerie simultanée de la lamina, de l'ADN et des NPCs en 3D-SIM. Un immunomarquage contre la lamine B (vert) et les NPCs (rouge) a été réalisé au sein de cellules C2C12. L'ADN est marqué par le DAPI (bleu). L'image représente le plan médian d'un noyau. Le panneau de gauche montre une image et des grossissements en microscopie confocale traitée par déconvolution. Le panneau de gauche montre un autre noyau imagé en microscopie 3D-SIM. En microscopie confocale, les différents signaux se chevauchent alors que la microscopie SIM révèle une organisation en trois couches distinctes (visible sur les différents grossissements). Images issues de (Schermelleh et al., 2008). (B) La lamina A a été fusionnée à la PF Dendra2. Des coupes de noyaux de cellules U2OS de 600 nm d'épaisseur ont été imagées par microscopie 3D-PALM combinée à une illumination à feuillet de lumière. L'image est une projection en Z. Des invaginations sont visibles et le grossissement montre une organisation en tresse. Barre d'échelle = 2 μm (panneau du haut) ou 1 μm (panneau du bas). (B') Vue 3D explosée du même noyau. Images issues de (B.-C. Chen et al. 2014). (C) Un immunomarquage de la lamina A a été réalisé dans des fibroblastes humains. L'imagerie 3D-STORM montre la distribution de la lamina A en 3D. Les couleurs du rouge au bleu correspondent à la profondeur en z (-0,8 à 0,8 μm). (C') Les enlargissements de (C) montrent des invaginations en 3D-STORM. Les panneaux du haut montrent des coupes transversales des tubes. Les panneaux du bas montrent des coupes longitudinales. La flèche blanche montre l'extrémité d'une invagination. (C'') Reconstruction 3D de deux tubes voisins. Images issues de (Schoen et al., 2017).

III.3.2. La microscopie comme outil de visualisation des loci génomiques et de la transcription

III.3.2.1. Observation des loci génomiques à l'échelle super-résolutive

Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)

La technique la plus répandue pour marquer un loci génomique spécifique est le FISH. Cependant, cela demande la dénaturation de l'ADN à de hautes températures, ce qui peut altérer la conformation de la chromatine (Krufczik et al., 2017). La visualisation des loci par FISH à l'échelle super-résolutive n'est donc pas recommandée. Cependant, une étude sur le locus de l'immunoglobuline (Igh) a montré la possibilité d'utiliser le 3D-FISH et d'imager différents repliements du locus IgH par 3D-SIM, dans les cellules C127 (murine mammary tumor line) (Kosak et al., 2002). La microscopie 3D-SIM permet d'établir des relations entre conformation des loci (étendu ou compact) et localisation dans le noyau (périphérique ou centrale) (Markaki et al., 2012). En microscopie conventionnelle, les télomères sont détectés comme des foci limités par la diffraction. Cependant, dans une étude récente combinant 3D-STORM et FISH, les télomères se réunissent en clusters d'un diamètre moyen de 180 nm (Doksani et al., 2013).

Il existe une méthode qui utilise de faibles températures de dénaturation ainsi que de multiples oligonucléotides pour marquer la séquence d'ADN d'intérêt. Cette technique est appelée COMBO-FISH (combinatorial oligonucleotide FISH) et a été établie par Hausmann et al. en 2003 (Hausmann et al., 2003). Les oligonucléotides ont une longueur de 15-30 nucléotides et sont conçus par un algorithme qui s'assure du caractère unique d'hybridation à la région d'intérêt (Schmitt et al., 2012). En combinaison avec la microscopie SMLM, il est alors possible d'accéder aux détails de la structure marquée (Müller et al., 2010; Stuhlmüller et al., 2015). Le COMBO-FISH peut marquer spécifiquement des régions répétées comme les centromères, mais aussi un gène particulier sur un chromosome (Müller et al., 2016; Stuhlmüller et al., 2015). Cependant, cette technique est restreinte aux échantillons fixés.

Imagerie dynamique des loci génomiques par le système CRISPR/Cas

La relation entre l'organisation spatiale et la fonction d'un élément génomique dépend de la capacité à visualiser le processus en cellules vivantes. CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) utilise la protéine Cas9 pour reconnaître des séquences d'ADN spécifiques. La spécificité est déterminée par des ARN guides (ARNg) et une séquence PAM (protospacer adjacent motif) (Jinek et al., 2012). Après fixation sur l'ADN, le complexe Cas9-ARNg génère une coupure double-brin. Cette capacité a été détournée pour

l'édition du génome dans un vaste éventail d'organismes (Cong et al., 2013; Mali et al., 2013; Wang et al., 2013).

Un autre dérivé du système CRISPR/Cas9 consiste à fusionner la protéine Cas9 désactivée (dCas9) à une PF comme l'EGFP et à l'optimisation des ARNg pour leur interaction avec la protéine dCas9. Ce système d'imagerie permet la détection d'éléments le plus souvent répétitifs dans différents organismes. Cette technique est non-destructive et permet de visualiser la conformation et la dynamique de la chromatine native (Chen et al., 2013) (Figure 42A).

Certaines études ont révélé que le système CRISPR présente des fixations hors-cible (off-targets) (Hsu et al., 2013). Cependant, la méthode d'imagerie peut filter les sites off-targets en comparant l'enrichissement du signal fluorescent (considérablement plus faible pour les off-targets) (Chen et al., 2013). Une étude a utilisé ce système pour marquer les régions répétées péricentriques, centriques et télomériques qui sont enrichies en structures nucléaires distinctes. La dCas9-eGFP a été imagé par microscopie 3D-SIM. Des sub-structures ont été révélées pour les répétitions ciblées (Anton et al., 2014) (Figure 42B). Par exemple, les séquences télomériques forment des boucles-T qui protégeraient la partie 3' et réguleraient l'activité des télomérases (Griffith et al., 1999; Nikitina and Woodcock, 2004). Le 3D-SIM en association avec la dCas9-eGFP a révélé des morphologies cohérentes avec les études citées ci-dessus (Anton et al., 2014). L'imagerie super-résolutive d'un locus génomique spécifique non répété n'a cependant encore jamais été réalisé avec le système CRISPR/dCas9.

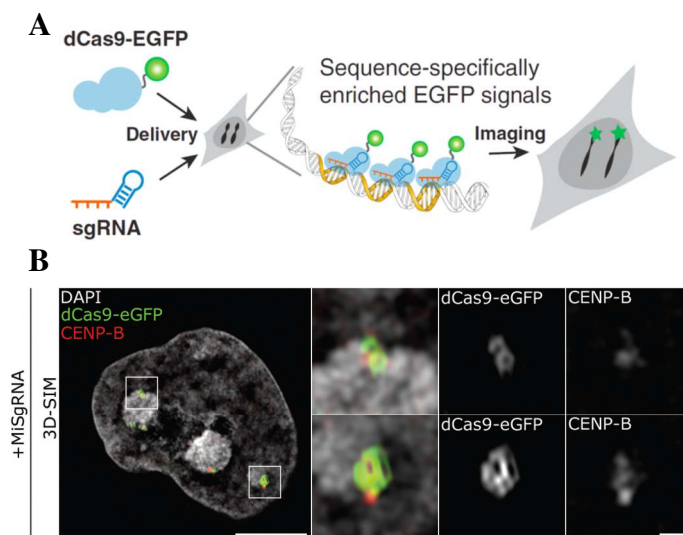


Figure 42: CRISPR/Cas system to visualize genomic sequences in fluorescence microscopy. (A) La dCas9 fusionnée à l'EGFP et les ARNg spécifiques de la région génomique d'intérêt sont exprimés dans les cellules. L'enrichissement séquence-spécifique du signal fluorescent dCas9-EGFP dirigé par les ARNg permet l'imagerie de loci génomiques en cellules vivantes. Schéma issu de (Chen et al., 2013). (B) L'imagerie 3D-SIM révèle l'ultrastructure des séquences satellites répétées (MiS, Minor Satellite repeats). L'image complète (à gauche) montre une section médiane d'un noyau marqué avec du DAPI (gris) au sein de cellules exprimant la dCas9-eGFP et les ARNg dirigés contre les MiS (vert). Un immunomarquage a été réalisé pour localiser les protéines centromériques B (CENP-B) (rouge) connue pour se fixer directement sur les MiS (sur la boîte CENB-P). Les encadrements blancs sont grossis quatre fois (à droite) et montre l'association spatiale entre les domaines MiS (dCas9-eGFP, vert) et les clusters de CENP-B (rouge). En 3D-SIM, des structures fines et des boucles sont visibles pour les régions MiS (invisibles en microscopie conventionnelle). Images issues de (Anton et al., 2014).

Pour visualiser simultanément deux régions génomiques distinctes, la technique CRISPR/dCas9-FP peut être combinée au système MS2/PP7 (Fu et al., 2016). Dans ce cas, les ARNg contiennent les motifs tiges-boucles MS2 et PP7 reconnus par les protéines d'enveloppe de bactériophages MCP (MS2 coat protein) et PCP (PP7 coat protein), respectivement (Buxbaum et al., 2015; Heckl and Charpentier, 2015). Ces ARNg sont recrutés par deux régions cibles distinctes et visualisés à l'aide de PFs fusionnées à MCP et PCP. Par exemple, mCherry pour MCP et EGFP pour PCP (Fu et al., 2016) (Figure 43A).

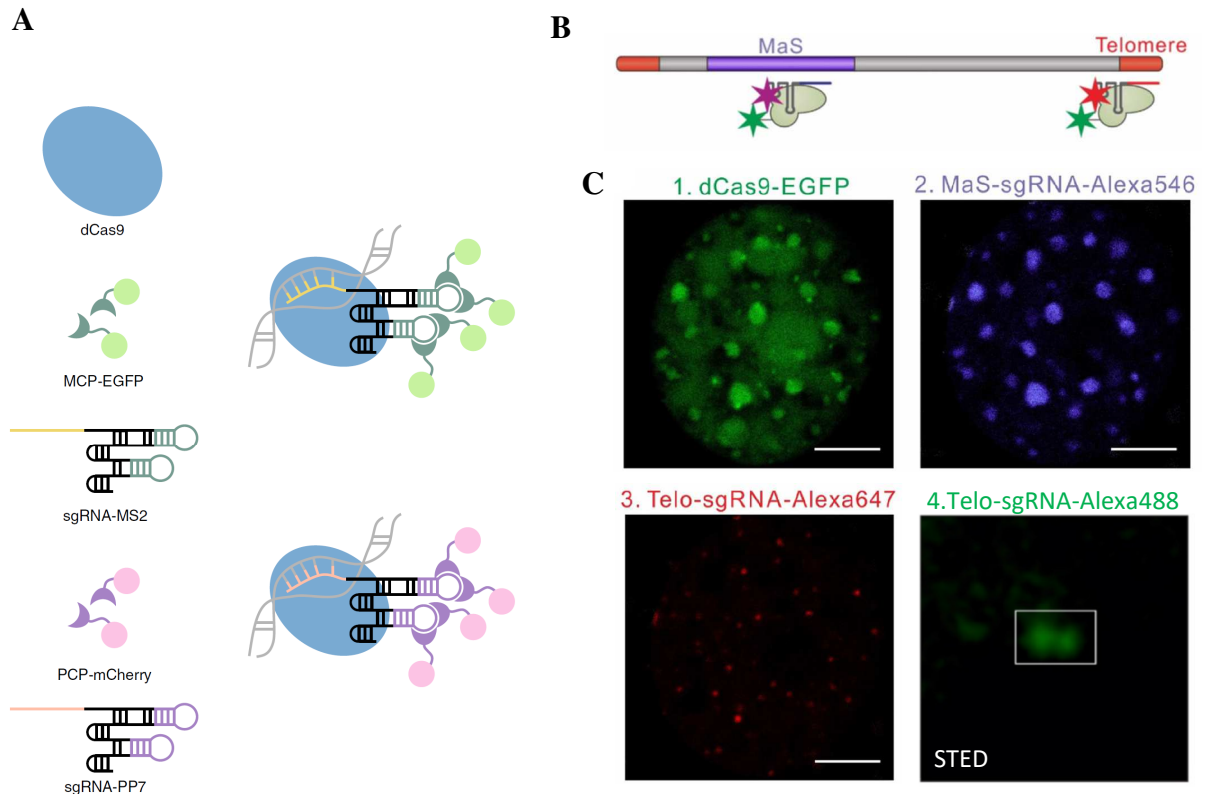


Figure 43 : Visualisation simultanée (deux-couleurs) de deux régions génomiques distinctes. (A) La dCas9 est coexprimée avec les ARNg modifiés. Ceux-ci contiennent une double structure tige-boucle MS2 ou PP7. Les ARNg modifiés servent de plateforme d'ancrage pour les protéines MCP et PCP fusionnées à l'EGFP ou la mCherry, respectivement. La dCas9 et les ARNg se fixent à leur séquence cible. Les ARNg-MS2 spécifiques d'une région sont reconnus par la protéine MCP-EGFP (vert) et les ARNg-PP7 sont reconnus par PCP-mCherry (rouge). Schéma issu de (Fu et al., 2016). (B-C) Imagerie deux-couleurs des séquences satellites majeures (Major satellites, MaS) et des télomères. (B) Schéma représentant les régions marquées par le système dCas9/ARNg-fluorophore sur un chromosome. La dCas9 est fusionnée à l'EGFP (1., vert) et les ARNg dirigés contre les MaS ou les télomères sont directement couplés à l'Alexa546 (2., violet) ou l'Alexa647 (3., rouge), respectivement. Les images 1., 2. Et 3. ont été prises en microscopie confocale. L'image 4. correspond à un grossissement sur un signal télomérique provenant d'une autre image (une seule couleur, vert) prise en microscopie STED. Deux régions peuvent être séparées, ce qui n'est pas le cas en microscopie confocale. Images issues de (Wang et al., 2019).

Ce système a permis l'imagerie live de deux loci génomiques sur le chromosome 12 de souris. Pour cibler la région constante du gène codant pour la chaîne lourde de l'immunoglobuline (*Igh* locus), 13 constructions ARNg-MS2 ont été synthétisées. 117 sites de fixation sont prédits pour ces différents ARNg. Pour le gène *Akap6* localisé à 60 Mb du locus *Igh*, un seul ARNg-PP7 est synthétisé. En effet, le gène *Akap6* contient 209 répétitions d'une séquence de 29 nucléotides. L'imagerie *in vivo* montre que la plupart des cellules contiennent trois paires de

signaux EGFP-mCherry. Cela confirme la présence des 3 copies du chromosome 12 et de *Igh* présentes dans les cellules 3T3 testées (Fu et al., 2016).

La microscopie PALM permet de compter les molécules détectées avec précision. Les approches CRISPR associées au PALM présentent donc une opportunité pour répondre quantitativement à certaines questions biologiques. Cette technique est appelée CRISPR-PALM (Khan et al., 2017). Dans cette étude le système CRISPR/Cas9 a été utilisé sous sa forme principale, c'est-à-dire pour tagger une protéine endogène. La tubulin- α , fusionnée à la PF mEos est suffisamment exprimée pour atteindre des résolutions proches de celle du STORM (Khan et al. 2017). A ma connaissance, il n'existe pas d'article décrivant l'utilisation du système CRISPR/dCas9-MS2/PP7 en association avec la microscopie super-résolution. Cependant, en 2019, une étude a montré la possibilité de synthétiser des ARNg couplés à des fluorophores (**Figure 43B et C**). Ceci ouvre une nouvelle possibilité d'imagerie STED deux-couleurs en temps réel de deux régions répétées (Wang et al., 2019) (**Figure 43C**).

En raison du nombre limité de copies de dCas9-FPs spécifiquement liées, le locus d'intérêt est entouré de molécules dCas9-FPs non fixées. Par conséquent, le bruit de fond est important et empêche l'imagerie à long terme ainsi que l'imagerie super-résolution de l'architecture des gènes (Neguembor et al., 2017). Pour contourner ce problème, la méthode a été modifiée et appelée STAC pour SunTag modified CRISPR. Le peptide SunTag est utilisé pour recruter de multiples copies d'anticorps fusionnés à une PF (**Figure 44A**). La dCas9 est fusionnée au SunTag et jusqu'à 24 copies de la superfolder GFP (sfGFP) sont fusionnées à l'anticorps qui reconnaît le peptide SunTag (**Figure 44A**). En comparaison à la dCas9-GFP, l'efficacité est multipliée par 2.5 (Neguembor et al., 2017). Il est aussi possible de fusionner l'anticorps à la GFP et utiliser un nanobody anti-GFP couplé à l'AlexaFluor647 (Ries et al., 2012). Cette combinaison permet d'adapter le système à la microscopie STORM (**Figure 44B**). Par exemple, cela a permis de confirmer des différences de tailles entre télomères de deux lignées cellulaires différentes (**Figure 44C et C'**). Cette méthode permet aussi de visualiser des séquences moyennement ou faiblement répétées (Neguembor et al., 2017).

D'autres systèmes de tag, couplés à l'approche CRISPR, permettent la visualisation de loci génomique. Par exemple, le HaloTag, le SNAP-Tag, le système basé sur les aptamères d'ARN (Ma et al., 2016) et les balises moléculaires (molecular beacon, MB) (Wu et al., 2018; Zhao et al., 2016). Dans la suite, je décrirai uniquement les méthodes HaloTag et SNAP-Tag.

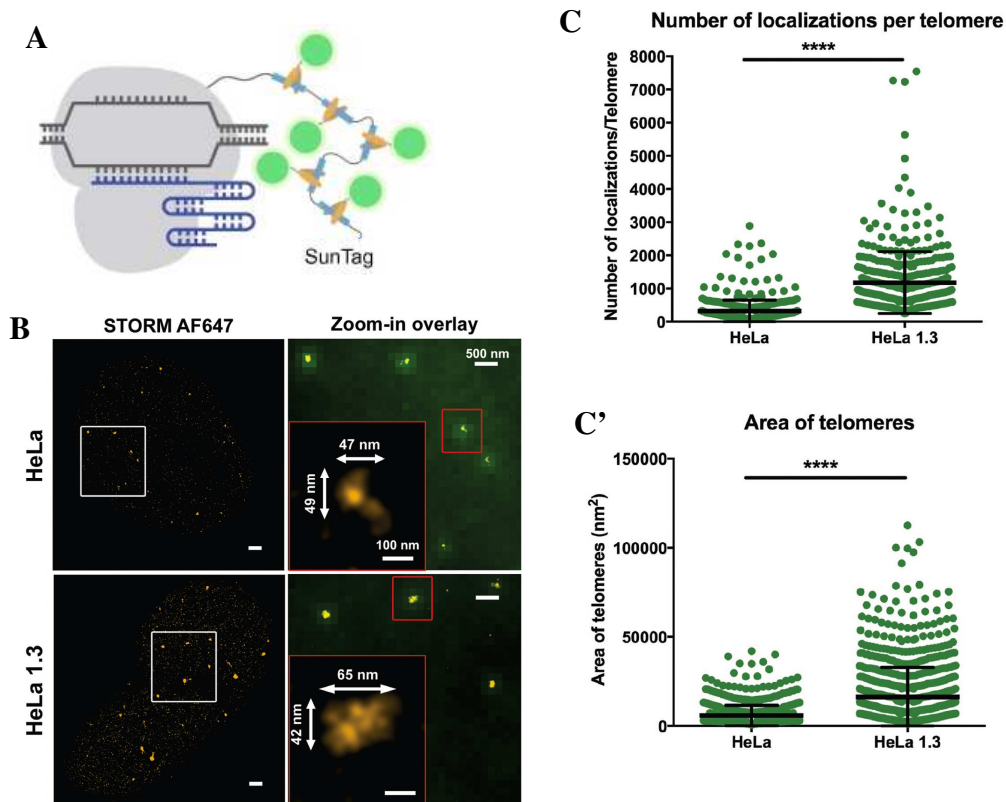


Figure 44 : Principe de la méthode STAC et application en microscopie STORM. **(A)** La dCas9 est fusionnée à plusieurs répétitions du SunTag reconnues par des anticorps couplés à la protéine fluorescente superfolder GFP (sfGFP). Cela permet d'amplifier le signal fluorescent en comparaison à la dCas9-EGFP et de diminuer le bruit de fond. Schéma issu de (Wu et al., 2019). **(B)** Images en super-résolution STORM de cellules HeLa (en haut) ou HeLa 1.3 (en bas) fixés. Les cellules ont préalablement été transfectées avec la dCas9-24xSTAC et les ARNg dirigés contre les séquences télomériques. Un immunomarquage avec le nanobody anti-GFP couplé à l'AlexaFluor647 permet d'adapter la technique pour l'imagerie STORM. Les images de gauche représentent un plan d'une cellule entière. Celles de droite montrent un zoom-in de l'encadrement (carré blanc) de l'image de gauche correspondante. La fluorescence verte correspond à l'image en fluorescence classique et les clusters oranges montrent les enrichissements de la dCas9 au niveau des télomères en résolution STORM. **(C)** Nombre de localisations détectées pour les télomères dans les cellules HeLa ou HeLa 1.3. **(C')** Aire des télomères identifiée par une analyse par diagramme de Voronoi (en nm²). Images et graphiques issus de (Neguembor et al., 2017).

HaloTag

La protéine HaloTag (catalytiquement inactive) est dérivée d'une hydrolase qui forme un lien covalent avec son ligand. La protéine a une taille de 33kDa et peut être fusionnée à une protéine d'intérêt. Le ligand du HaloTag est couplé à un marqueur fluorescent. Pour marquer le locus génomique, les cellules sont transfectées avec un plasmide codant pour la protéine de fusion dCas9-HaloTag et les ARNg. Par la suite, l'ajout du ligand synthétique permet la visualisation du locus lorsque le ligand se fixe au HaloTag (Wu et al., 2019) **(Figure 45A)**. Le HaloTag peut être couplé à la microscopie super-résolution, cependant, à ma connaissance, aucune étude ne montre une telle combinaison pour imager des loci génomiques. En revanche, de plus en plus d'études utilisent le HaloTag comme un marqueur endogène d'une protéine d'intérêt. Par exemple, des protéines de la mitochondrie, du reticulum endoplasmique, de la membrane plasmique et du Golgi ont été taggées par le HaloTag, ce qui a permis leur détection en microscopie STED deux-couleurs (Bottanelli et al., 2016) **(Figure 45C)**. La microscopie STORM est

aussi un outil prometteur pour la visualisation des protéines fusionnées à l'HaloTag (Grimm et al., 2015).

SNAP-Tag

Le SNAP-Tag dérive de l'alkyltransférase hAGT qui réagit de manière covalente avec des dérivées de O⁶-benzylguanine (Keppler et al., 2003; Keppler et al., 2004). Les réactions SNAP-Tag ont une stoechiométrie prédictible et une cinétique rapide qui ne sont pas influencées par la protéine fusionnée au tag. Le principe du SNAP-Tag est le même que celui du Halo-Tag (Figure 45B et C). Un exemple d'application en microscopie super-résolution : H2B-SNAP-Tag. Les histones ont été imagées par microscopie STORM (Klein et al., 2010) (Figure 45D).

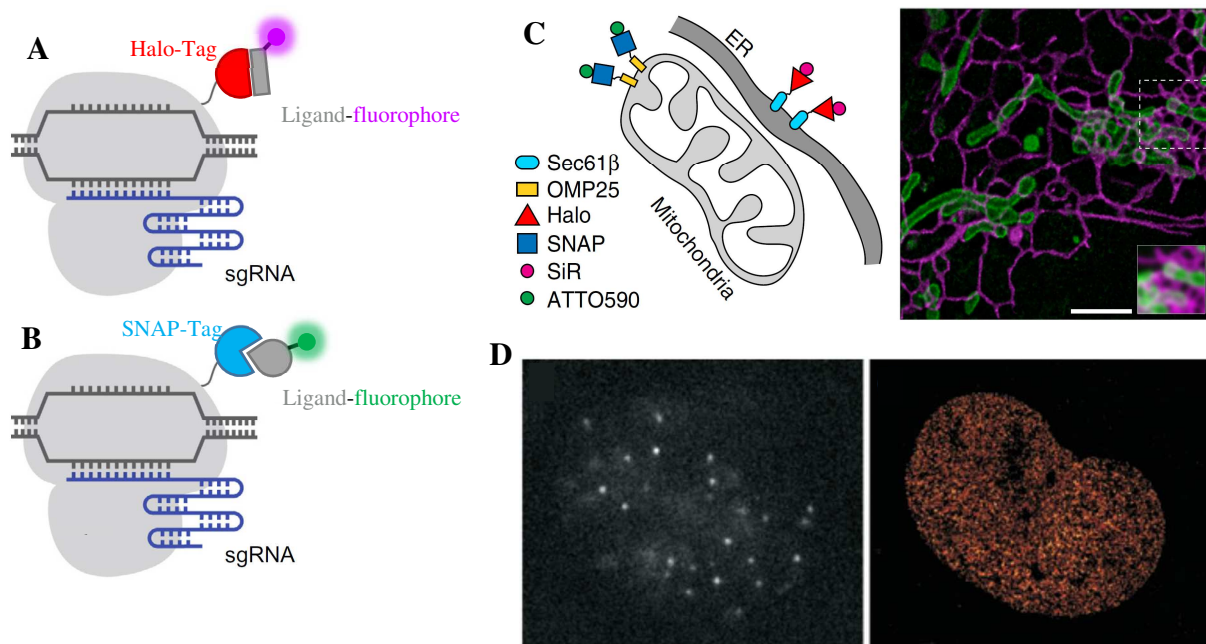


Figure 45 : Principe des HaloTag et SNAP-Tag et une application en microscopie super-résolution. (A) La protéine dCas9 est fusionnée à l'HaloTag. Celui-ci est reconnu par un ligand couplé à un fluorophore. Cela permet de reconnaître la séquence d'ADN d'intérêt avec un signal presque infini et un meilleur rapport signal sur bruit. (B) Le principe est le même que pour l'HaloTag, seuls le Tag et la nature du ligand changent. Cela permet de coupler les deux Tag au sein d'une même cellule et autorise l'imagerie deux-couleurs. A ce jour, je n'ai trouvé aucune application en microscopie super-résolution. Schémas issus de (Wu et al., 2019). (C) Nanoscopie STED de l'interaction dynamique entre réticulum endoplasmique (RE) et mitochondrie. Le schéma représente la stratégie de marquage du RE (Halo-Sec61β avec SiR-ligandHalo, magenta), et la mitochondrie (SNAP-OMP25 avec ATTO590-ligandSNAP, vert). Des cellules COS-7 ont été marquées de cette manière. L'image STED montre le RE en magenta et les mitochondries en vert. La zone encadrée donne un exemple d'interaction entre ces deux structures cellulaires. Le zoom-in montre une image équivalente à une résolution de 250 nm (confocale). Schéma et image issus de (Bottanelli et al., 2016). (D) SNAP-Tag et STORM en cellules vivantes. Les histones H2B ont été fusionnées au SNAP-Tag. Le ligand est couplé à un fluorophore compatible pour la microscopie STORM. L'image de gauche montre le « clignotement » des molécules en épifluorescence. L'image de droite est la reconstruction des localisations détectées (10 000 images) dans le noyau d'une cellule COS-7 vivante. Images issues de (Klein et al., 2010).

III.3.3. La régulation de la transcription en images

Les approches d'imagerie ont l'avantage de préserver l'état de la cellule, sa morphologie et son environnement. En parallèle avec l'analyse d'images et la modélisation mathématique, elles permettent la visualisation et la compréhension des mécanismes de l'expression génique (Pichon et al., 2018).

Détection de molécules d'ARN uniques en cellules fixées

La technique standard pour visualiser des ARNs en cellules fixées est apparue en 1998 et s'appelle l'hybridation *in situ* de molécules uniques ou smFISH (Femino et al., 1998). Dans cette technique, de multiples oligonucléotides fluorescents (de 10 à 50) (Femino et al., 1998; Raj et al., 2008) sont hybridés à un ARN cible. Chaque ARN est détecté comme un point non-résolu en microscopie classique à champ large. Il est aussi possible d'utiliser des sondes primaires non fluorescentes qui portent une séquence supplémentaire appelée « readout ». Cette séquence est reconnue par une sonde secondaire fluorescente (Figure 46A). Cela fournit plus de flexibilité dans les marqueurs fluorescents et autorise des synthèses de sondes primaires à bas coût (Chen et al., 2015; Choi et al., 2010; Tsanov et al., 2016; Wang et al., 2012) (Figure 46A et B).

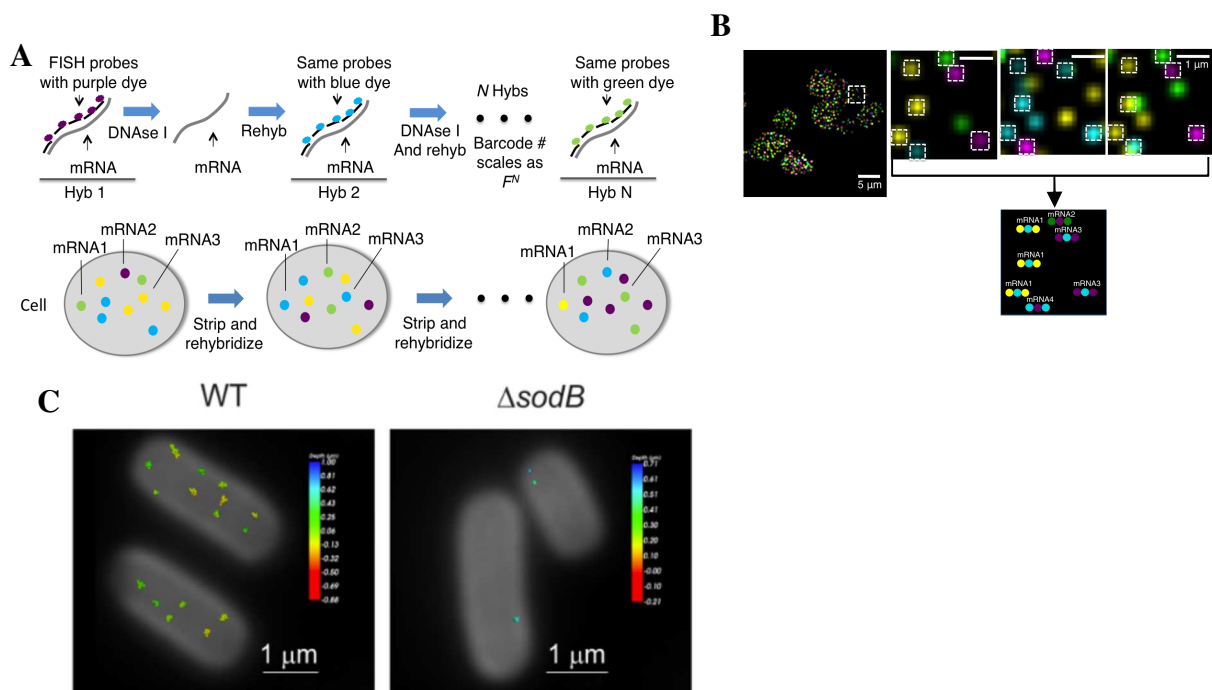


Figure 46 : smFISH multicouleurs et smFISH en 3D-SIM. (A) A chaque cycle d'hybridation, 24 sondes sont hybridées à chaque transcrite, imagées par les sondes fluorescentes puis éliminées par traitement à la DNase I. Les mêmes sondes sont utilisées pour les différents cycles mais avec un fluorophore différent. A chaque cycle d'hybridation, les mêmes points sont détectés mais la couleur associée au transcrite change. L'identité de l'ARNm est codée dans la séquence temporelle des différentes sondes fluorescentes. (B) Image issue de 3 cycles d'hybridation sur six Levures (à gauche, image plein champ). Douze gènes sont encodés grâce au code couleur final (en bas). Les grossissements montrent un exemple des trois cycles d'hybridation avec les mêmes points marqués par différentes couleurs (encadrés par des pointillés blancs). Chaque séquence colorée correspond à un transcrite différent. Les points qui ne colocalisent pas sont dus à une fixation non spécifiques des sondes. La fréquence d'apparition de chaque séquence correspond à la quantité de transcrits en cellule unique. Issu de <http://singlecell.caltech.edu/research/index.html> (C) Imagerie des transcrits sodB en microscopie STORM chez la bactérie. Superposition de l'image 3D-STORM (8000 images) des transcrits sodB marqués en smFISH (sondes couplées à la Cy5) avec une image de la membrane des bactéries sur le même plan. Dans la souche mutée $\Delta sodB$, très peu de molécules sont détectées en comparaison à la souche WT. Le code couleur représente la profondeur en Z. Images issues de (Arbel-Goren, Shapira, and Stavans 2017).

Cette méthode est adaptable à la microscopie super-résolution et est alors nommée super-resolved smFISH. Sans modifications expérimentales, la microscopie SIM s'est révélée être un bon candidat (Tantale et al., 2016; Trcek et

al., 2015). L'adaptation à la microscopie STORM est aussi possible, mais encore peu développée (Arbel-Goren et al., 2017) (**Figure 46C**).

Détection de molécules d'ARN uniques en cellules vivantes

Le système MS2/PP7 évoqué précédemment peut aussi marquer des ARNs en cellules vivantes. En effet, via la création d'un transgène enhancer-MS2-rapporteur. Plusieurs études chez la drosophile ont révélé la régulation spatiotemporelle précise de l'expression de gènes, au sein d'embryons en développement (Bothma et al., 2014; Garcia et al., 2013; Lucas et al., 2013). Une autre étude utilise l'approche deux couleurs MS2/PP7 pour suivre l'expression de deux promoteurs contrôlés en *cis* par un enhancer partagé (Fukaya et al., 2016). Les protéines MCP-FP et PCP-FP sont exprimées dans les cellules et se fixent aux ARNs tiges-boucles MS2 et PP7. Les ARNs MS2 et PP7 sont introduits artificiellement au sein de gènes rapporteurs et sont généralement multimérisés (entre 6 et 24 copies) pour amplifier le signal fluorescent (Gaspar and Ephrussi, 2015). L'analyse de Fukaya et al. montre une activation coordonnée des deux promoteurs (Fukaya et al., 2016).

En 2018, Chen et al. ont utilisé un système multicolore pour visualiser simultanément, l'enhancer endogène *eve* (décrit précédemment), la localisation du promoteur du gène rapporteur et son activité transcriptionnelle au sein d'embryons de drosophile vivants (Chen et al., 2018) (**Figure 47**). L'ARN tige-boucle MS2 a été introduit dans le gène *eve* endogène, par CRISPR et l'ARN PP7 a été ajouté au gène rapporteur (**Figure 47A**). Les protéines MCP et PCP fusionnées à des PFs (Blue Fluorescent protein 2 (BFP2) et mKate2, respectivement) (**Figure 47A**) se fixent sur les ARNs tiges-boucles en formation, ce qui fournit un « readout » sur l'activité transcriptionnelle associée (**Figure 47B**). Enfin, l'exploitation du système ParB/INT (décrit précédemment) permet la visualisation du gène rapporteur indépendamment de son activité (**Figure 47**). Les séquences *INT* sont incluses dans le gène rapporteur et la protéine ParB est fusionnée à la GFP (**Figure 47A**). Les trois foci fluorescents (observation confocale en live et time lapse) fournissent un moyen pour mesurer les distances physiques entre enhancer et rapporteur, ainsi qu'un suivi de l'activité transcriptionnelle du rapporteur. Ces observations ont montré l'interaction dynamique entre la topologie de la chromatine et l'activité transcriptionnelle (cohérent avec la première partie de l'introduction) (Chen et al., 2018).

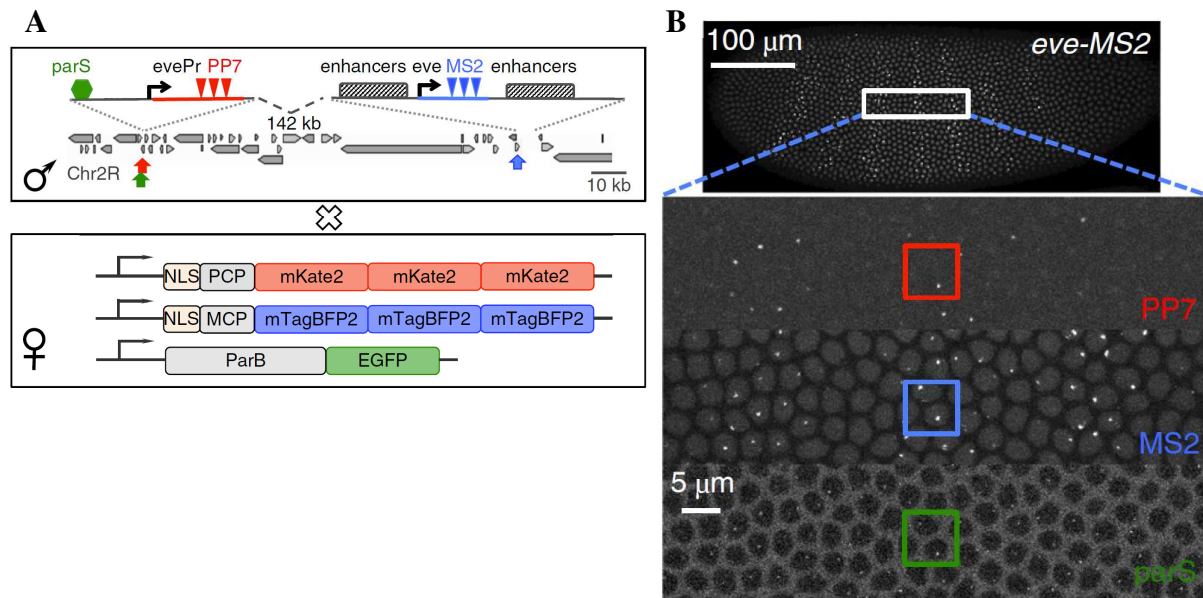


Figure 47 : Imagerie trois-couleurs des distances enhancer-promoteur et de l'activité transcriptionnelle dans l'embryon de drosophile vivant. (A) Les mâles portant un locus *eve* modifié sont croisés avec les femelles portant les protéines fluorescentes bleue, rouge et verte fusionnées aux protéines MCP, PP7 et ParB, respectivement. Dans les mouches mâles, un gène rapporteur avec le promoteur *eve* (*evePr*) contrôlant la transcription de *PP7* est inséré 142 kb en amont du locus *eve* endogène taggé avec *MS2*. La séquence *parS* (= *INT*) est intégré à proximité du rapporteur *evePr-PP7*. (B) Snapshot d'un embryon représentatif généré à partir des croisements montrés en (A) (panneau du haut). Les embryons montrent des foci fluorescents pour *MS2*, *PP7* et *parS* dans les différents canaux (bleu, rouge et vert, respectivement) (panneau du bas). Schéma et images issus de (Chen et al., 2018).

III.3.4. La microscopie super-résolution pour visualiser les IPPs

III.3.4.1. Single-molecule localization microscopy (SMLM) multi-couleurs

La microscopie SMLM est souvent utilisée pour révéler des IPPs. Les deux couleurs sont imagées par une ou deux caméras, en séquentiel ou en simultané, respectivement (Vangindertael et al., 2018). Dans les deux cas, l'alignement des régions imagées doit être parfait car cela pourrait affecter les mesures de colocalisation des différents objets. La calibration du système est donc nécessaire, en combinaison avec l'application d'algorithmes spécialisés (Erdelyi et al., 2013). En général, des micro-billes fluorescentes sont utilisées comme marqueurs fiduciaux et sont intégrées au milieu de montage. La densité de ces fiduciaux doit être contrôlée afin d'éviter le recouvrement de toutes les structures d'intérêt ou au contraire un nombre insuffisant de sphères pour appliquer l'algorithme de correction.

Le STORM deux-couleurs a été appliqué pour révéler l'interaction complexe entre intégrine, actine, taline et vinculine pour leur fonction des podosomes cellulaires (Van Den Dries et al., 2013). En microscopie PALM, les PFs photo-switchables vertes (PAGFP, Dronpa) et oranges (variants EOS) autorisent l'imagerie PALM deux-couleurs. Cependant, il est difficile de les combiner en

raison de la forme verte des protéines EOS. Même s'il est possible d'imager puis de photobleacher la PF EOS avant d'imager l'autre canal (Shroff et al., 2007), le développement de la PA-mCherry a simplifié le processus (Subach et al., 2009b). Il est aussi possible de combiner PALM et STORM. En effet, pour prouver la faisabilité de la technique, le FT Beaf-32, chez la drosophile, a été doublement marqué dans les cellules S2. En microscopie conventionnelle, la protéine nucléaire Beaf-32 montre une distribution homogène (Georgieva et al., 2016). La protéine Beaf-32 est à la fois marquée par immunofluorescence (anticorps primaire couplé à l'Alexa647) et exprimée par les cellules S2 (transfection transitoire) en fusion avec la PF mEos2. Les auteurs ont montré la faisabilité de la technique ainsi que l'effet de la taille du tag sur les données de colocalisation (Georgieva et al., 2016). En effet, à ce niveau de résolution, la taille des anticorps a son importance.

L'imagerie deux-couleurs en 3D-SMLM est aussi une possibilité pour calculer le taux de colocalisation entre deux protéines d'intérêt. Une étude a utilisé la microscopie super-résolution deux-couleurs PALM/STORM sur une épaisseur de 4 μm , au sein de cellules de mammifères et de levures. Les précisions de localisation latéral et axial atteintes sont de 20 et 50 nm respectivement (Hajj et al., 2014). Une telle résolution donne accès à l'information sur une interaction directe potentielle entre les deux protéines imagées.

III.3.4.2. Une combinaison entre microscopie PALM et BiFC : la BiFC-PALM

La BiFC-PALM requiert une protéine fluorescente photo-activable qui conserve son abilité de photo-activation et d'émission de fluorescence une fois reconformée, après sa séparation en deux fragments complémentaires. Par exemple, la Dronpa n'est pas un bon candidat car son intensité est trop faible (Lee et al., 2010). Une autre étude a montré que trois protéines photoswitchables supportent la complémentation de fluorescence : la PA-mCherry1, la Dendra2 et un variant de la Dronpa (Lee et al., 2014). En effet, la PA-mCherry1 a été exploitée par Nickerson et al. pour montrer que les complexes Ras/Raf forment des structures d'ordre supérieur (Nickerson et al., 2014; Nickerson et al., 2015), en accord avec d'autres études antérieures (Nan et al., 2013; Tian et al., 2007) (Figure 48A).

Des expériences de BiFC-PALM ont été réalisées dans des cellules U2OS (Human Bone Osteosarcoma Epithelial Cells) (Nickerson et al., 2014; Nickerson et al., 2015) (Figure 48A). Cette étude caractérise aussi les propriétés de la PAmCherry1 utilisée en BiFC-PALM. La PAmCherry1 conserve ses propriétés originales de photoactivation rapide, de fort contraste et une émission de photon relativement élevée (Fan et al., 2008). De plus, la reconstitution de la PAmCherry est efficace à une température physiologique (37°C) (Nickerson et al., 2014; Nickerson et al., 2015). En raison de son unique cycle de

photoactivation/émission/bleaching, la PAmCherry1 permet de compter le nombre exact de molécules uniques détectées (Nan et al., 2013). La résolution atteinte en culture cellulaire est de 18 nm environ.

La protéine photo-convertible monomérique mEos3.2 est aussi un bon candidat pour la BiFC-PALM. En effet, elle démontre des performances excellentes en imagerie PALM en termes de brillance, de temps de maturation et de densité de marquage (Zhang et al., 2012). La BiFC-PALM avec mEos3.2 a révélé la forme, la distribution et la dynamique (tracking des molécules uniques en BiFC-PALM) des IPPs entre deux protéines bactériennes (*E.coli*) EFTu-MreB (Liu et al., 2014b) (Figure 48B). La BiFC-PALM permet de révéler uniquement les protéines en interaction (Figure 48C), contrairement à la microscopie PALM deux-couleurs, où ces interactions peuvent être « diluées » dans les nombreux signaux des deux protéines d'intérêt libres.

Enfin, dans une étude de 2017, la BiFC a été combinée avec la PF rsEGFP2, évoquée précédemment. Dans ce cas, l'échelle super-résolutive est atteinte grâce à la technique de microscopie RESOLFT. L'étude a montré l'interaction entre les protéines Bcl-xL et Bak ainsi que leur dynamique au sein de la membrane des mitochondries, en cellules vivantes (Wang et al., 2017).

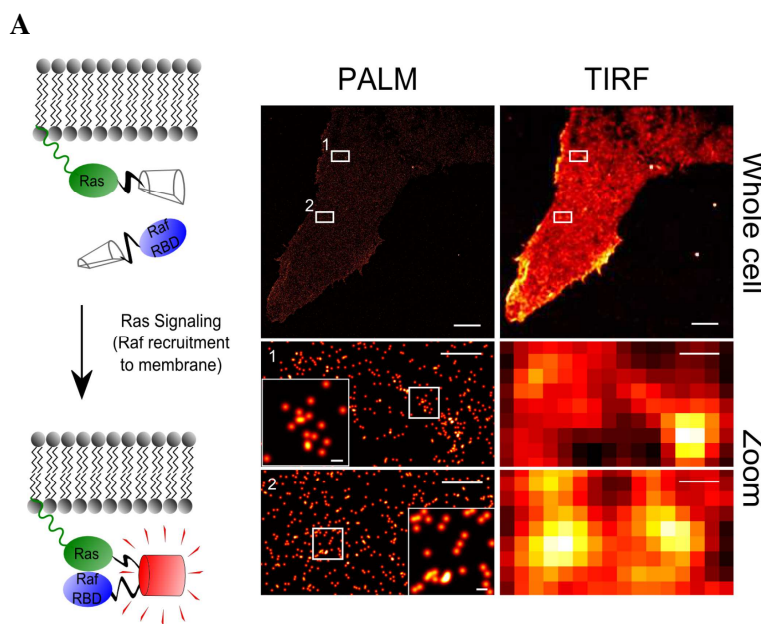
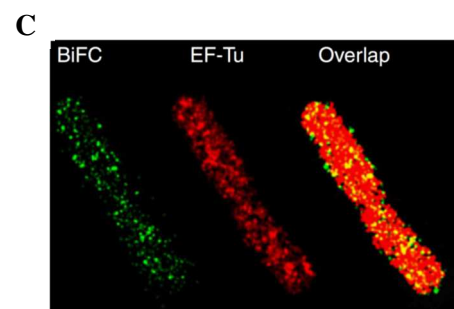
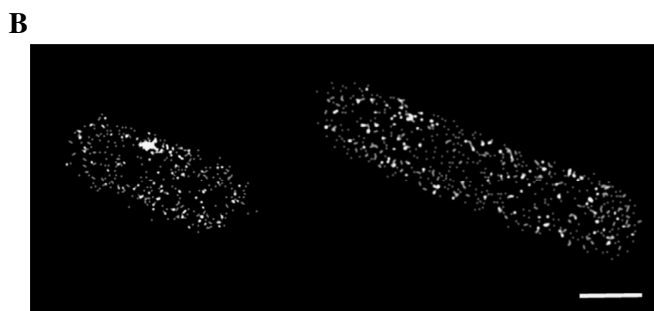


Figure 48: BiFC-PALM imaging in cultured cells and bacteria. (A) A gauche. Pour la BiFC, KRas G12D et CRaf RBD ont été fusionnés aux fragments de la PAmCherry1. L'interaction entre Ras et Raf à la membrane rapprochent les deux fragments et permet la reconstitution de la PAmCherry1. **A droite.** Images PALM (gauche) et images TIRF conventionnelle (droite) d'une cellule U2OS qui exprime les protéines de fusions montrées en (A). Les panneaux du bas sont des zoom-in des encadrements blancs 1 et 2 sur les images plein champ. Barres d'échelle du haut vers le bas : 5µm, 500 nm et 50 nm. Images issues de (Nickerson et al., 2014; Nickerson et al., 2015). **(B)** Images BiFC-PALM de l'IPP entre les protéines bactériennes EFTu et MreB dans des cellules *E. coli* fixés. **(C)** Distribution des complexes EFTu-MreB obtenue par BiFC-PALM (vert) comme une sous-population du marquage total EF-Tu-SNAPTag (+ ligand-Alexa647, rouge). Barre d'échelle = 1 µm. Issu de (Liu et al., 2014b).



PROJET DE THESE

Mon travail de Thèse est entièrement dédié à l'imagerie des complexes Hox/cofacteur chez la drosophile.

La première partie de mon travail de Thèse a consisté à mettre en place des outils permettant de visualiser en microscopie super résolution BiFC-PALM la fixation de complexes Hox/cofacteur sur des séquences ADN cibles spécifiques (Figure 49). Ces outils ont été appliqués pour mesurer avec précision l'enrichissement de différents complexes Hox/cofacteur au niveau d'un enhancer connu (appelé *fkx250*) du gène cible *forkhead (fkx)* dans les glandes salivaires de la larve de drosophile. Pour cela, différentes constructions ont été générées avec la protéine fluorescente PAmCherry1 entière ou fragmentée afin d'établir les paramètres propres d'acquisition et d'analyse. De plus, j'ai adapté le système ParB/INT pour marquer différentes constructions sauvages ou mutées de l'enhancer *fkx250*, et analyser leur co-localisation avec les complexes Hox/Cofacteur en imagerie confocale. Mes analyses confirment un enrichissement spécifique des complexes Hox/Exd sur les différents types d'enhancer *fkx250* (Mann et al., 2009). Surtout, mes résultats préliminaires indiquent la possibilité de quantifier le nombre exact de complexes Hox/Exd fixés sur l'enhancer *fkx250* à l'échelle super-résolutive. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe de François Payre (Centre de Biologie du Développement, Toulouse), Christophe Place (Laboratoire de Physique de l'ENS de Lyon), et Christophe Chamot, Jacques Brocard et Elodie Chatre (plateforme d'imagerie PLATIM de la SFR Biosciences de Lyon).

La deuxième partie de mon travail de thèse concerne l'analyse d'une nouvelle interaction entre les protéines Hox avec la Lamine C (LamC) pour une répression transcriptionnelle active des gènes de l'autophagie dans le corps gras de la larve de drosophile. Ce travail a permis de révéler un profil de co-expression typique au sein du noyau par imagerie confocal « lightning » et l'importance de contrôler le positionnement des loci génomiques pour une régulation fine de la transcription. Ce travail sera présenté sous forme d'article car il est proche d'être abouti pour une soumission future.

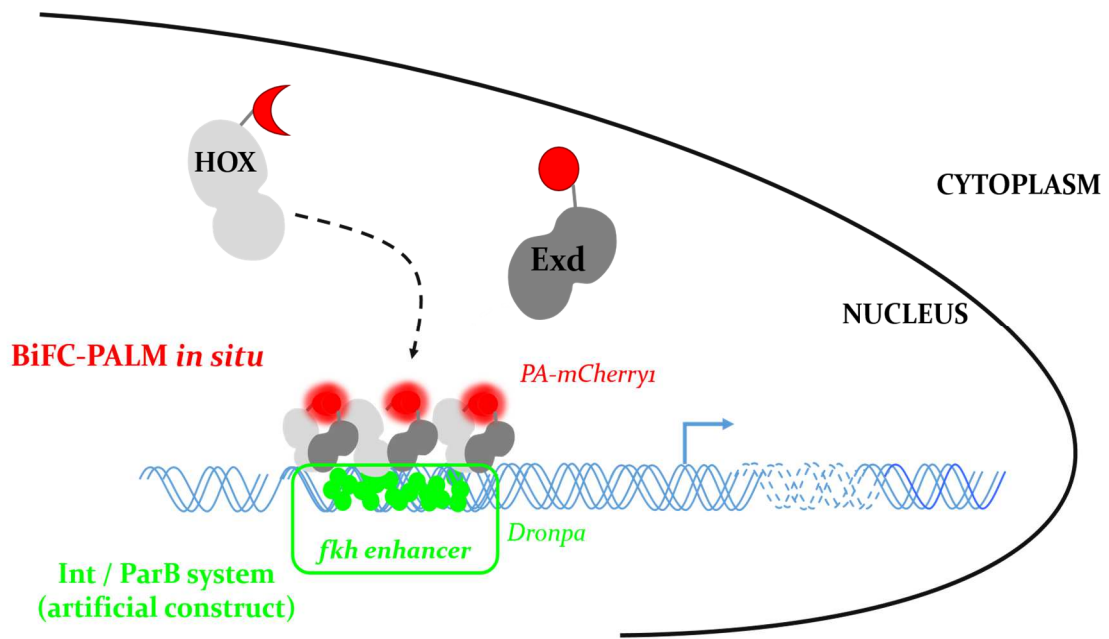


Figure 49 : Schéma récapitulatif du projet de thèse sur la régulation transcriptionnelle de l'enhancer *fkh* par les complexes Hox/Exd, à l'échelle super-résolutive.

CHAPITRE 2

RESULTATS

I. Visualisation des complexes Hox/Exd sur le locus génomique *fkh* : résolution confocale (Lightning)

La régulation transcriptionnelle est le sujet principal de nombreuses recherches et est un mécanisme indispensable pour assurer les fonctions cellulaires d'un organisme. Les avancées technologiques dans le monde de la microscopie ouvrent de nouvelles opportunités pour visualiser différentes étapes de ce mécanisme, comme les dynamiques de fixation d'un FT (Mir et al., 2018; Tsai et al., 2017), la localisation de loci génomiques associée au suivi de la transcription (en live) (Chen et al., 2018), ou encore la visualisation d'un FT sur un locus d'intérêt (Gomez-Lamarca et al., 2018). Cependant, un unique FT n'est pas suffisant pour réguler finement l'activation ou la répression de la transcription d'un gène. En effet, différents complexes de FT coopèrent pour atteindre une telle précision de régulation. La visualisation de la fixation d'un complexe (binaire) sur sa séquence régulatrice cible serait donc un atout pour mieux déchiffrer la régulation transcriptionnelle.

Au cours de ma thèse, j'ai combiné différentes techniques expérimentales et d'imagerie afin de visualiser l'enrichissement de plusieurs complexes Hox/Exd sur le locus *forkhead (fkf)* au sein des glandes salivaires de drosophile. Les modalités de fixation des différents couples Hox/Exd sur cet enhancer a déjà été étudié *in vitro* et *in vivo* (Ryoo and Mann, 1999), ce qui en fait un modèle pertinent pour établir les outils nécessaires à leur visualisation. Dans cette étude, des expériences *in vitro* (retard sur gel, EMSA) sur trois oligonucléotides : *fkf[250]*, *fkf[250]^{exd}* (mutation dans la séquence de fixation du cofacteur Exd), *fkf[250]^{Scr}* (mutation dans la séquence de fixation de la protéine Hox Scr) et *fkf[250^{con}]* (mutations qui transforment la séquence en un site de fixation consensus pour les complexes Hox/Exd). Ils ont montré une préférence de fixation des hétérodimères Scr/Exd sur l'oligo *fkf[250]*, en comparaison aux autres hétérodimères Antp-Exd, Ubx/Exd et AbdA-Exd. Sur les oligo mutés *fkf[250]^{exd}* et *fkf[250]^{Scr}*, la fixation des complexes Scr/Exd est abolie. Enfin, les quatre hétérodimères Scr/Exd, Antp-Exd, Ubx/Exd et AbdA-Exd se fixent avec une forte affinité à l'oligo *fkf[250^{con}]*. Les résultats sont résumés dans le schéma représenté en (Figure 50).

Pour mon projet de thèse, j'ai utilisé la séquence entière de l'enhancer *fkf250* sauvage (voir Mat&Met) répétée dix fois (*fkf250*). Pour l'enhancer muté, j'ai combiné les deux mutations sur les sites de fixation de Scr et Exd évoquées

précédemment (*fkh250^{MUT}*). Enfin, les mêmes mutations que pour *fkh[250^{con}]* ont été utilisées pour la séquence consensus (*fkh250^{CONS}*).

Dans un premier temps, j'ai utilisé la méthode la plus répandue pour visualiser un locus d'intérêt : le FISH. Pour visualiser les complexes Hox/Exd, j'ai utilisé la BiFC. La partie C-term de la Vénus est fusionnée à la protéine Hox d'intérêt (ici Scr ou Ubx) (VC-Hox) et la partie N-terminale est fusionnée au cofacteur canonique Exd (VN-Exd).



Figure 50 : Schéma récapitulatif des conclusions de Ryoo et Mann, 1999, *in vitro*. Les complexes Hox/Exd sont représentés par les formes bleues/grises ou jaunes/grises. Les points rouges marquent les différents types d'enhancer *fkh250* (ParB1-mCherry, voir plus loin). Les séquences d'ADN en-dessous des schémas correspondent aux sondes utilisées pour les expériences de gels retards réalisés par Ryoo et Mann. Les lettres rouges ou noires montrent les mutations dans l'enhancer *fkh250* initial.

I.1. Visualisation de l'enrichissement des complexes Hox/Exd sur le gène fkh : FISH

Les constructions VC-Hox et VN-Exd sont exprimées sous le contrôle du système UAS-Gal4 avec le driver *sgs3Gal4* (Zouaz et al., 2017). L'expression commence au début du stade wandering, c'est-à-dire lorsque les larves arrêtent de se nourrir et montent sur la paroi du tube pour entrer en pupaison et initier la métamorphose (Hales et al., 2015). Ce stade n'est pas le stade physiologique de régulation du gène *fkh*. En effet, les complexes Scr/Exd activent la transcription du gène *fkh* dans les placodes salivaires (stade embryonnaire) pour former les glandes salivaires (organe larvaire et adulte (Zhou et al., 2001). Au stade larvaire, Scr n'est plus exprimé et c'est la protéine forkhead (*fkh*) qui permettrait l'auto-régulation du gène *fkh* pour maintenir l'identité de l'organe (Zhou et al., 2001). Cependant, le stade larvaire est plus propice à l'imagerie car les noyaux des glandes salivaires sont plus gros (30-40 μm , **Figure 51**) que ceux du stade embryonnaire (5-10 μm , (Xu et al., 2012)) et contiennent des chromosomes polytènes géants (Zykova et al., 2017). Cela facilite la quantification des enrichissements fluorescents à l'échelle d'un locus génomique.

Dans un premier temps, j'ai testé la BiFC VC-Hox / VN-Exd dans les glandes salivaires larvaires. Les deux partenaires sont surexprimés dans les glandes salivaires grâce au driver *sgs3Gal4*. Les images ont été prises en microscopie confocale Lightning (traitement post-acquisition, voir Mat&Met). Le marquage DAPI (chromatine fermée) et les marquages BiFC Scr/Exd et Ubx/Exd montrent une distribution en bandes, vues sous différentes orientations : transversale (cercle) ou latérale (bande) (flèches blanches, **Figure 51A et A'**). La quantification du signal BiFC dans les noyaux de glandes salivaires montre que la BiFC Scr/Exd est environ trois fois plus faible que la BiFC Ubx/Exd (**Figure 51A, A' et B**), en dépit d'un niveau d'expression équivalent des différentes constructions (Hudry et al., 2011). Pourtant, certaines bandes restent très intenses par rapport au signal BiFC Scr/Exd total. La taille des noyaux de glandes salivaires et la microscopie Lightning permettent de distinguer clairement une alternance entre les bandes de DAPI et BiFC (merge, **Figure 51A et A'**).

Par la suite, pour visualiser les complexes BiFC sur un locus génomique cible, j'ai combiné la méthode de BiFC avec l'expérience de FISH sur le locus *fkf* (voir Mat&Met) dans les glandes salivaires larvaires. Le traitement drastique du FISH (température de dénaturation élevée : 80°C, Voir Mat&Met) abolit complètement le signal BiFC pour Scr/Exd (**Figure Supplémentaire 1A et B**). Cependant, le signal BiFC des complexes Ubx/Exd, résiste au traitement FISH (**Figure 51C et Figure Supplémentaire 1B**). En effet, en dépit d'une réduction du rapport signal sur bruit, quelques bandes sont encore visibles (**Figure 51C**).

Le signal FISH mesure environ 5 µm (**Figure 51C**) et on peut noter qu'il est localisée dans une zone de faible intensité du signal Ubx/Exd en comparaison au reste du noyau (**Figure 51C**), ce qui semble cohérent avec les résultats *in vitro* de fixation des complexes Ubx/Exd sur l'enhancer du gène *fkf* (*fkf250*) (Ryoo and Mann, 1999).

Le traitement Lightning est particulièrement efficace dans cette condition, lorsque le signal BiFC est très faible. En effet, le rapport signal sur bruit est considérablement amélioré, ce qui permet de voir l'apparition de bandes dans le signal BiFC, qui sont difficiles à visualiser sur l'image non traitée (**Figure 51C et Figure Supplémentaire 1D**). De plus, après le traitement Lightning, il est possible de distinguer des « boucles » aux deux extrémités du locus *fkf* (crop, **Figure 51C**), invisibles en microscopie confocale classique (crop, **Figure Supplémentaire 1D**).

Les signaux BiFC Ubx/Exd sont exploitables, mais, sans comparaison possible avec les complexes Scr/Exd, la combinaison FISH / BiFC n'est pas adaptée à la quantification des enrichissements des complexes sur le locus *fkf*. Par conséquent, une autre méthode de marquage des loci génomiques est nécessaire.

Dans la littérature, une étude a montré l'enrichissement du FT Suppressor of Hairless (Su(H)) sur le locus cible Enhancer of split-Complex (E(spl)-C), au sein de glandes salivaires larvaires (Gomez-Lamarca et al., 2018). Le locus (E(spl)-C) a été marqué par le système ParB/INT décrit précédemment (voir Introduction). J'ai donc choisi ce système pour marquer l'enhancer connu et caractérisé : *fkh250*, dans les glandes salivaires de drosophile.

1.2. Visualisation de l'enrichissement des complexes Hox/Exd sur l'enhancer *fkh250* : système ParB/INT

Afin de visualiser l'enhancer *fkh250* et la BiFC (Vénus) en simultanément, j'ai choisi une lignée de drosophile ParB1-mCherry pour marquer le locus en rouge (voir Mat&Met). J'ai modifié le vecteur contenant les trois séquences *INT1* afin d'insérer dix répétitions de l'enhancer *fkh250* sauvage (*fkh250*), muté (*fkh250_{MUT}*) ou consensus (*fkh250_{CONS}*), en aval de celles-ci (voir Mat&Met). Cette construction a ensuite été intégrée dans le génome de la drosophile par recombinaison. Ces

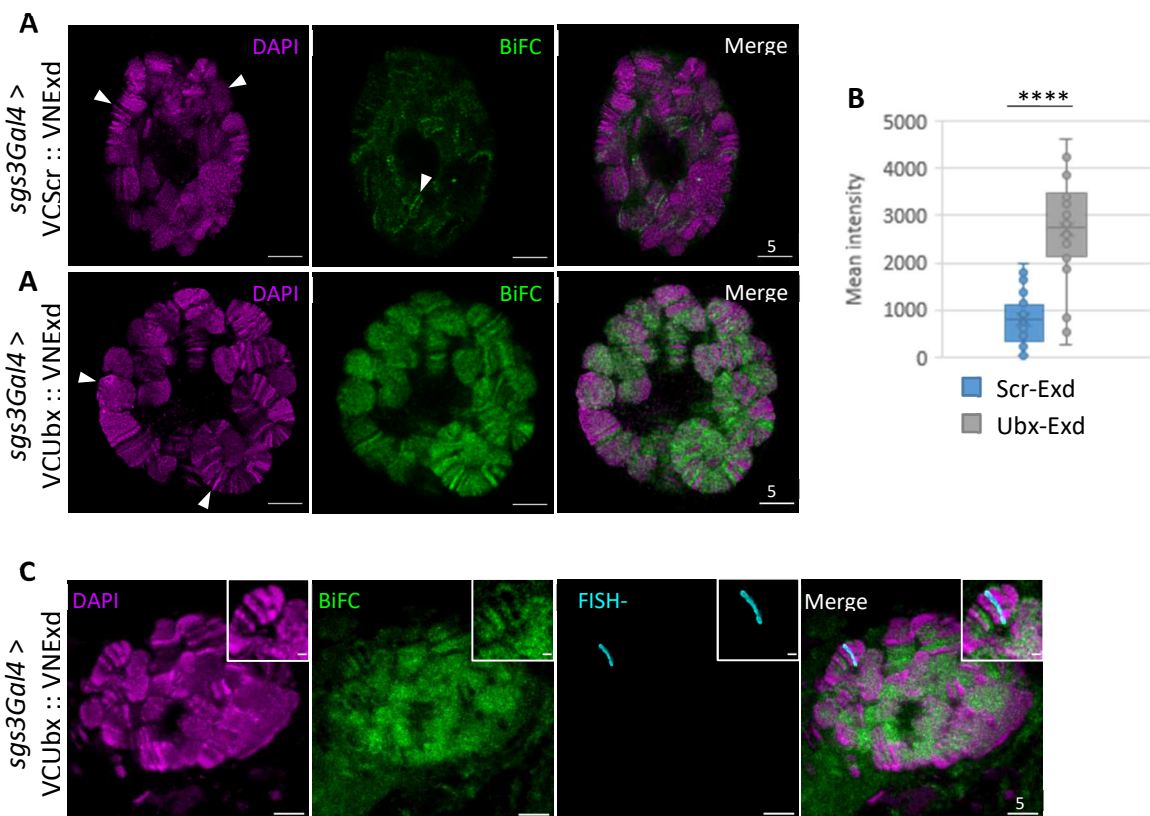


Figure 51 : BiFC et FISH dans les glandes salivaires de drosophile, en microscopie confocale Lightning. (A) Les constructions VC-Scr ou VC-Ubx ont été coexprimées avec la construction VN-Exd sous le contrôle du driver *sgs3Gal4*. Des glandes salivaires de larves au stade wandering ont été disséquées puis montées dans le Vectashield DAPI (magenta). La BiFC Hox/Exd est représentée en vert. (B) Quantification du signal BiFC Scr/Exd ou Ubx/Exd dans les noyaux de glandes salivaires de drosophile. p -value = $6,973E-09 < 0,0001$. (C) Expérience de FISH pour le locus *fkh* en association avec la BiFC Ubx/Exd. Le grossissement dans le coin en haut à droite des images correspond à l'encadrement blanc dans l'image initiale. Barre d'échelle dans l'encadré = 1 μ m.

outils m'ont permis de quantifier les enrichissements respectifs des différents complexes Hox/Exd sur les enhancers *fkh250*, *fkh250_{MUT}* et *fkh250_{CONS}* (Erreur ! Source du renvoi introuvable.).

Dans le cas de l'enhancer *fkh250* sauvage, la quantification du signal BiFC (voir Mat&Met) montre un enrichissement des complexes Scr/Exd sur l'enhancer *fkh250*, en comparaison avec les complexes Ubx/Exd (Figure 52A-C). Si l'on compare *fkh250* et *fkh250_{MUT}* (Figure 52D-F), on observe une diminution (d'un facteur >2) du signal BiFC des complexes Scr/Exd sur l'enhancer muté (*fkh250_{MUT}*). Enfin, en comparant les complexes Scr/Exd et Ubx/Exd sur l'enhancer consensus *fkh250_{CONS}*, aucun changement d'intensité n'est observable (Figure 52G-I). De plus, la fixation des complexes Ubx/Exd sur *fkh250_{CONS}* est plus abondante que sur *fkh250* (Figure 52A et I). L'ensemble de ces résultats est cohérent avec les expériences de retard sur gel réalisées par Ryoo and Mann (Ryoo and Mann, 1999).

Les images Lightning des différents enhancers ne sont pas toutes homogènes. En effet, les bandes correspondant à l'enhancer *fkh250_{MUT}* ont une intensité faible en comparaison à l'enhancer *fkh250* sauvage (Figure 52A, B, D et E). Les noyaux avec l'enhancer *fkh250_{CONS}* présente une fluorescence diffuse au sein du noyau, qui est très rarement retrouvée dans les autres cas (Figure 52G et H). Enfin, en fonction de l'orientation, l'aspect des enhancers change. En effet, la représentation en bande est plus illustrative, cependant sur un stack d'images complet, le signal de l'enhancer n'apparaît pas toujours sous cette forme. En fonction de la position dans le stack et de l'orientation de l'ADN, l'enhancer peut apparaître comme un groupement de plusieurs signaux intenses reliés par un signal plus faible (Figure Supplémentaire 2).

Dans un tel contexte (noyaux de 40 µm de diamètre et chromosomes polytènes), la quantification d'intensité de fluorescence est suffisante pour calculer un enrichissement de complexes binaires sur leur séquence cible. Cependant, avec ce type de résolution, il est difficile de quantifier de manière exacte, le nombre de complexes Hox/Exd fixés sur l'enhancer *fkh250*. En effet, les mesures d'intensités ne sont pas assez précises en raison de la PSF de chaque fluorophore, qui « élargit » la zone de fluorescence et donc de quantification.

Pour comprendre et visualiser la régulation fine de la transcription sur une séquence spécifique, dans un embryon de drosophile par exemple (diamètre d'un noyau = 5 µm), il est important d'atteindre une résolution qui permet de quantifier un nombre exact de molécules ou de complexes. C'est pourquoi j'ai décidé d'exploiter la microscopie super-résolution PALM pour atteindre cet objectif. Pour développer les outils et établir les paramètres d'acquisition en microscopie super-

résolution, j'ai choisi de continuer dans le même contexte tissulaire pour faciliter l'établissement des paramètres. De plus, cela permettra de comparer les résultats obtenus avec les conclusions issues de l'analyse en microscopie confocale Lightning.

II. Visualisation des complexes Hox/Exd sur l'enhancer *fkh250* à l'échelle super-résolutive

Comme expliqué dans l'introduction, en microscopie PALM, l'utilisation de protéines photo-activables est indispensable. Par conséquent, j'ai choisi de remplacer la Vénus par la PAmCherry1, car celle-ci peut être exploitée en BiFC-PALM (voir Introduction). A ma connaissance, la PAmCherry n'a jamais été visualisée en microscopie PALM *in situ*. Dans un premier temps, il est donc nécessaire de montrer la possibilité d'imager des noyaux de glandes salivaires en microscopie PALM. En effet, il est connu que l'auto-fluorescence et l'épaisseur des tissus dispersent le rayon laser ce qui diminue l'efficacité d'excitation des fluorophores. Ceci pourrait être un facteur limitant pour imager des structures à l'intérieur de la glande salivaire (comme un FT dans un noyau, environ 30 μm au-dessus de la surface) et non à proximité directe de la surface.

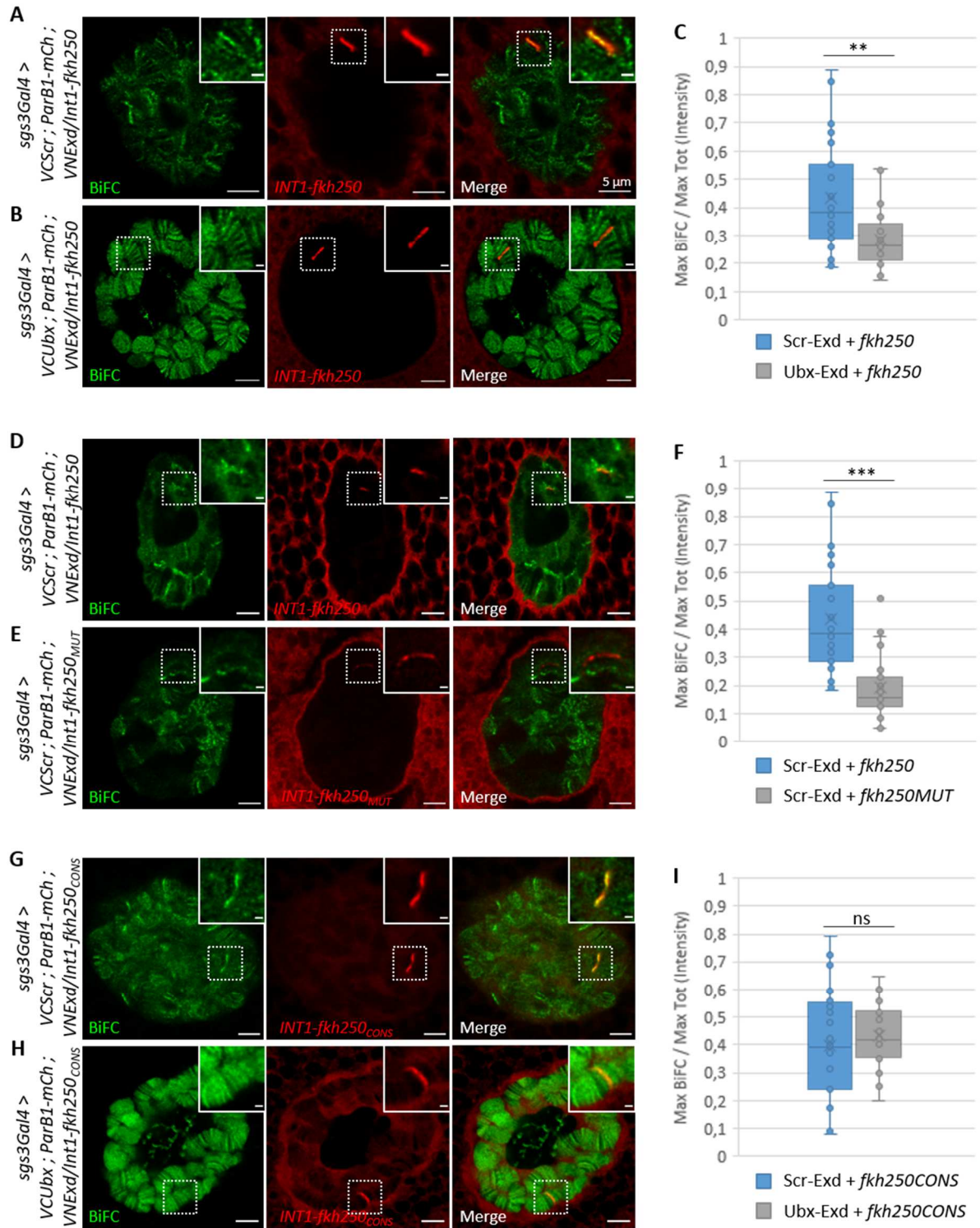


Figure 52 : Quantification des enrichissements Hox/Exd au niveau des enhancers *fkh250*, *fkh250MUT* et *fkh250CONS*, en microscopie confocale Lightning. (A-H) Des glandes salivaires larvaires exprimant la BiFC Hox/Exd et portant les séquences *INT1-fkh250* ont été disséquées puis fixées. La BiFC est représentée en vert (Vénus) et les enhancers en rouge (ParB1-mCherry). Chaque image est une coupe optique d'un noyau au niveau de la bande d'un enhancer. Les cadres blancs pointillés correspondent à l'image zoomée dans le coin en haut à droite de chaque image, ils sont centrés sur les enhancers. Les images ont été prises en microscopie confocale Lightning (voir Mat&Met). Barre d'échelle des grossissements = 1 μ m. (C, F et I) Quantifications d'intensité maximale du signal BiFC au niveau de l'enhancer, normalisée par l'intensité maximale dans le noyau entier. (C) p-value = 0,0011. (F) p-value = 1,51E-06. (I) p-value = 0,484.

II.1. Observation de la protéine Hox Ubx au sein des noyaux de glandes salivaires, en microscopie PALM

Pour atteindre cet objectif, la protéine Hox Ubx a été fusionnée à la PAmCherry1 entière (Voir Mat&Met). Les noyaux de glandes salivaires ont ensuite été imagés en microscopie PALM à une profondeur de 30 μm au-dessus de la surface. Un exemple de la distribution de la protéine Ubx, à l'échelle super-résolutive (PALM), est montré sur la **Figure 53A**. La protéine Ubx est distribuée dans le noyau sous forme de clusters d'environ 4 μm de diamètre (**Figure 53A**). On observe des clusters de grande taille (correspondant aux bandes des chromosomes polytènes) ainsi que des regroupements plus petits de molécules Ubx, inclus dans les premiers (panneau central, **Figure 53A**). La grande zone dépourvue de points représente le nucléole (**Figure 53A**, flèche bleue). Des successions linéaires de points ont tendance à former des bandes (**Figure 53A**, pointillés violets). Ceci est cohérent avec les images confocales où des bandes apparaissent, en fonction de l'orientation des chromosomes polytènes (**Figure 53A**). Une acquisition plus longue, avec plus d'images pourrait permettre de mieux visualiser ces bandes en microscopie PALM.

Les données procurées par le software d'analyse permettent de déterminer les caractéristiques des points fluorescents détectés. En effet, il est important que ces résultats soient cohérents avec les propriétés d'un fluorophore. Par exemple, la PSF théorique d'un fluorophore est autour de 250 nm et la PSF mesurée dans le cas de la PAmCherry est de 240 nm (**Figure 53F**). De plus en microscopie PALM, une précision de localisation comprise entre 20 et 60 nm est attendue. La précision moyenne mesurée est de 33 nm en moyenne (**Figure 53G**). Enfin, le nombre de photons émis par une protéine fluorescente se compte en quelques centaines de photons, contrairement aux marqueurs organiques utilisés pour le STORM pour lesquels les photons émis sont comptés en plusieurs milliers voire dizaine de milliers. En effet, dans le cas de la PAmCherry1 imagée au sein des noyaux de glandes salivaires, le nombre moyen de photons émis par une molécule est autour de 220 (**Figure 53H**). Ces différents paramètres permettent de s'assurer que les points visibles sur l'image correspondent à des fluorophores et non du bruit de fond.

Il est donc possible d'appliquer la microscopie PALM pour visualiser des molécules uniques au sein des noyaux de glandes salivaires. Cependant, afin de visualiser des complexes binaires sur un locus génomique précis, il est maintenant nécessaire d'adapter la BiFC-PALM à ce système expérimental.

II.2. Observation des complexes Ubx/Exd au sein des noyaux de glandes salivaires, en microscopie PALM

Le système BiFC-PALM a déjà montré son efficacité pour imager différentes interactions au sein de cellules en culture (voir Introduction). Cependant, à ma connaissance, aucun article ne rapporte l'adaptation de cette technique aux tissus multicellulaires. Par conséquent, j'ai établi les paramètres d'acquisition pour montrer la spécificité de la BiFC-PALM au sein des noyaux de glandes salivaires (Voir Mat&Met).

La protéine Hox Ubx a été fusionnée à la partie C-term de la PAmCherry1 (PAmCC-Ubx) et le cofacteur connu Exd à la partie N-term (PAmCN-Exd). En microscopie confocal, le signal fluorescent en BiFC représente 20% du signal de la Vénus entière. Ceci s'explique par une reconstitution parfois imparfaite de la PF, ainsi qu'à une plus faible abondance des complexes binaires en comparaison à une protéine unique. La même perte de signal est attendu en BiFC-PALM. Il est important de rappeler que la densité ainsi que la brillance des fluorophores sont des paramètres cruciaux pour autoriser la microscopie SMLM et particulièrement en PALM. La PAmCherry1 est réputée pour conserver les mêmes propriétés photophysiques après reconstitution suite à l'interaction entre les deux protéines d'intérêt (voir Introduction).

Malgré l'épaisseur du tissu et la plus faible densité de complexes (**Figure 53B et C**), il est possible de visualiser des clusters similaires à ceux des noyaux exprimant la protéine de fusion PAmCh-Ubx (**Figure 53A et B**). Cependant, avant d'affirmer que chaque point représente un complexe Ubx/Exd, comme pour toutes les expériences de BiFC, il est indispensable de prouver la spécificité du signal. Pour cela, Ubx et Exd ont été remplacés par leur forme mutée dans l'HD : Ubx₅₁ et Exd₅₄, respectivement. Ces formes ne sont pas capables ni d'interagir, ni de se fixer à l'ADN. En microscopie confocale, l'utilisation de ces formes mutées réduit le signal BiFC de 80%. En BiFC-PALM, on observe une perte de 97,5% du nombre de complexes par μm^2 (**Figure 53B-C**). Cette perte drastique de signal montre la spécificité du signal observé pour les complexes Ubx/Exd. De plus, les valeurs de PSF, précision de localisation et nombre de photons, correspondent à celles trouvées en microscopie PALM classique avec PAmChUbx. Ceci confirme que les points observés représentent la PAmCherry reconstituée après rapprochement spatial des deux partenaires Ubx et Exd.

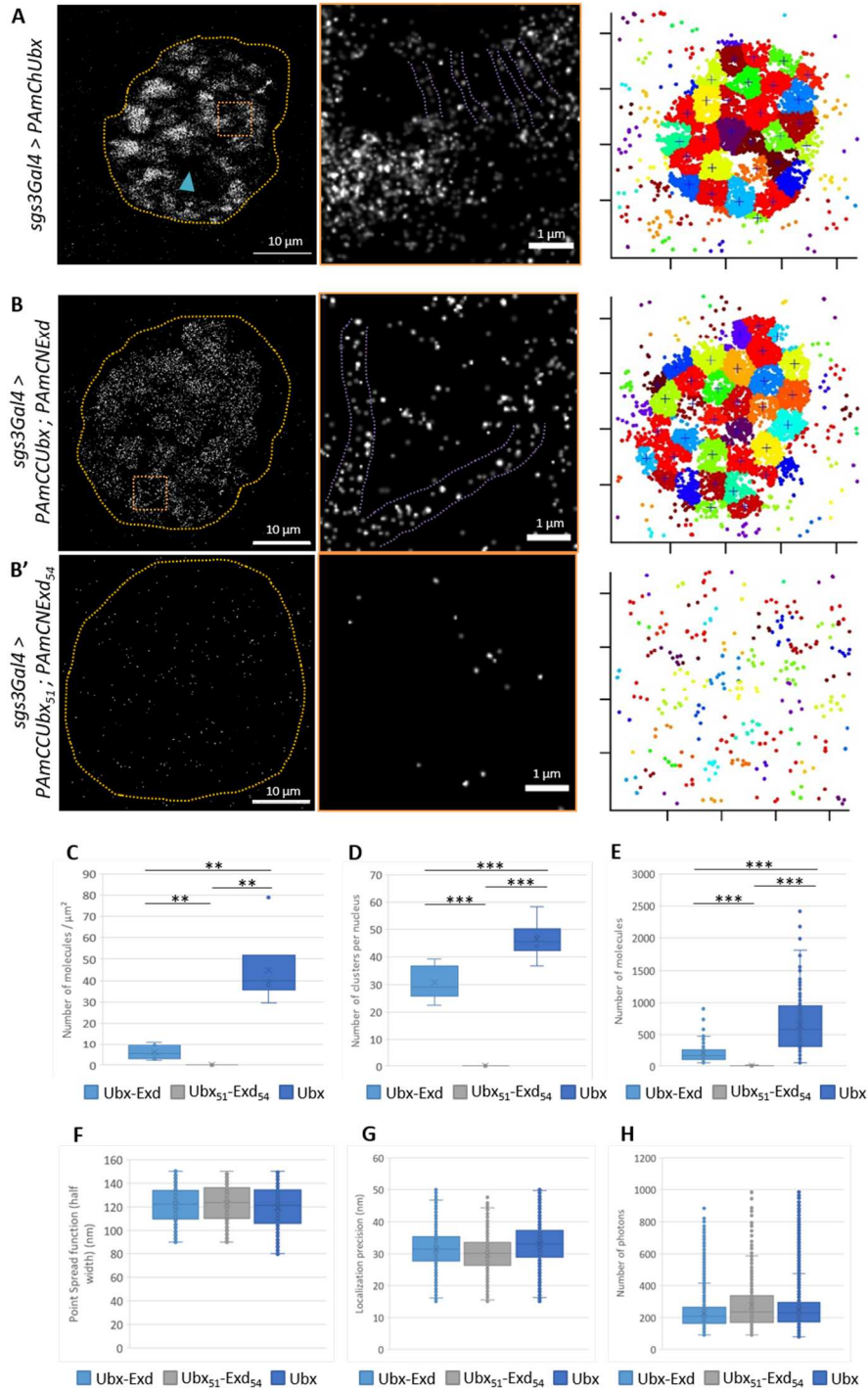


Figure 53 : Microscopie PALM et BiFC-PALM dans les noyaux de glandes salivaires de drosophile. (A) Observation de la protéine Hox Ubx fusionnée à la PAmCherry1, en microscopie PALM. La flèche bleue pointe le nucléole. **(B)** Observation des complexes Ubx/Exd à l'échelle super-résolutive : BiFC-PALM. **(B')** Contrôle négatif de la BiFC-PALM avec les protéines Ubx et Exd mutées dans l'HD. Celles-ci ne sont plus capables d'interagir, ni de se lier à l'ADN. **(A-B')** Les zones en pointillés jaunes délimitent les noyaux de glandes salivaires. Les carrés en pointillés oranges correspondent à la zone élargie au centre de chaque panneau. Les lignes en pointillés violets délimitent des alignements de points qui semblent correspondre aux bandes de chromosomes polytènes (en relation avec les images confocales). Enfin, la représentation à droite de chaque panneau montre le résultat de l'analyse de clustering, chaque croix représente le centre d'un cluster et les clusters contiennent des points de la même couleur. **(C)** Quantification du nombre de complexes détectées (normalisation par rapport à l'aire du noyau, p-value < 0,01), **(D)** du nombre de clusters par noyau (normalisation par rapport à l'aire du noyau, p-value < 0,001) et **(E)** du nombre de molécules dans chaque cluster (p-value < 0,001), et ce pour les trois conditions : BiFC-PALM Ubx/Exd (bleu clair) ; BiFC-PALM Ubx51-Exd54 (gris) ; PALM Ubx (bleu foncé). Pour les mêmes conditions, les graphiques **(F)**, **(G)** et **(H)** représente les box plots des paramètres importants pour déterminer la qualité de l'image PALM : PSF, précision de localisation et nombre de photons, respectivement.

La distribution des complexes Ubx/Exd ressemble à celle d'Ubx mais chaque cluster contient une densité réduite de molécule par μm^2 : 45 molécules Ubx par μm^2 en moyenne contre 6,3 pour les complexes Ubx/Exd (**Figure 53A, B, D et E**). Les complexes mutés Ubx₅₁-Exd₅₄ ne montrent pas d'organisation en clusters de 4 μm de diamètre. Certaines molécules sont assez proches et forment des regroupements de molécules qui ont une densité nettement supérieure à la densité des clusters de molécules Ubx/Exd ou Ubx seul (**Figure 53B, B', D et E**). Il est également possible de distinguer des bandes enrichies en complexes Ubx/Exd, comme en imagerie confocale (**Figure 53B**, lignes violettes pointillées).

Dans la **Figure 51**, la quantification des signaux fluorescents de BiFC montre une forte diminution du signal pour les complexes Scr/Exd en comparaison aux signaux Ubx/Exd. Cela pourrait être un paramètre limitant pour imager les complexes Scr/Exd en BiFC-PALM. En dépit de cela, j'ai pu montrer que la BiFC-PALM permet aussi de visualiser les complexes Scr/Exd à l'échelle super-résolutive, au sein des noyaux de glandes salivaires (**Figure Supplémentaire 3**).

En conclusion, la BiFC-PALM permet la visualisation et la quantification exacte de complexes binaires individuels dans un tissu multicellulaire. Comme en microscopie confocale, le but du projet est de visualiser ces complexes uniques au niveau d'un enhancer cible. Pour cela, j'ai adapté le système ParB/*INT* à la microscopie PALM.

*II.3. Observation des complexes Scr/Exd sur l'enhancer *fkh250* à l'échelle super-résolutive*

En microscopie confocale, j'ai utilisé la protéine de fusion ParB1-mCherry pour visualiser l'enhancer. Cependant, la protéine mCherry n'est pas adaptée à la microscopie super-résolution. Par conséquent, j'ai remplacé la PF mCherry par la protéine photoconvertible Dronpa (Voir Mat&Met). La fusion ParB1-Dronpa permet la visualisation de l'enhancer *fkh250* à l'échelle super-résolutive.

La microscopie PALM deux-couleurs permettrait, en théorie, de visualiser en parallèle, l'enhancer *fkh250* et les complexes Hox/Exd. Les données présentées dans cette partie sont préliminaires, n'ayant pas eu accès à la microscopie super-résolution pendant environ un an. Sur quelques brefs essais, j'ai pu montrer la faisabilité de la microscopie deux-couleurs pour la BiFC-PALM et l'enhancer *fkh250*. Pour cela, dans un premier temps, l'acquisition dans le canal vert de la Dronpa a permis d'imager *fkh250* (**Figure 54A**, panneau central). Dans un deuxième temps, une deuxième acquisition montre la distribution des complexes Scr/Exd au sein des noyaux de glandes salivaires (**Figure 54A**, panneau de gauche). Enfin, une étape post-acquisition, elle aussi préliminaire, a permis l'alignement

des deux canaux pour visualiser la localisation précise des complexes Scr/Exd sur l'enhancer *fk250* (Figure 54A). La Figure 54B représente la même image que la Figure 5A mais avec une autre représentation des localisations détectées. En effet sur la Figure 54A, la taille et l'intensité des points dépend de la précision de localisation et de la PSF. Par conséquent, chaque « point » peut en réalité contenir plusieurs localisations individuelles. C'est ce qui est illustré avec la représentation en « croix » (Figure 54B) qui marquent le centroïde des molécules uniques détectées. Il est alors plus facile, pour l'œil humain, de visualiser et compter les molécules uniques. Sur cette image, on décompte 8 complexes Scr/Exd sur l'enhancer *fk250*. Le noyau choisi pour cette image n'exprimait probablement pas suffisamment les constructions pour atteindre un signal BiFC-PALM comparable à celui observé dans la Figure Supplémentaire 3. La première acquisition dans le canal vert pourrait aussi avoir un impact sur la qualité de l'image BiFC-PALM (photobleaching).

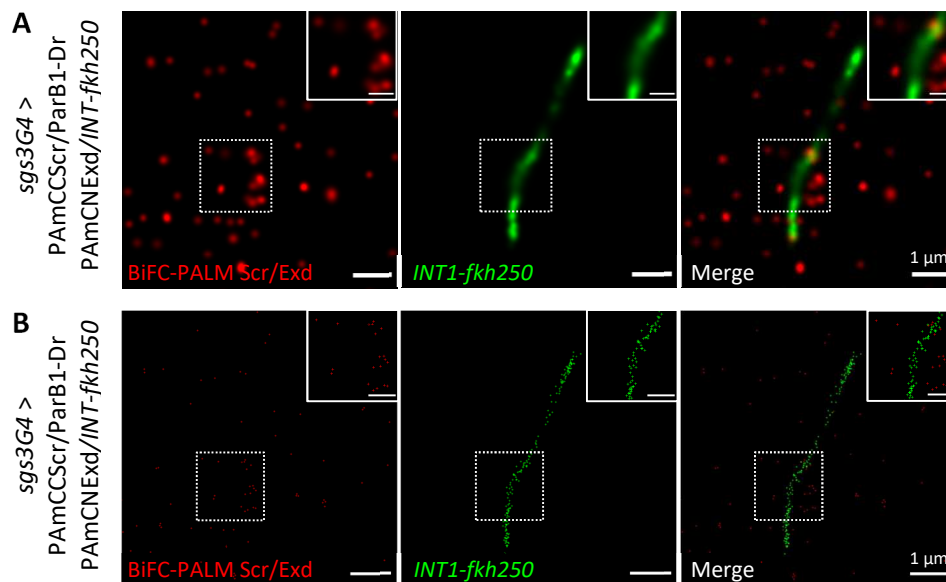


Figure 54 : Microscopie PALM deux-couleurs pour visualiser les complexes Hox/Exd sur l'enhancer *fk250*. Les constructions pour la BiFC-PALM entre Scr et Exd ont été coexprimées avec la protéine ParB1-Dronpa dans un contexte génétique contenant les séquences *INT1-fk250*. Chaque point rouge correspond à un complexe Scr/Exd unique et la bande verte correspond à l'enhancer *fk250*. Les carrés en pointillés blancs correspondent à la zone élargie dans le coin en haut à droite de chaque image. Barre d'échelle des grossissements = 0,5 µm. (A) Représentation des molécules en fonction de leur PSF et précision de localisation (largeur et intensité). (B) Représentation des localisations individuelles par une croix correspondant au centroïde de la tâche présente sur l'image (A). Cela permet de compter le nombre exact de molécules (une tâche peut contenir plusieurs molécules très proches).

L'ensemble de ces résultats montre que j'ai pu mettre en place une nouvelle méthode de visualisation de complexes Hox/Exd sur leur enhancer cible *fk250*, qui semble adaptable à la microscopie super-résolution. Le système ParB/*INT* m'a permis de localiser l'enhancer artificiel au sein des noyaux de glandes salivaires de drosophile, en microscopie confocale et super-résolutive (PALM).

Les quantifications d'intensité de signal BiFC a permis de montrer l'enrichissement significatif des complexes Scr/Exd sur l'enhancer *fkh250*, en comparaison à l'hétérodimère Ubx/Exd, connu pour avoir une faible affinité pour cette séquence cible. De plus, le même type d'analyse a permis de confirmer la perte de fixation des complexes Scr/Exd sur l'enhancer muté *fkh250^{MUT}*. Enfin, la séquence *fkh250^{CONS}* autorise la fixation des deux types de complexes Scr/Exd et Ubx/Exd, comme démontré précédemment dans l'étude de Ryoo et Mann (Ryoo and Mann, 1999).

Par la suite, dans l'optique d'appliquer le même type d'analyse dans des échantillons de plus petite taille, il était nécessaire de transposer la méthode à l'échelle super-résolutive. Dans un premier temps, j'ai montré que la PAmCherry1 fusionnée à la protéine Hox Ubx permet la détection de molécules uniques en microscopie PALM. Dans un deuxième temps j'ai adapté la BiFC-PALM dans les noyaux de glandes salivaires et montré la spécificité de détection des complexes Ubx/Exd à l'échelle super-résolutive. Des données préliminaires indiquent la possibilité de compter le nombre exact de complexes Ubx/Exd (BiFC-PALM) fixés sur les différentes formes de l'enhancer *fkh250*, lui-même visualisé à l'échelle super-résolutive à l'aide de la protéine photoconvertible Dronpa (ParB1-Dronpa). Cela peut être réalisé par microscopie PALM deux-couleurs.

MATERIELS ET METHODES

Lignées de Drosophile

Les drivers *Gal4* utilisés sont les suivants : *armGal4*, *c564Gal4*, *enGal4*, et *sgs3Gal4* proviennent des stocks Bloomington (USA) numéros 1560, 6982, 30564 et 6870 respectivement. Les lignées ParB1-mCherry et ParB1-GFP ont été données par François Payre (Toulouse). Ce dernier a aussi fourni les vecteurs qui ont permis d'établir les lignées transgéniques ParB1-Dronpa, INT1-fkh250, INT1-fkh250_{MUT} et INT1-fkh250_{CONS} (clonages expliqués dans la partie suivante).

Pour la BiFC basée sur la Vénus, les lignées *UAS-VC-Ubx*, *UAS-VC-Scr* et *UAS-VN-Exd* étaient déjà établies et utilisées (Hudry et al., 2012) avant mon arrivée dans l'équipe.

Génération de lignées transgéniques

Lignées pour la BiFC-PALM

Le vecteur de la PA-mCherry1 monomérique a été commandé chez addgene (#31928). La PAmCherry1 a ensuite été générée par PCR et clonée dans le vecteur *pUASTattB*, entre les sites de restrictions EcoRI et KpnI, en amont de la protéine Hox Ubx insérée entre les sites de restrictions KpnI et XbaI. Les fragments d'ADN codant pour la partie N-terminale de la PAmCherry1 (PAmCN : 1-159) et la partie C-terminale (PAmCC : 160-236) ont été générés par PCR à partir du vecteur matrice contenant la PAmCherry1 entière. Pour la construction PAmCC-Ubx, la partie PAmCC a été sous-cloné en remplaçant la PAmCherry entière dans le vecteur *pUASTattB-PAmCherry-Ubx* généré précédemment. Les mêmes sites de restrictions ont été utilisés pour la construction PAmCC-Ubx₅₁. Le fragment PAmCC a été sous-cloné dans le vecteur *pUASTattB_VC_Ubx51*. La construction PAmCC-Scr a été réalisé à partir du vecteur *pUASTattB_VC-Scr*. La partie PAmCC remplace le fragment VC entre les sites de restrictions EcoRI et XhoI, en amont de la protéine Hox Scr clonée entre les sites XhoI et XbaI. Le même sous-clonage a été effectué à partir du vecteur *pUASTattB-VN-Exd*, où le fragment VN est remplacé par le fragment PAmCN. La même procédure a été réalisée à partir du vecteur *pUASTattB-VN-Exd₅₄* pour créer le nouveau vecteur *pUASTattB-PAmCN-Exd₅₄*. Toutes les constructions ont été vérifiées par séquençage avant d'être envoyées pour injection dans les embryons. Les lignées transgéniques ont été établies par le système intégrase ΦC-31 integrase (Bischof et al., 2007).

Lignées pour le système ParB/INT

La lignée ParB1-Dronpa a été réalisée à partir du vecteur *pAttB_UAST_ParB1_GFP* fourni par François Payre. Le vecteur contenant la Dronpa provient de Addgene. La Dronpa a été amplifiée par PCR puis clonée entre

les sites de restrictions NdeI et XbaI en aval de la séquence codant pour ParB1 présente dans le vecteur initial *pAttB_UAST_ParB1_GFP*.

Les séquences des différents enhanceurs *fkx250*, *fkx250_{MUT}* et *fkx250_{CONS}* (mutlipliées par 10, voir **Annexes III.3.**) ont été synthétisées (GenScript) puis clonées entre les sites EcoRI et XhoI, en aval des trois séquences *INT1* déjà présentes dans le vecteur *pAttB-INT1-hslacZ*. Toutes les constructions ont été vérifiées par séquençage avant d'être envoyées pour injection dans les embryons. Les lignées transgéniques ont été établies par le système intégrase Φ C-31 intégrase (Bischof et al., 2007).

Dissection, fixation et montage des échantillons

Pour les deux types de microscopie (confocale et PALM) : les larves issues des croisements de lignées transgéniques sont disséquées au stade L3 Wandering. Les croisements sont réalisés à 29°C pour surexprimer les constructions et atteindre une densité suffisante de molécules pour la microscopie PALM. La même température a été utilisée pour la microscopie confocale pour obtenir des résultats comparables. Les glandes salivaires sont extraites dans du PBS 1X puis fixées 20 min dans le paraformaldéhyde (PFA) 4%. Pour la microscopie confocale, après trois rinçages de 15 min dans du PBS-Triton 0.1%, les glandes salivaires sont montées dans du Vectashield DAPI (VectorLabs) entre lame et lamelle classiques. Pour la microscopie PALM, les trois rinçages sont effectués dans du PBS seul, car le Triton est autofluorescent et peut affecter la qualité des images SMLM.

Pour le montage des boîtes μ -Dish^{35 mm, high glass bottom} (ibidi, 81158) et des lamelles rondes 12 mm (Knittel Glass, ISO 8255/1) ont été utilisées. La veille du montage, boîtes et lamelles sont incubées dans une solution de Hellmanex 1% (Sigma-Aldrich, Z805939-1EA) à température ambiante (dans une boîte de Pétri propre), sur une balancelle. Le jour du montage, rincer trois fois 10 min avec de l'eau Millipore puis sécher boîtes et lamelles à l'aide d'une pompe à air. Mettre la boîte sur un support évitant tout contact entre le fond en verre et la pailleasse. Ensuite, une goutte de PBS (5 μ L) est placée sur la surface en verre d'une boîte μ -Dish et les glandes salivaires y sont déposées délicatement. Sous la loupe binoculaire, les paires de glandes salivaires sont séparées les unes des autres et la lamelle ronde est déposée sur la goutte à l'aide d'une pince fine. Si les 5 μ L ne suffisent pas à remplir l'espace sous la lamelle, il est possible d'appliquer un léger poids au-dessus de la lamelle (superposition de cônes par exemple), et laisser reposer environ 5 min (pas trop longtemps pour éviter l'évaporation du PBS). La lamelle est ensuite scellée par du Twinsil speed 22 (Picodent) sous la loupe binoculaire à l'aide d'un cône pour pipette 1-10 μ L. La boîte contenant les échantillons est ensuite placée dans un papier aluminium propre jusqu'à

l'observation. La même procédure est appliquée pour les corps gras de larves de drosophile.

Dévitellinisation manuelle des embryons de drosophile

Les embryons issus de la ponte sont déchorionés dans une solution de javel pendant deux minutes. La solution est ensuite passée sur un filtre en nylon afin de récupérer les embryons déchorionés. Ceux-ci sont transférés (à l'aide d'une pince large à bouts ronds), dans un tube Eppendorf 1,5 mL contenant la solution de fixation : 500 μ L de PFA 4% et 500 μ L d'heptane. Les embryons sont incubés pendant 30 min à température ambiante sur une roue (le tube est entouré d'un papier aluminium pour éviter l'activation ou le photobleaching de la PAmCherry). Ensuite, la solution de PFA est remplacée par 500 μ L de PBS pour un rinçage de 10 min. Une dévitellinisation au méthanol est impossible car il rend les embryons très autofluorescents (Truong Quang and Lenne, 2015).

Les embryons sont récupérés sur un filtre et placés dans une solution de PBS-Tween 0.1% (PBT). A l'aide d'un cône coupé, et préalablement mis au contact du PBT, récupérer quelques embryons et les placer sur une boîte contenant un gel d'agar-agar (boîte utilisée comme pondoir). Sécher le surplus de PBT à l'aide d'un papier. Transférer les embryons (à l'aide d'un pinceau ou d'une pince à bout rond) sur du scotch double face, vérifier qu'ils soient collés puis les recouvrir d'une solution de PBT. Enfin, à l'aide d'une seringue fine ou d'un fil de tungstène, percer la membrane vitelline du côté postérieur et pousser délicatement l'embryon du côté antérieur pour l'extraire de la membrane. Les embryons dévitellinisés sont récupérés à l'aide d'une pipette avec un cône coupé et déposés dans une solution de PBS pour quelques rinçages avant le montage dans les boîtes μ -Dish (voir partie précédente).

Immunomarquage des glandes salivaires.

L'immunomarquage des glandes salivaires suit un protocole classique. Après la fixation de 20 min et les trois rinçages au PBS-Triton 0.1%, les glandes sont incubées pendant au moins deux heures dans une solution de blocage (PBS-Triton 0.1% + 2% Bovin Serum Albumin, BSA). Le nanobody RFP-booster-ATTO488 ou ATTO647N (Chromotek, rba488-10 ou rba647n-10) est dilué (1:250) dans une solution de PBS-Triton 0.1%. Les glandes salivaires sont incubées dans la solution d'anticorps sur la nuit à 4°C, sous agitation lente. Cette étape est suivie de deux rinçages de 30 min dans une solution de PBS-Triton 0.1%. Enfin, les glandes salivaires sont montées entre lame et lamelle comme décrit précédemment pour la microscopie confocale.

Synthèse des sondes FISH pour le gène *forkhead*

Le protocole pour synthétiser les sondes FISH est tiré du livre (Bantignies and Cavalli, 2014). Une séquence de 12 kb centré sur le locus du gène *fkh* a été choisie (Flybase, voir Annexes III.1.). Six paires d'oligonucléotides de 21 pb ont été déterminés via le site internet Primer3 pour couvrir toute la région (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) (voir Annexes III.2.). Chaque fragment est ensuite amplifié par PCR à partir d'un extrait d'ADN génomique. Chaque sonde mesure environ 1 kb. Les produits PCR sont ensuite digérés puis couplés à un fluorophore grâce au FISH. Le protocole d'hybridation des sondes FISH dans les tissus biologiques est décrit dans le livre (Bantignies and Cavalli, 2014).

Acquisition des images confocales lightning

Les images ont été acquises sur un microscope Leica SP8 avec l'objectif x63 à huile. L'option Lightning permet d'augmenter la résolution confocale grâce à des paramètres d'acquisitions optimaux pour l'épaisseur du stack, l'objectif utilisé, le milieu de montage (Vectashield), ainsi que la longueur d'onde du laser. Ces paramètres permettent d'extraire un maximum de détails sur chaque voxel de l'image. Les images acquises sont sur-échantillonnées (un grand nombre de pixels) afin de pouvoir appliquer le traitement développé par le groupe Leica. L'image est parcourue par un « Lightning decision mask » et permet de mesurer différents paramètres pour déterminer la qualité de l'image sur chaque pixel et adapté le traitement en fonction du résultat. Cela diffère des méthodes traditionnelles qui appliquent des schémas de reconstruction avec une efficacité globale et non locale. Ce masque permet de supprimer une grande partie du bruit de fond et détecte des signaux avec un nombre de photons limité, ce qui rend l'image plus résolue (résolution théorique atteinte : 120 nm).

(<https://www.leica-microsystems.com/fr/produits/microscopes-confocaux/informations-detaillees/product/show/Products/lightning/>).

Les paramètres d'acquisition pour chaque condition expérimentale ont été fixés (2656x2656 pixels ; vitesse de scan du laser : 574 Hz ; zoom x1,5). Un laser 405 est utilisé pour imager le DAPI. Un laser 488 nm permet l'excitation de la Vénus pour la BiFC et un laser 552 nm excite la mCherry pour localiser l'enhancer *fkh250*. Les intensités laser sont variables mais dans le même ordre de grandeur. Le gain reste inchangé. En effet, en fonction du niveau d'expression des constructions VCHox et VNExd dans le noyau imagé, le signal BiFC varie. De plus le signal BiFC Ubx/Exd est beaucoup plus intense que celui de la BiFC Scr/Exd, ce qui rend l'acquisition avec des paramètres identiques impossible. Ces différences d'intensité laser sont prises en compte lors de l'analyse de l'enrichissement des complexes sur l'enhancer.

Acquisition des images super-résolution PALM

Les images ont été acquises sur un microscope super-résolution Elyra PS.1 et Elyra 7 (Zeiss) avec l'objectif x63 Plan APOCHROMAT à immersion à huile (Zeiss, NA = 1.4) et une lentille supplémentaire x1,6. Le laser 405 nm (100 mW (classe B)) a permis l'activation des PFs photoswitchables PAmCherry1 et Dronpa. Les lasers 488 nm (100 mW (classe B)) et 561 nm (100 mW (classe B)) sont utilisés pour exciter les molécules de Dronpa et PamCherry1, respectivement. Différents filtres de détection ont été utilisés pour le canal vert ou rouge : MBS 405 (BP420-480 / BP495-525 / LP650) ou MBS 405ac/488/561 (BP495-550 / BP570-620). Les images ont été acquises par une caméra EMCCD (Andor iXon DU897, pixel size: 16 μm , 512 \times 512 pixels) pour l'Elyra PS.1 et une caméra sCMOS (PCO.edge4.2, pixel size : 6,5 μm ; 2048x2048 pixels) pour l'Elyra 7. Le logiciel de détection des localisations (Zen) fait partie intégrante du système Elyra et le processing est directement appliqué lors de l'acquisition. Les images utilisées pour les quantifications dans les conditions PAmCh-Ubx, BiFC-PALM Ubx/Exd et Ubx₅₁/Exd₅₄ proviennent toutes du système Elyra 7. Les acquisitions PALM deux-couleurs ont également été effectuées sur l'Elyra 7. Seules les images PALM en embryon et dans les corps gras de Drosophile ont été réalisées avec l'Elyra PS.1. Les paramètres d'acquisition ont été fixés, permettant une analyse comparative. Voici le protocole d'acquisition pour la comparaison PAmCh-Ubx / BiFC-PALM Ubx/Exd et Ubx₅₁/Exd₅₄:

- 1) Les glandes salivaires sont localisées à l'objectif x10 en lumière transmise (LT).
- 2) Recherche des noyaux au x63 : l'outil « Find Surface » permet de déterminer la position Z correspondant à la limite verre/échantillon. Cela permet de placer le plan focal au niveau de la membrane externe des cellules de glandes salivaires (limite basse de l'échantillon). Par la suite, l'offset de l'outil « Definite focus » est fixé à 30 μm . Cela place le plan focal à 30 μm à l'intérieur de l'échantillon, où les premiers noyaux sont visibles en LT.
- 3) Sélection d'un noyau au focus, dont les limites sont visibles en LT. Le centrer sur l'image et effectuer un crop de 446x446 pixels (permet de contenir un noyau de glande salivaire complet). Prendre une image en LT.
- 4) Avec le laser 561 nm (position épifluorescence, EPI), vérifier l'état de fluorescence du noyau. Si celui-ci est déjà fluorescent (noyau activé préalablement par la lumière blanche), une étape de « pompage » est nécessaire (communément utilisée en STORM, (Provost et al., 2019)). Ce processus consiste à éteindre les molécules PAmCherry déjà actives mais en trop grand nombre, ce qui rend le clignotement indétectable. Pour y remédier, utiliser le laser 561 nm pour bleacher ces molécules (80% de la puissance laser). Cette étape est indispensable dans le cas de la PAmCherry

entière (condition PAmCh-Ubx), car la densité des molécules est beaucoup plus importante qu'en BiFC-PALM.

- 5) Les paramètres d'acquisition sont les suivants : laser d'activation 405 nm = 0.002 à 0.007% (rampe d'activation) ; laser d'excitation 561 nm = 50% initialement et augmentation jusqu'à 75% au fur et à mesure de l'acquisition lorsque le clignotement commence à faiblir ; illumination HILO (avec un angle = 51,65° environ, peut varier légèrement en fonction de l'orientation du noyau) avec l'option « TIRF_HP » qui focalise le laser sur une zone réduite ce qui concentre la puissance laser au centre de l'image et améliore la qualité du clignotement (plus intense) ; temps d'exposition = 50 ms ; lentille collimatrice = 1123.
- 6) L'acquisition est lancée pour 20000 images. Le processing pour détecter les molécules uniques apparaît en parallèle de l'image brute. Les paramètres de détection des molécules sont les mêmes pour toutes les images (« gaussian fitting » : peak mask size = 9 et « peak intensity to noise = 6). Le maintien du focus est assuré par l'outil Zen « Focus devices and strategy » avec l'option « definite focus » et « autofocus » toutes les 500 images.
- 7) Une correction de drift est appliquée à l'image brute (Model-based Adapted) ainsi qu'une étape de « Grouping » (max on time = 5 ; Off GAP = 50 ; Capture radius = 1 pixel). La correction de drift permet de corriger un éventuel décalage des localisations à cause du mouvement de l'échantillon ou de certaines parties du système (en raison de variations thermiques ou vibration). Les localisations sont ensuite filtrées pour la PSF, le nombre de photons et la précision de localisation. Cela permet d'éliminer les points aberrants qui ne correspondent pas à un fluorophore (caractéristiques photophysiques précises). Les filtres appliqués sont fixés : « PSF Half Width » = 100-200 nm ; « Number photons » = 90-800 ; « Localization Precision » = 15-50 nm.

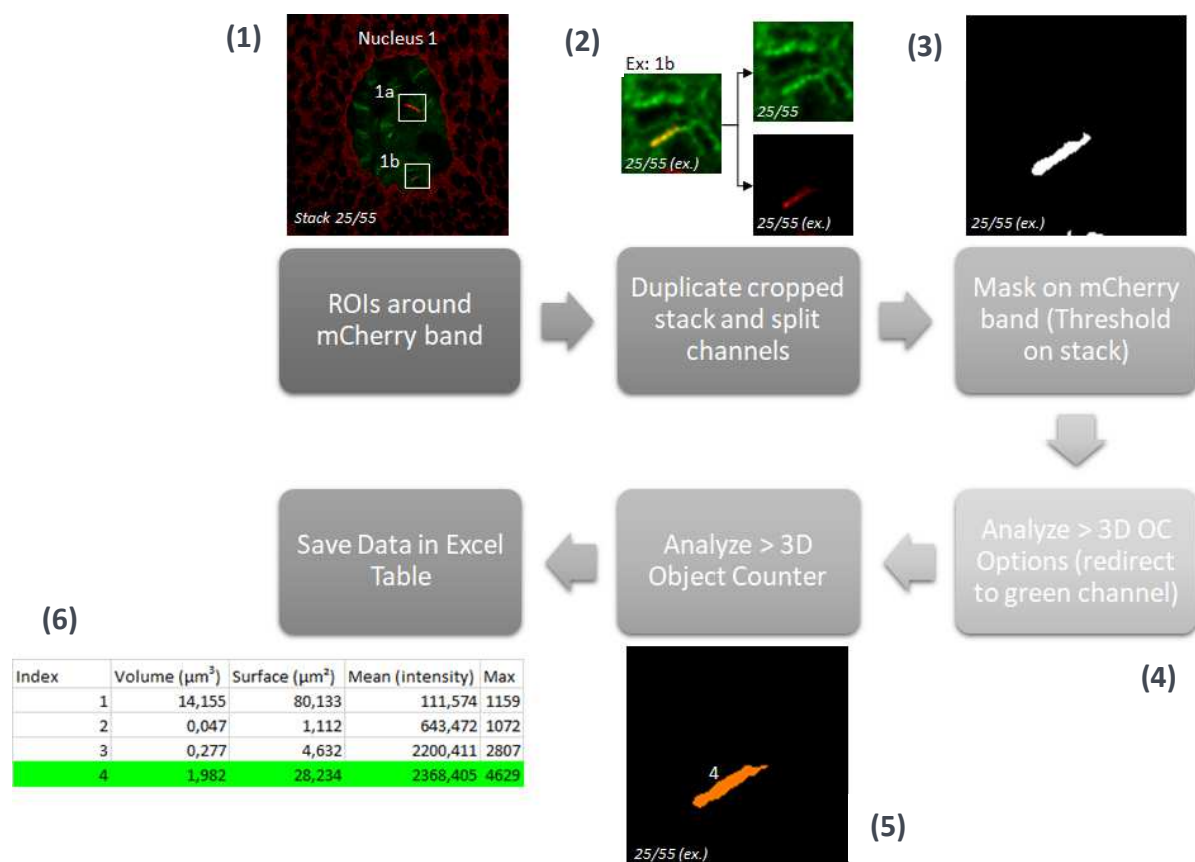
Pour les acquisitions deux-couleurs ParB1-Dronpa (*fkh250*) et BiFC-PALM, le canal de la Dronpa est imagé en premier et la PAmCherry ensuite. Le protocole d'acquisition est le même avec quelques adaptations : (3) La taille du crop est modifiée et centrée sur l'enhancer (signal Dronpa) : 220x220 pixels. (4) Étape de pompage pour la Dronpa : 15 s de « bleaching » avec le laser 488 nm à 80% (illumination EPI). (5) Pour la Dronpa, laser d'activation 405 nm = 0-0.002% ; laser d'excitation 488 nm ~3% ; lentille collimatrice = 1042.

Quantifications d'intensité sur les images confocales (Fiji)

Pipeline des quantifications sur les bande ParB1-mCherry ; *INT1-fkh250* :

Sur l'image brute, dessiner une région d'intérêt (ROI) autour d'une bande du premier noyau (1). Dupliquer le crop et séparer les canaux (2). Choisir l'image où

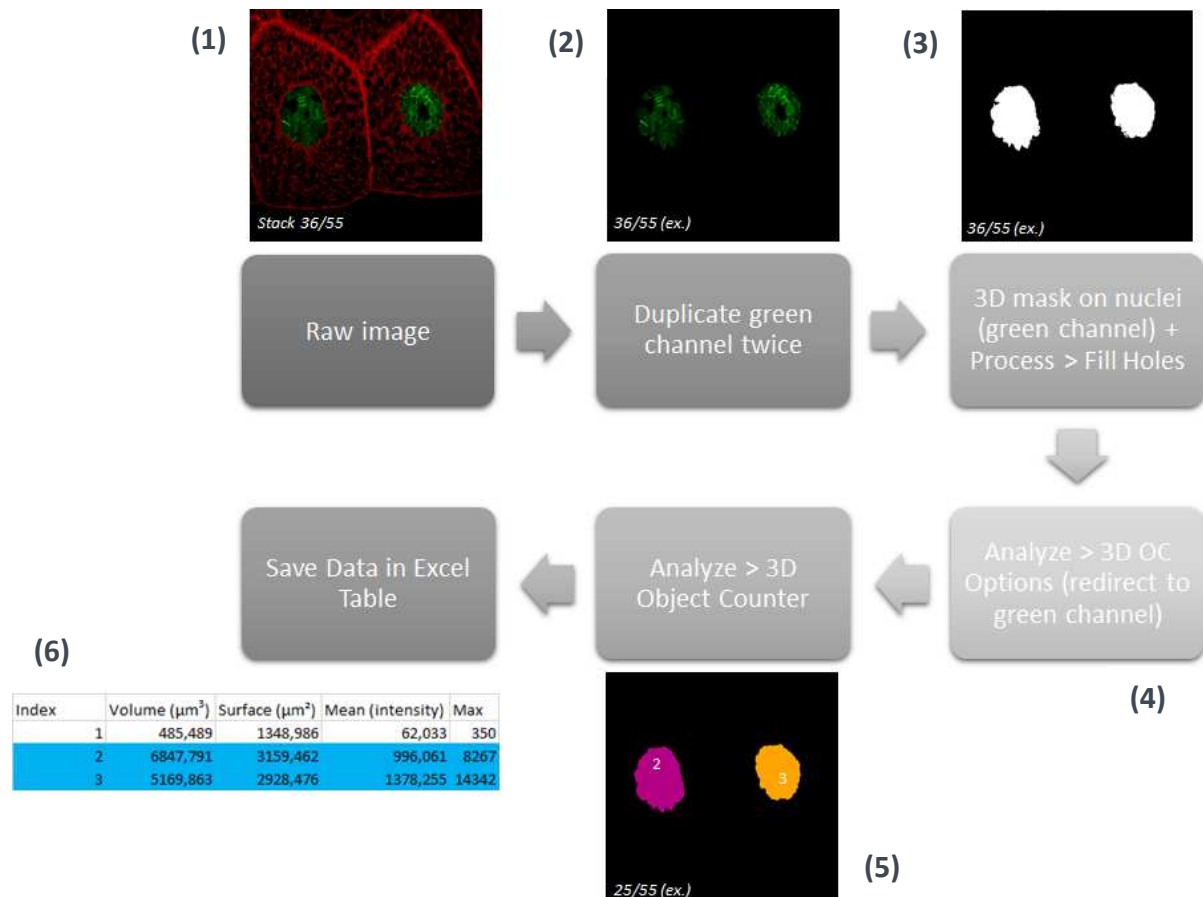
la bande rouge est la plus intense pour faire le threshold (cela évite de surestimer la largeur de la bande). Créer l'image binaire (binary mask) (3) qui permet d'appliquer le Plugin « 3D Object Counter ». Dans les options du Plugin, cocher les paramètres « Volume », « Surface », « Min », « Max », « Mean » et rediriger les mesures vers le canal vert original (4). Lancer le Plugin « 3D Object Counter » avec une taille minimale = 10 et maximale par défaut (« size filter ») (5). Les données sont extraites en 3D sur la totalité de la bande et enregistrées sous forme de tableau Excel (6). Les intensités mesurées dans le masque correspondent à celles trouvées dans l'image de BiFC (redirection vers le canal vert). Cette opération est répétée pour les différents noyaux de l'image qui contiennent entre 1 et 3 bandes enrichies en mCherry (en raison de la polypléidie des noyaux de glandes salivaires).



Pipeline des quantifications sur les noyaux entiers :

Le même principe est appliqué aux noyaux entiers. Aucune ROI n'est nécessaire pour ce processus. Le threshold 3D sur les noyaux entiers permet d'appliquer le Plugin « 3D Object Counter » avec les mêmes paramètres que précédemment, sauf la taille minimale = 100000 et maximale par défaut (« size filter ») (5).

Enfin, les données extraites permettent de comparer les différentes conditions. Pour déterminer l'enrichissement du signal BiFC sur l'enhancer, la valeur moyenne des maxima de niveaux de gris d'une bande est rapportée à la valeur maximum de niveau de gris dans le noyau correspondant. Ce rapport est appliqué à chaque bande dans les différents noyaux et dans les quatre conditions testées.

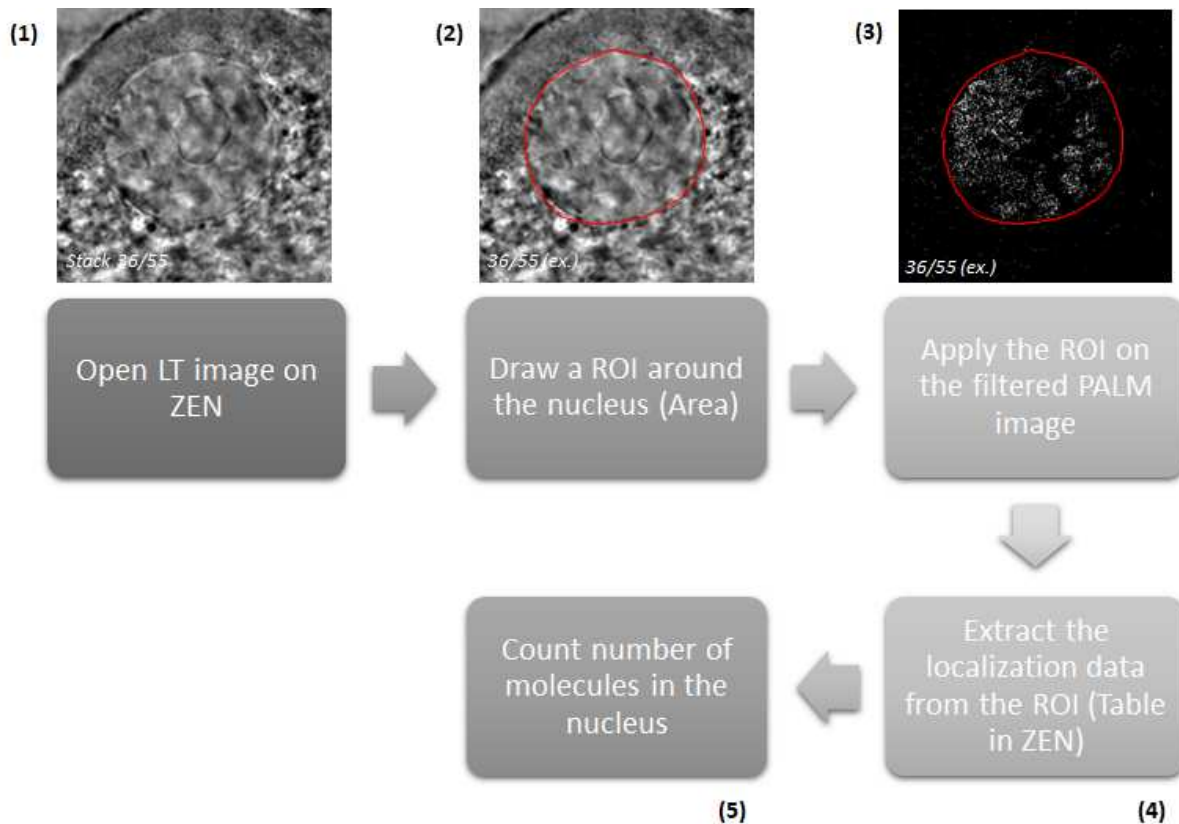


Quantifications et clustering sur les images PALM

Quantifications pour déterminer la spécificité de la BiFC-PALM : Pipeline :

L'image en lumière transmise permet de dessiner le contour du noyau et mesurer l'aire de celui-ci. Cette opération est effectuée sur le logiciel ZEN (Zeiss). La ROI dessinée peut être enregistrée puis ajoutée à l'image PALM. En cochant la case « select ROI », il est possible d'obtenir le tableau des localisations contenues uniquement dans la ROI, ici dans le noyau. Le nombre de molécules dans le noyau est ensuite normalisé par rapport à l'aire de celui-ci. Cela donne une valeur de molécules / μm^2 . Le pipeline est effectué sur toutes les images PALM acquises, permettant les comparaisons du nombre de molécules présentes dans les noyaux pour chaque condition (Figure 53). Pour les Figure 53F, G et H, les différents paramètres (PSF, nombre de photons et précision de localisation) sont extraits des

tableaux filtrés sur l'image entière (pas de restriction dans la ROI). Pour chaque condition, le nombre de noyaux considérés est égal à 5 pour la BiFC-PALM et 6 pour la PAmCh-Ubx.



Clustering (macro en Annexes):

La macro pour regrouper les molécules en clusters a été créée sur le logiciel Igor pro 8.0 (Wavemetrics), par Christophe Place (Laboratoire de Physique, ENS de Lyon). Il s'est inspiré de l'article de T. Gonzales (Gonzalez, 1985). Le clustering est basé sur des paramètres de distances avoisinantes. Dans la macro, le rayon maximal pour un cluster est fixé par l'utilisateur. Un cluster est marqué par une croix s'il contient plus de 50 molécules. Les clusters plus petits sont représentés par une même couleur mais ne sont pas comptabilisés dans le nombre de clusters (Figure 53D). Pour chaque image analysée, le nombre exact de molécules au sein d'un cluster est extrait puis enregistré sous forme de tableau.

CHAPITRE 3

Au cours de ma thèse, j'ai également poursuivi le projet d'une ancienne post-doctorante, Leiore Ajuria. En effet, le microscope super-résolution que j'utilisais a été endommagé par une inondation au sein de la plateforme de microscopie (PLATIM). Par conséquent, pendant dix mois, il m'était impossible de continuer le projet super-résolution. Par la suite, un autre incident (caméra) a rendu le nouveau microscope inutilisable pendant deux mois supplémentaires.

En novembre 2018, je me suis consacrée au projet sur la régulation de l'autophagie par les complexes Hox/LamC au sein des corps gras de drosophile. Je me suis basée sur les résultats de Leiore Ajuria, et j'ai poursuivi les analyses des distances entre loci *atg* (*autophagy genes*) et périphérie nucléaire dans différents contextes génétiques. J'ai également réalisé toutes les expériences en microscopie confocale Lightning pour les mesures de co-localisation entre Ubx et LamC ainsi que l'enrichissement des foci Ubx sur le signal FISH *Atg1*. De plus, j'ai combiné la BiFC au FISH dans les noyaux de corps gras, pour mesurer l'intensité des complexes Hox/LamC au niveau du locus *Atg1* en comparaison à un locus contrôle *Hsp83*. La microscopie Lightning a permis une analyse plus précise des intensités grâce à une amélioration considérable du rapport signal sur bruit.

Les résultats sont volontairement présentés sous forme d'article même si la forme sera certainement encore modifiée par la suite. En particulier, les résultats préliminaires avec la Fibrillarine (voir Discussion) ouvrent de nouvelles perspectives qui devraient être incluses dans la version finale de l'article. Ce format permet également d'illustrer l'état d'avancement du projet. L'ensemble de ces résultats devrait être soumis avant la fin de l'année 2020.

MANUSCRIT : HOX AND LAMIN-C INTERACT IN A NUCLEAR RING TO REPRESS AUTOPHAGY IN THE *DROSOPHILA* FAT BODY

Solène Vanderperre, Leiore Ajuria, Marilyne Duffraisse, Rachel Paul, Jacques Brocard and Samir Merabet

Abstract

Gene regulation is not occurring randomly within the nucleus, but is under the control of nuclear matrix and chromatin-remodeling proteins that participate to the genome-wide compartmentalization of transcriptionally active and inactive regions. Surprisingly, how the specific regulatory activity of transcription factors (TFs) could be influenced by the spatial localization within the nucleus has rarely been considered. As a consequence, how nuclear matrix components could participate to gene-specific regulatory complexes with TFs remains poorly understood.

Here we show that Hox and Lamin C (LamC) proteins form a ring expression profile beneath the nuclear membrane and directly interact to repress the transcription of autophagy related (*atg*) genes in the *Drosophila* larval fat body. By using Lightning confocal microscopy in different genetic contexts, we revealed that Hox and LamC proteins preferentially co-localized in a ring repressive zone and preferentially interact on *atg* genomic loci. Together our results highlight the importance of the nuclear matrix for shaping the regulatory activity of TFs in the nucleus.

Introduction

Hox proteins are master regulators of embryonic development, acting in different tissues to control differentiation along the antero-posterior axis (Rezsohazy et al., 2015b). In addition to their classical patterning and morphogenetic functions during embryogenesis, Hox proteins are also essential during the adult life, for example for the maintenance of cell lineages (Alharbi et al., 2013). More recently, Hox proteins have been shown to control the onset of autophagy in the *Drosophila* larval fat body, enlarging the repertoire of Hox protein functions in an animal (Banreti et al., 2014). Autophagy of energy-rich fat body cells is crucial for the subsequent process of metamorphosis in *Drosophila*. Autophagy of fat body cells is blocked until late L3-Fedding (L3-F) stage through the repressive activity of Hox proteins on the expression of autophagy related genes (*atg*). The loss of Hox protein expression at the L3-Wandering (L3-W) stage allows the activation of *atg* genes and the quick induction of autophagy (Banreti et al., 2014).

How Hox proteins could repress the transcription of *atg* genes remains unknown. Hox proteins are homeodomain (HD)-containing transcription factors (TFs) and their molecular mode of action has been investigated in depth in various developmental contexts and on various target enhancers (Hueber and Lohmann, 2008; Mann et al., 2009). In many different cases, Hox transcriptional activity depends on the presence of the generic PBC and MEIS cofactors, which are able to associate with Hox proteins through various Hox protein motifs (Merabet and Mann, 2016). Hox proteins can also interact with many other types of TFs (Baëza et al., 2015a; Bischof et al., 2018), and with proteins involved in chromatin remodeling (Agelopoulos et al., 2012) or RNA-processing (Carnesecchi et al., 2020) in a cell- or tissue-specific manner. These observations underly the strong interaction potential of Hox proteins with diverse types of cofactors (Rezsohazy et al., 2015b)(Bobola and Merabet, 2017b).

A high degree of plasticity is also occurring at the Hox DNA-binding level, with the recognition of specific DNA-binding sites that can diverge in terms of

sequence (Slattery et al., 2011), affinity (Crocker et al., 2015b) and structure (Zeiske et al., 2018)(Kribelbauer et al., 2020).

In this work we describe a novel type of Hox cofactor that belongs to the nuclear matrix, and more particularly to the nuclear lamina (NL): the Lamin-C (LamC). Lamins are essential for the stiffness of the nucleus, forming a meshwork of intermediate filaments beneath the nuclear membrane (Briand and Collas, 2020). The NL is composed of B-type (ubiquitous) and A-type (tissue-specific) Lamins, together with Lamin-associated proteins involved in the structuration of the meshwork (such as the LEM-domain proteins, (Wagner and Krohne, 2007)). The NL is considered as a repressive compartment, with the presence of chromatin repressive marks and lamina-associated chromatin domains (LADs) that are associated to silent or weakly expressed genes (Harr et al., 2020)(Solovei et al., 2013)(Zheng et al., 2018). Still, how the NL could collaborate with DNA-binding TFs for regulating the transcription of specific target genes remains a poorly investigated issue.

Our work reveals a novel partnership between Hox and LamC proteins in the context of autophagy regulation in the *Drosophila* larval fat body. We provide evidence that the proper repressive activity of Hox/LamC complexes on *atg* genes depends on specific locations within the nucleus. These results highlight the close relationship between site specific TFs, nuclear matrix proteins and spatial location of target genes for specific transcriptional regulation *in vivo*.

Results

Previous work showed that Hox proteins are strong repressors of autophagy in the fat body tissue of L3-F larvae, acting by repressing the transcription of several *atg* genes (Banreti et al., 2014). The transcriptional repression of Hox genes, coupled to an active nuclear export of Hox proteins, relieves the repression of *atg* genes, allowing the induction of autophagy at the latter L3-W stage (Banreti et al., 2014) (Duffraisse et al., *in revision*).

To better understand how Hox proteins could repress the transcription of *atg* genes at the L3-F stage, we first looked more precisely at their expression profile in the nucleus of fat body cells. Surprisingly, we found that all Hox proteins displayed an atypical donut-like expression profile (Fig. 1A). We noticed that Hox proteins displayed additional specific features. For example, the Hox protein Deformed (Dfd) was particularly enriched at the nuclear membrane, while Antennapedia (Antp) was present in several additional spots throughout the nucleoplasm (Fig. 1A). The Hox proteins Labial (Lab), Ultrabithorax (Ubx), AbdominalA (AbdA) and AbdominalB (AbdB) were also specifically distributed in the center of the nucleus (Fig. 1A). DAPI staining, which reveals AT-rich and more generally repressive chromatin regions, also revealed a donut- or ring-like expression profile in the nucleus of fat body cells (Fig. 1A). Detailed analysis with Ubx showed that Ubx and DAPI were not systematically enriched in the same places, underlining that the Hox protein is distributed over various types of chromatin regions within the nuclear ring expression domain (Fig. 1B-B”).

The presence of an internal ring expression profile was striking and highly suggestive a non-neutral role of the nuclear matrix. We thus decided to test whether components of the nuclear matrix could be important for autophagy regulation in the fat body by performing a pilot candidate RNAi screen. The rationale of the screen was to consider that depletion of a key regulator of autophagy would lead to advanced autophagy at the L3-F stage. This phenotype can easily be revealed with the ATG8-mCherry reporter and was assessed with a clonal cell expression system in an otherwise wild type fat body tissue, as previously done (Banreti et al., 2014). Two out the 19 candidate nuclear matrix encoding genes that we tested led to advanced autophagy upon their targeted loss (as recognized by the presence of small autophagy vesicles at the L3-F stage: Supplementary Figure 1A and Table S1): Lamin C (LamC) and Lamin B (LamB). These two types of Lamin are known to tether the heterochromatin at the nuclear periphery, in particular by mediating the interaction with Lamin Associated Domains (LADs, (Briand and Collas, 2020)), therefore constituting good candidates in the context of autophagy repression. Given the ring-like nuclear pattern of Hox proteins, we looked at the expression profile of LamB and LamC. LamB is known to be restricted at the

nuclear membrane, a profile that was also found in fat body nuclei (Fig. S1). Compared to LamB, LamC is known to also diffuse within the nucleoplasm (Zheng et al., 2018), and we observed that this protein was displaying an internal ring-like expression pattern beneath a strong staining at the level of the nuclear membrane (Fig. 1C). Enrichments between LamC and DAPI were not systematically co-localized, underlining that different types of chromatin regions are associated with LamC, as previously noticed with Ubx (Fig. 1C'-C'').

Although the internal ring-like expression profile of LamC was as strong as the level at the nuclear membrane, it was highly suggestive of a potential role linked to the Hox regulatory activity. We thus decided to analyze this aspect further. As expected, we confirmed that endogenous LamC was almost absent in clones expressing the *LamC-RNAi* construct (Fig. S1C). These clones still contained endogenous Ubx, at levels comparable to the levels found in surrounding wild type cells (although this level can fluctuate from cell to cell in the fat body: Fig. S1). The presence of both Ubx and ATG8-mCherry vesicles also confirmed that anticipated autophagy obtained in *LamC-RNAi* clones was not due to a loss of the Hox gene expression.

The role of LamC as a potential Hox cofactor was demonstrated *in vivo* and *in vitro*, tacking Ubx as exemplary bait Hox protein for the different interaction assays.

Genetic evidence was obtained by using the clonal expression system in the larval fat body. In this context, the single ectopic expression of Ubx was sufficient to significantly repress autophagy at the L3-W stage (both the surface and number of autophagy vesicles were measured: Fig. 2A-A'), as previously observed (Banreti et al., 2014). Importantly, the repressive activity of Ubx was lost when co-expressed with *LamC-RNAi* (Fig. 2A-A'), demonstrating that LamC is essential for the proper autophagy repressive function of Ubx.

Molecular interaction between Ubx and LamC was validated *in vivo* by doing Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC, (Duffraisse et al., 2014), see also Materials and Methods). The co-expression of Ubx fused to the N-terminal

fragment of Venus (construct VN-Ubx) and LamC fused to the complementary C-terminal fragment of Venus (VC-LamC) led to fluorescent BiFC signals that were enriched at the nuclear periphery of fat body cells (Fig. 2B). Using a mutant form of Ubx that could not bind DNA (mutation in the residue 51 of the HD, construct VN-Ubx⁵¹) abolished the autophagy repressive activity of Ubx (Fig. 2A-A') and strongly affected BiFC with LamC (Fig. 2B-B'). This result showed that the interaction between Ubx and LamC is dependent on the DNA binding of Ubx. It also confirmed the specificity of BiFC, given that VN-Ubx⁵¹ is expressed at the same level as VN-Ubx (Baëza et al., 2015a). We also tested a minimal form of Ubx that corresponds to the HD only: this minimal form was able to interact almost as efficiently as full length Ubx with LamC, showing that the HD is as a major protein interface for recruiting LamC *in vivo* (Fig. 2B-B'). LamC was also systematically interacting with three other Hox proteins tested by doing BiFC in the fat body (Fig. S2). According to the strong conservation of the HD between different Hox proteins, we hypothesize that Hox/LamC interactions could rely on the HD in general. Finally, we showed that Ubx could immunoprecipitate LamC when co-expressed in HEK293-T cells, further confirming the positive interaction status between the Hox and LamC proteins (Fig. S2).

Given the ring-like expression profile of Hox and LamC, we asked for the nuclear profile of *atg* genes. To this end, we performed fluorescent in situ hybridization (FISH) to stain the genomic locus of two known Hox-repressed *atg* genes, *atg1* and *atg18b* (Banreti et al., 2014). Our analyses revealed that these two genomic loci are respectively localized at 2 μ m or 2,3 μ m from the nuclear periphery on average, at the L3-F stage (Fig. 3A and Fig. S3, see also materials-and-methods for distance measurements). In contrast, these loci are located at a more distant place from the nuclear periphery at the L3-W stage, respectively at 2,7 μ m and 3 μ m on average (Fig. 3A and Fig. S3). These differences are significant between the L3-F and L3-W stage. As a control, we also considered the genomic locus of *hsp83*, which is expressed at both the L3-F and L3-W stages (FlyBase High Throughput Expression Pattern Data). *Hsp83* locus was localized between 3,2 and 3,5 μ m from the periphery at both stages on average (Fig. 3B). This observation confirms that transcriptional activation is linked to a certain distance from the periphery, as

previously noticed for *atg* loci at the L3-W stage. Together, the FISH experiments indicate that repressed and non-repressed genomic loci are preferentially located at distinct places within the nucleus of fat body cells, respectively at short or longer-range distance from the nuclear periphery. In addition, the short distance of *atg* loci at the L3-F stage was not due to the presence of LamC since this distance was not affected upon *LamC-RNAi* (Fig. 3C). Considering that the DNA-binding of Ubx was indispensable for the formation of Ubx/LamC complexes *in vivo*, we hypothesize that Hox proteins could be responsible of the anchorage of *atg* loci at the LamC-rich nuclear periphery. This role remains however difficult to demonstrate since it implies abolishing the expression of several Hox genes (at least five) in the same clones.

To better correlate the interaction potential between Ubx and LamC with the repression of autophagy *in vivo*, we precisely quantified the degree of co-localization of the endogenous molecules. Because Ubx and LamC primary antibodies are from mouse, we used an Ubx-YFP line that reproduced the expression pattern of Ubx in fat body nuclei (Fig. S3). Confocal acquisitions showed clear overlapping enrichments, but also Ubx- or LamC-specific patterns (Fig. 4A-A'). To increase the resolution scale and perform better measurement of co-expression, we performed Lightning confocal acquisitions, (reaching 150nm instead of 200nm on average, see Materials and methods). Lightning images (Fig. 4B-B'') were used to make masks (Fig. 4C) for calculating the percentage of Ubx and LamC co-expression dots. This analysis showed that 32% of enriched Ubx dots were co-localized with LamC in the entire nuclear ring (0-4 μ m of width; Fig. 4C-C'). Interestingly, the number of Ubx dots that co-localized with LamC respectively increased to 40% or dropped to 10% in the 0-3 μ m or 3-4 μ m zone of the ring expression profile (Fig. 4C-C'). The preferential co-localization of Ubx and LamC in the 0-3 μ m zone coincides with the preferential localization of *atg* loci in the same region at the L3-F stage, which strongly suggests that they could correspond to repressive Ubx/LamC complexes. Accordingly, we observed that Ubx molecules were also significantly enriched on the repressed *atg1* locus when compared to the *hsp83* locus (Fig. 5A-A'; p-value=0,0075). Enrichment of LamC molecules could not

be measured because the ring staining of LamC was lost in the FISH experimental conditions.

To further establish that Ubx/LamC complexes could be enriched in the context of *atg* gene regulation, we combined BiFC with FISH against *atg1* or *hsp83* (Fig. 5B). The analysis showed that BiFC signal intensity was significantly higher on *atg1* loci when compared to *hsp83* loci (p-value=0,004; Fig. 5B'). This result confirms that the autophagy repressive function of Ubx is dependent on a specific enriched association with LamC on *atg* loci.

Discussion

How Hox proteins regulate their specific sets of target genes is a longstanding and yet not resolved issue. Most of previous and current work is focusing on the association of Hox proteins with other TFs on particular DNA-binding sites. This issue is by now becoming more and more complex, with the identification of low-affinity DNA-binding sites and the increasing role of the DNA helix structure in the mechanistic mode of recognition of Hox proteins.

Nevertheless, the molecular mode of action of Hox proteins, and more generally of TFs, has rarely been investigated in the context of the nuclear environment. Here, the particular and typical ring expression profile of Hox proteins in the nucleus of fat body cells constitutes a unique opportunity for assessing this issue.

How and why forming a nuclear ring in fat body cells?

The donut-like shape pattern does not only apply to the Hox proteins, but also to DNA, as illustrated with the DAPI staining. This observation implies that the chromatin and all associated proteins are shrunk within this particular ring-like space all along the nuclear periphery. This zone contains transcriptionally repressed genes like *atg* genes, but also transcriptionally activated genes like *hsp83*. Although it remains to be shown, we hypothesize that the nucleolus could

be at the origin of this peripheral shrinking of the chromatin and nuclear matrix. The role of the nucleolus in portioning the nucleus and the genome has been described in several cases (Bersaglieri and Santoro, 2019). It will be interesting to know if the destabilization of the nucleolus (for example by using RNAi against the Fibrillarin-encoding gene) could affect the donut-like pattern of Hox proteins and induce or not anticipated autophagy.

The formation of this nuclear ring is intriguing and is at least not relying on LamC since *LamC-RNAi* affected neither the Ubx nor the DAPI nuclear pattern. We hypothesize that compaction of the nuclear material in a circular ring could be a way to concentrate molecules, and in particular TFs like the Hox proteins, allowing them to repress their target genes upon specific enrichments on the *cis*-regulatory sequences. This kind of enrichments could be of particular importance for the formation of microenvironments involved in the recognition of low-affinity DNA-binding sites, as previously described for Ubx in the embryo (Tsai et al., 2017). In this context, the increased size of the nucleus at the L3-W stage could induce a dilution of Ubx molecules in the ring space, therefore destabilizing the microenvironments and the underlying transcriptional repressive activity before the complete absence of Hox proteins.

LamC as a novel generic cofactor of Hox proteins

We provided several lines of evidence about the interaction between Ubx and LamC. This interaction is dependent on the DNA-binding of Ubx and can be reproduced with the HD alone. In addition, BiFC showed that LamC could interact with three other Hox proteins (Dfd, Scr and Antp) that are quite divergent in their primary sequence except in the HD-containing region. Interaction between the HD of Ubx and LamC may explain the general ability of LamC to interact with other Hox proteins, suggesting that this interaction could be evolutionary conserved and/or even occurring with other types of HD-containing TFs.

Interaction with LamC may provide the repressive environment to help the Hox protein to repress *atg* genes. In this model, LamC would act as a “provider” of associated repressors, like the histone deacetylase HDAC3 (Demmerle et al., 2012;

Somech et al., 2005). The fact that we did not observe any significant delocalization of *atg* loci upon *LamC-RNAi* also suggests that LamC molecules are not necessary for the anchorage of those loci in the 0-3µm distance of the nuclear periphery. Still, by recognizing AT-rich sequences, LamC molecules could somehow stabilize Hox DNA-binding enrichment on *atg* loci. Given the importance of Ubx DNA-binding for interacting with LamC and repressing autophagy, we propose that Hox DNA-binding could constitute the primary event responsible of the preferential anchorage at the nuclear periphery. In this model, enrichment of LamC molecules at the nuclear periphery could stabilize both DNA-binding and enrichment of Ubx on *atg* loci for efficient repression. This mechanism would only be possible by concentrating all the interacting partners and DNA-binding sites, explaining the importance of the nuclear ring-like shape pattern for autophagy repression.

Materials and methods

Fly stocks and transgenic lines

The different *Gal4* drivers used are: *c564-Gal4* ; *Tub-Gal80* (BL6982), *FDAG* for the mitotic clones : *yw,hs-Flp;r4-mCherry::Atg8a;Act>CD2>GAL4,UAS-GFPnls* (Banreti et al., 2014).

UAS-RNAi constructs were from Bloomington (see table S1). Several UAS-driven fly lines were used: *UAS-VC-Scr*, *UAS-VC-Ubx*, *UAS-Antp-VC*, *UAS-VN-Exd*, *VN-Ubx*, *UAS-VC-Ubx⁵¹*, *UAS-VN-Ubx⁵¹*, *UAS-VN-HDUbx* and *UAS-VC-Dfd* have already been used (Baéza et al., 2015a). *UAS-VC-LamC* and *UAS-VN-LamC* were generated in this work. All UAS constructs were sequence verified before fly transformation and transgenic fly lines were established with the ΦC31 integrase (Bischof et al., 2007), except *UAS-Antp-VC* that was established by P-element mediated transformation. The Ubx-YFP line is from the Cambridge protein trap project FlyProt (line CPTI-000601) and exhibits YFP expression that is indistinguishable from wild type Ubx expression in the embryo and the haltere imaginal disc (Choo et al., 2011).

Flip-out expression of UAS constructs and mitotic clones and quantitation of autophagy

Clonal expression in fat body cells were performed as previously described (Banreti et al., 2014). Briefly, males carrying UAS constructs were crossed to *yw,hs-Flp;r4- mCherry::Atg8a;Act>CD2>GAL4,UAS-GFPnls* females. Crosses were kept for 1 night for egg laying at room temperature. Thereafter, parents were removed and the tube was incubated at 25°C for 3 days. Leaky expression of the heat-shock inducible Flp led to random “flip out” of the CD2 cassette, allowing Gal4 to be expressed and to activate the expression of UAS-driven transgenes and nuclear GFP (to identify the cellular clones). mCherry-Atg8a (mCh::Atg8a) was used for tracing autophagy activity in the whole fat body.

Quantifications were done with Fiji. To measure the size and count the number of vesicles we used the maximum projection of the images. First, we create a mask on the channel corresponding to the clones (here, the green channel), using a gaussian blur (sigma=1) and then the right treshold. To fill the holes in the mask, we use the function « Close » and « Fill holes ». Thanks to the « 3D object counter » function, we extract the surface of the clones (μm^2). Then, we use the « Image Calculator » with the « AND » function to create an image containing only the vesicles present in the clones (green channel mask AND max projection of the vesicles = red channel). After that, the right treshold is applied to this image to create the binary image, however we do not use the « Fill holes » function in this case. The « Watershed » function is more useful to separate all the vesicles. The surface and number of vesicles is extracted through the « 3D object counter » function as previously. Finally, to do the same measurements out of the clones (internal control), we create a mask of the zone where the vesicles are and in this case the « Fill holes » function is applied. To remove the clones from this mask, we use again the « Image Calculator » with the « Subtract » function. Then, we can measure the surface of the non-clones area. This mask is combined with the red channel image to create the image containing only the non-clones vesicles (using the « AND » function). Finally, we are able to extract the surface and the number of the vesicles in this area with the « 3D object counter » function.

From the Excel file generated, we can thus compare the vesicles surface inside and outside the clones. For the number of vesicles, we first divide it by the area of the respective zone which give us the number of vesicles / μm^2 .

Preparation of Samples and Immunostaining

Larvae were dissected 4 days (L3 Feeding stage) or 6 days (L3 Wandering stage) after egg laying. Larval fat bodies were fixed at room temperature for 20 min in PBS, 3.7% formaldehyde (formaldehyde methanol free, Thermo scientific) and washed for 30 min in 1xPBS. For immunostaining, all incubations were done in PBS, 2% BSA, 0,1% Triton X-100 following standard procedures. Primary antibodies were diluted in PBS, 0,1% Triton X-100 and fat bodies were incubated with this solution, over night at 4°C. After one hour of washes in PBS, 0,1% Triton X-100, the secondary antibody was diluted in the same solution and tissues were incubated for two hours at room temperature. After one hour of washes, samples were mounted in Vectashield DAPI if possible, if not in Vectashield alone.

Here is the list of primary antibodies used for immunostaining : anti-Lab, 1 : 200 (kindly provided by M. Affolter lab) ; anti-Dfd, 1 : 200 (kindly provided by I. Lohmann lab) ; anti-Antp, 1 : 50 (mouse, 8C11, Developmental Studies Hybridoma Bank : DSHB) ; anti-UbdA, 1 : 200 (mouse, FP6.87, DSHB) ; anti-AbdB, 1 : 200 (mouse, kindly provided by J. Enriquez lab) ; anti-Ubx, 1 : 400 (mouse, FP3.38, DSHB) ; anti-LamC, 1 : 500 (mouse, LC28.26, DSHB) ; anti-LamB, 1 : 500 (mouse, ADL67.10, DSHB) ; anti GFP, 1 : 500 (chicken, AB13970, Abcam) ; anti-mCherry, 1 : 500 (rabbit, NBP2-25157, Novus Bio) et anti-fib, 1 : 500 (rabbit, Ab5821, Abcam).

For fluorescent detection we used secondary antibodies coupled to different fluorophores : Alexa405, 1 : 500 (rabbit, Ab175653, Abcam) ; Alexa488, 1 : 500 (Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Chicken IgG (H+L) A-11039, Thermofisher) ; Cyanine 3, 1 : 500 (Cy3® Goat Anti-Mouse IgG (H+L) A10521, Thermofisher) ; Alexa647, 1 : 500 (mouse, A-21235, Thermofisher).

Fluorescence in situ hybridization (FISH)

The protocol to synthesize FISH probes comes from the book (Bantignies and Cavalli, 2014). Oligonucleotides are designed to cover a 12 kb sequence, centered on the coding sequence of the gene of interest, here: *Atg1*, *Atg18b*, *Hsp83*. Oligonucleotides for each gene are designed with the Primer 3 software (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) and are listed in the table below:

Name	FISH Atg1	FISH Atg18b	FISH Hsp83
Fragment-1_5'	TCA-CCT-TTT-GCA-AAG-TTT-TT	AAG-TGT-AGA-CGA-TGC-CCT-AA	AAG-CAA-CCA-GTG-GCA-AAT-TC
Fragment-1_3'	TTA-AAA-TGT-GCT-GGG-AGT-TT	CAT-CGA-TTT-GTG-TTG-ACT-TG	TCG-CAT-ATT-CCA-GGT-TCT-CC
Fragment-2_5'	GTC-ATT-TTG-GAT-TTG-TCG-TT	ACA-TTT-TAA-GGG-ATG-CTT-CA	CCC-CGC-AGT-TGT-TAA-GAT-GT
Fragment-2_3'	TGG-ACA-AAC-AAA-ACG-TAT-GA	CTT-TGG-CTT-TGC-TTA-CCT-TA	AGC-AGC-TCC-CAA-AAG-AAC-AA
Fragment-3_5'	TTG-TTA-GTT-GAG-AGG-CCA-TT	ACG-ATT-TGT-TTC-ACG-CTA-TT	GGG-AGG-CAT-CGA-TAA-CAG-AA
Fragment-3_3'	AGC-GAT-TCT-TAC-AGC-TTC-TG	GTC-CAT-TCA-AAG-ACA-CGA-TT	GCA-TTG-TCA-CCC-CCT-AAA-AA
Fragment-4_5'	TTG-ACT-CCA-GGG-TAT-TTG-AC	GCT-TTT-TCT-GTT-TCA-TGG-TC	GCT-TCC-ACA-AAC-TTC-CTT-GG
Fragment-4_3'	TAT-GGA-ATA-AGC-TGG-CTG-TT	CCA-GGA-TGA-GTA-CTT-TCT-GC	GTG-TGG-AAG-CGA-AGG-AAG-TC
Fragment-5_5'	ATT-TGG-GTT-ACA-GGT-GTT-TG	ATT-GAT-TTT-TAC-CCA-TGC-AC	TGT-GCA-AGC-TGA-TGA-AGT-CC
Fragment-5_3'	TCC-TGG-CAC-TGT-TCT-AGT-TT	GTG-AAA-ATC-GAA-TCG-AAA-AG	ACG-CCC-AAA-TAA-TGT-CGA-AG
Fragment-6_5'	ACA-TCC-TTG-TCT-ATG-CTG-CT	AAA-TAA-AGC-ATT-TTC-GCT-TG	TGT-TGC-CGG-GGA-CTA-TTA-AG
Fragment-6_3'	TTC-GCA-CAT-GTG-AGT-GTA-TT	CTT-TTC-GTG-AAC-CGT-CTT-AC	TTT-TCC-GTC-CAC-TGA-AGG-TC

Each fragment is amplified by PCR with *Drosophila* genomic DNA as a template. The final probes have a length between 1 and 1,5 kb. PCR products are then digested and coupled with a fluorophore (Alexa488 or Alexa555) through the Tag™ DNA Orange Kit (with Alexa Fluor™ 555 dye (Thermofisher) - F32948) protocol.

We used the protocol for FISH in *Drosophila* tissues, as described elsewhere (Bantignies and Cavalli, 2014).

Co-immunoprecipitation (CoIP)

CoIP analyses was performed using total protein lysates isolated from transfected 6x 10⁷ HEK293T cells. Protein extraction and immunoprecipitation was done using a mild IP buffer (20mM Tris pH7.5, 150mM NaCl, 2mM EDTA, 1%

NP40). The immunoprecipitation was carried out with Rabbit Anti HA antibody (Invitrogen, 1:10,000 dilution) and the western was revealed with Rabbit Anti GFP (Chromotek, 1:10,000 dilution).

Confocal imaging of drosophila fat bodies

Images were acquired on a confocal microscope Leica SP8. A x63 objective was used to perform all the images. Different laser beams were used to image each fluorophore: 405 nm laser for DAPI and Alexa405 stainings; 488 nm laser for the BiFC and Alexa488 fluorophore; 552 nm for the mCherry, Cy3 and Alexa555, 638 nm laser for Alexa647 stainings. For intensity quantifications, imaging parameters were fixed for all conditions.

The Lightning option allows imaging of weak signals by improving the signal to noise ratio (SNR). The Lightning software sets the optimum parameters of acquisition depending on the stack thickness, the objective used, the mounting medium (Vectashield), and the laser wavelength. These parameters allow the extraction of maximum details of each voxel of the image. Acquired images are then treated by the “Lightning decision mask”. It ensures to apply the best fitting reconstruction strategy for each specific volume element. This constitutes the strong contrast to other, traditional methods that apply global effective reconstruction schemes. This mask removes background fluorescence and detect signals with limited photon emission. The maximum resolution reached is around 120 nm (versus 200-250 nm for conventional confocal imaging).

[\(https://www.leica-microsystems.com/fr/produits/microscopes-confocaux/informations-detaillees/product/show/Products/lightning/\)](https://www.leica-microsystems.com/fr/produits/microscopes-confocaux/informations-detaillees/product/show/Products/lightning/).

Quantifications of co-localization and distance measurements

The Fiji software was used for all the quantifications

Two-color and 3D plot profiles:

The multicolor line profiles were generated using ImageJMacro (Macro_plot_lineprofile_multicolor from *Kees Straatman, University of Leicester*). The macro was applied on composite raw images. The 3D profiles were generated using the Plugin “3D Surface plot” on Fiji.

Measurement of FISH-nuclear periphery distances:

The macro was generated by Jacques Brocard (PLATIM microscopy platform, Lyon, FRANCE). It allows the measurement of the distance between the center of the FISH signal and the nuclear periphery, in 3D. Regions of interest (ROIs) are chosen (squares of 25,12 μm) and registered in the ROI manager. Then the macro is automated to apply a threshold on the LamB staining to draw the shape of the nucleus in 3D and a second threshold for the FISH signal. This is done for all the nuclei listed in the ROI manager. The Diana Plugin allows to measure the distances on the binary images generated by the thresholding.

All the data are then stored in a global table for further analysis. The macro gives three parameters: FISH volume, nucleus volume and distance. The nucleus volume allows calculating the theoretical radius. This value allows us to normalize the distances by dividing it by the nucleus radius. That way, the calculated distances are independent of the nucleus size.

Co-localization analyses:

The pipeline is described in the Supplementary Figure 4. The quantifications are done on the middle plane of nuclei, in 2D. For each nucleus, a binary mask is generated by applying a threshold on the LamC staining. The function “Erode” is used to create the four regions of one μm width. The “Wand Tool” function allows drawing a selection at the periphery of each zone. The selections are stored in the ROI manager so that they can be applied on the raw images for co-localization analysis. For that, we used the JACoP plugin and choose the Manders coefficients, as the staining is not homogeneous in the nucleus. These coefficients gives the percentage of overlap between the two different channels.

For the 0-1 μm region, the threshold for the LamC image was different from the other regions because of the high intensity of the external ring of LamC. For the other regions, the same threshold was used into one nucleus. The thresholds could vary between several nuclei depending of the staining quality, but the same structures (foci with high intensity) were chosen to set the thresholds in all the nuclei.

For the 0-3 μm or 0-4 μm regions, the Manders coefficients are calculated from three or four 1 μm regions in width, respectively. The final value of Manders

coefficients, for each nucleus, correspond to the mean of Manders coefficients measured in the 1 μm regions.

Figure legends

Figure 1. Hox and LamC form a ring expression profile in the nucleus of fat body cells. **A.** Expression profile of Labial (Lab), Deformed (Dfd), Antennapedia (Antp), Ubx and AbdominalA (AbdA), and AbdominalB (AbdB) in a fat body nucleus of L3-F stage larvae (red). **B-B''.** Co-staining of Ubx (red) and DAPI (cyan) in a L3-F fat body nucleus. The plot profile in B' (over the width of the ring, white bracket in B) shows the distribution of enrichment peaks for Ubx (red line) and DAPI (cyan line). The enlargement in B'' (from the white square depicted in B) shows the 2D (bottom left) or 3D (bottom right) projection of Ubx and DAPI distribution. Different zones with or without co-localization are highlighted (white arrowheads). **C-C''.** Co-staining of LamC (red) and DAPI (cyan) in a L3-F fat body nucleus. The plot profile in C' (over the width of the ring, white bracket in C) shows the distribution of enrichment peaks for LamC (red line) and DAPI (cyan line). The enlargement in C'' (from the white square depicted in C) shows the 2D (bottom left) or 3D (bottom right) projection of LamC and DAPI distribution. Different zones with or without co-localization are highlighted (white arrowheads). Note the high level of LamC at the nuclear membrane compared to the internal ring diffusion level.

Figure 2. Interaction between Ubx and LamC. **A.** Clonal expression of Ubx in the fat body of L3-W stage larva, either wild type, mutated in the residue 51 of the homeodomain (HD), or with *LamC-RNAi*, as indicated. **A'.** Quantification of autophagy at the L3-W stage (surface and number of autophagy vesicles) from the analysis of genetic contexts in A. Clonal expression of VC-Ubx represses autophagy (p-value=0,00058). The HD51 mutation and *LamC-RNAi* abolish the autophagy repressive function of Ubx (no significant difference with wild type L3-W). **B-B'.** Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) between different Ubx constructs fused to the N-terminal fragment of Venus (VN) and LamC fused to the C-terminal fragment of Venus (VC) in the L3-F fat body, as indicated. Constructs

were expressed at low level with the mesodermal *C564-Gal4* driver (see also materials and methods). The HD51 mutation strongly affects BiFC signals between Ubx and LamC, while the HD of Ubx behaves like full length Ubx. Enlargements show the preferential enrichment of BiFC signals in a ring-like pattern at the nuclear periphery (one confocal stack is shown). Statistical quantification of BiFC is shown (B').

Figure 3. The *atg1* locus is preferentially located at the periphery when it is repressed. A-A'. Expression profile of the *atg1* locus (green) at the L3-F and L3-W stage, as indicated. Quantification of the *atg1* locus in A' was measured as a distance from the nuclear periphery (stained in red with anti-LamB) and normalized over the radius of the nucleus. The distance is significantly shorter at the L3-F when compared to the L3-W stage. (p-value=0,004). **B-B'.** Expression profile of the *hsp83* locus (green) at the L3-F and L3-W stage, as indicated. Quantification of the *hsp83* locus in B' was measured as in A'. There is no significant difference (ns) between the L3-F and L3-W stage. (p-value=0,301) **C-C'.** Expression profile of the *atg1* locus (green) in *LamC-RNAi* expressing nuclei at the L3-F stage. Quantification of the *atg1* locus in C' was measured as in A'. There is no significant difference (ns) between wild type and *LamC-RNAi* expressing nuclei. (p-value=0,063). **p-value<0,001.

Figure 4. Co-localization of Ubx and LamC in the nuclear ring of L3-F fat body cells. A-A'. Confocal acquisition of Ubx-YFP (GFP staining, green) and LamC (red) in a L3-F nucleus. Enlargements (A') are shown as in the Fig. 1. **B-B''.** Confocal Lightning acquisition and co-localization of Ubx and LamC in the L3-F fat body nucleus. Plot profile and enlargements are as in the Fig. 1. **C-C'.** Ubx and LamC are preferentially co-localized at the periphery of the nuclear ring. Masks were applied to delineate Ubx (green) and LamC (red) spots for calculating the co-localization Mander's coefficient score. Compared to entire width of the ring (0-4 μ m), Ubx and LamC spots are significantly more (in the 0-3 μ m zone, p-value=8,99E-07) or less (in the 3-4 μ m zone, p-value=1,51E-07) frequently co-localized. ***p-value<0,0001.

Figure 5. Ubx and LamC preferentially co-localize and interact at the level of the *atg1* locus in L3-F fat body nuclei. **A-A'.** Co-localization of Ubx (gray) on *atg1* (red, upper panels) or *hsp83* (lower panels) loci at the L3-F stage, as indicated. There is significantly more Ubx foci on *atg1* than on *hsp83* loci (p-value=0,007). **B-B'.** Co-localization of Ubx/LamC complexes (as assessed by BiFC, green) on *atg1* (red, upper panels) or *hsp83* (lower panels) loci at the L3-F stage, as indicated. There is significantly more complexes on *atg1* loci than on *hsp83* loci (p-value=0,004). **p-value<0,001.

Table S1. List of the RNAi *Drosophila* fly lines from the Blomington stock center that have been tested for the advanced autophagy phenotype in the fat body of L3-F stage larvae.

Supplementary Figure 1. Examples of autophagy-induced phenotypes in the L3-F fat body upon the clonal expression of RNAi constructs. **A.** Expression of RNAi against *centrosomin* (*cnn*) does not induce autophagy. Weak nuclear *atg8-mCherry* expression is observed in GFP-positive clones. Expression of RNAi against *Lamin B* (*LamB*) or *Lamin C* (*LamC*) induces advanced autophagy, as noticed with the apparition of ATG8-mCherry vesicles in GFP-positive clones (clones are underlined with a white-dotted line). **B.** Nuclear expression profile of LamB (red) and DAPI (cyan) in a L3-F fat body nucleus. The plot profile in B' (over the width of the ring, white bracket in B) shows the distribution of enrichment peaks for LamB (red line) and DAPI (cyan line). In contrast to LamC, LamB is not diffusing in a ring-like pattern within the nucleus and is only strongly expressed at the level of the nuclear membrane. **C-D.** Clonal expression of *LamC-RNAi* leads to a loss of LamC (C) but not a loss of Ubx (D) in autophagy-induced clones (white-dotted line).

Supplementary Figure 2. A. BiFC between different VC-Hox fusion proteins and VN-LamC, as indicated. Constructs were expressed at low level with the mesodermal *C564-Gal4* driver (see also materials and methods). Enlargements show the preferential enrichment of BiFC signals in a ring-like pattern at the nuclear periphery (one confocal stack is shown). **B.** Co-immunoprecipitation (co-IP) of VC-Ubx upon the co-expression of HA-tagged LamC in HEK293T cells. Co-IP

was performed with an anti-HA antibody and revealed with a GFP antibody recognizing the VC fragment (Baëza et al., 2015b). VC-Ubx was only observed upon co-expression with LamC (lane 3, band at 55kDa). No signal was detected in cells transfected with either HA-LamC (lane 1) or VC-Ubx alone (lane 2).

Supplementary Figure 3. A-A'. Expression profile of the *atg18b* locus (green) at the L3-F and L3-W stage, as indicated. Quantification of the *atg18b* locus in A' was measured as described in the Fig. 3. The distance is significantly shorter at the L3-F when compared to the L3-W stage. (p-value=4,235E-05). **B-B'.** Expression profile of endogenous Ubx-YFP in the L3-F fat body nucleus. Anti-GFP (green) and anti-Ubx (red) reveals both fused Ubx-YFP and non-fused endogenous Ubx since the *Ubx-YFP* line is not homozygous viable. 98% of Ubx molecules co-localize with Ubx-YFP molecules on average (Manders' coefficients are given in percentage) (B').

Supplementary Figure 4. Procedure for quantifying co-localized spots of Ubx and LamC in the different zones of the nuclear ring. See details in Materials and Methods.

Figures

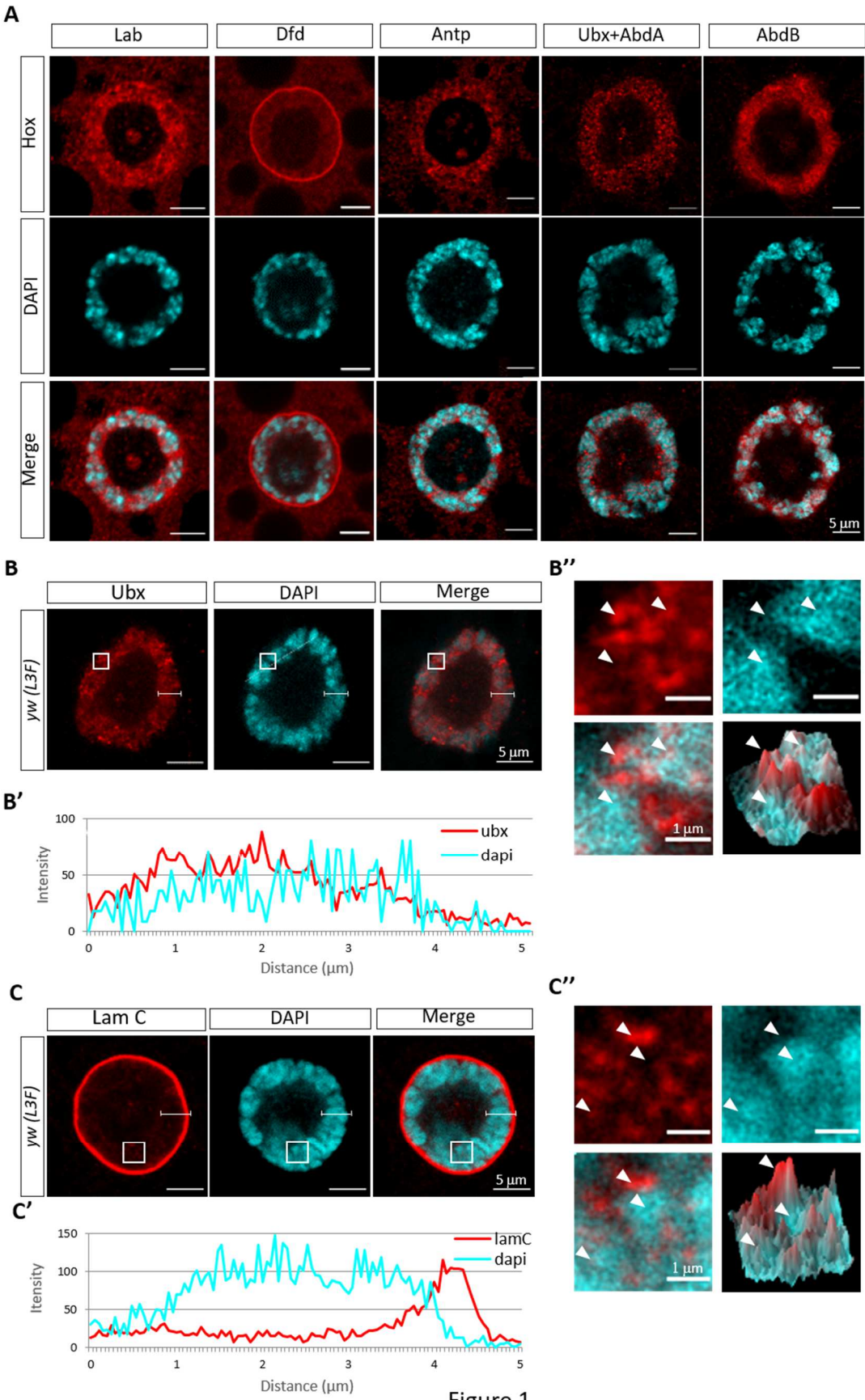


Figure 1

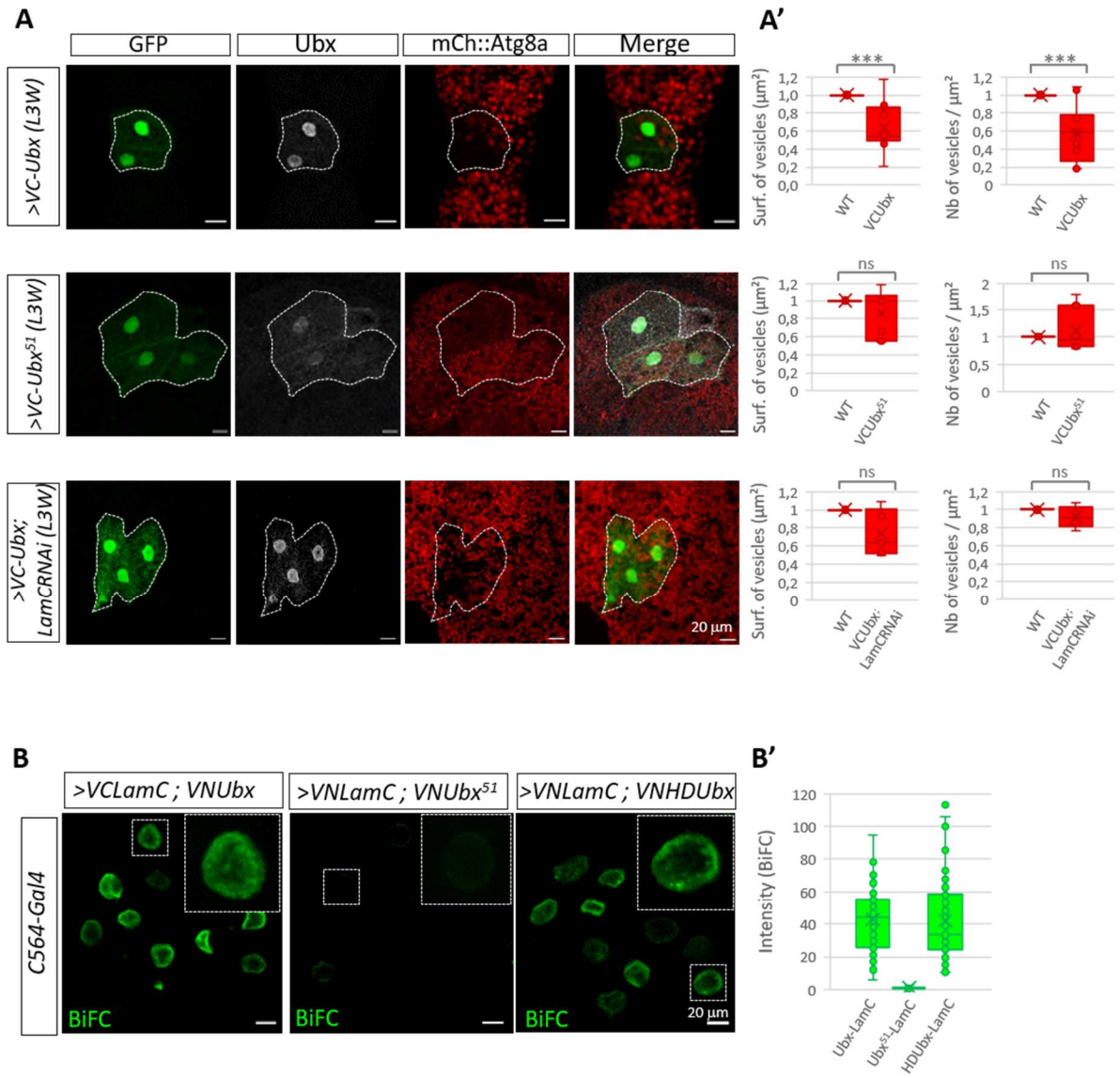


Figure 2

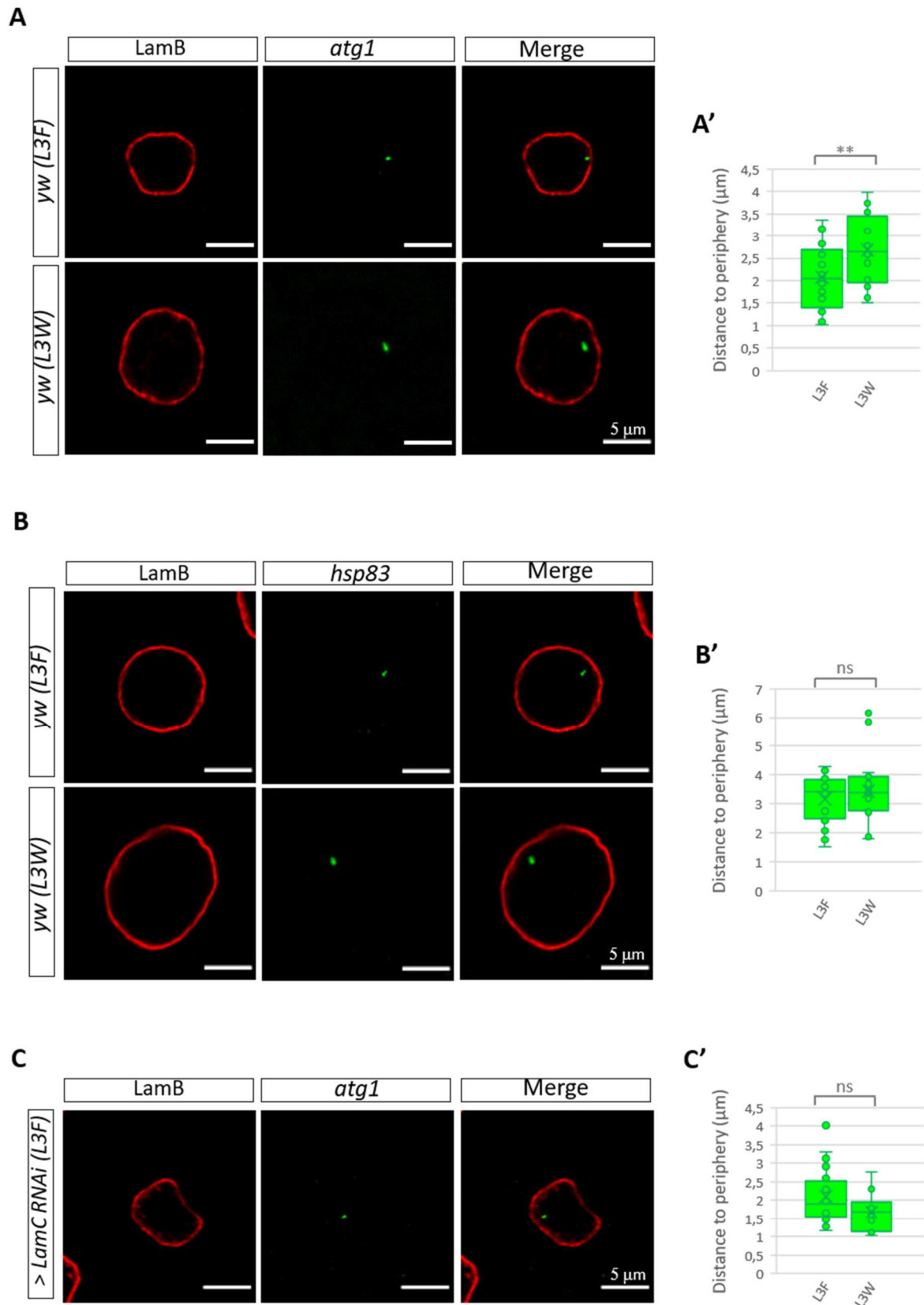


Figure 3

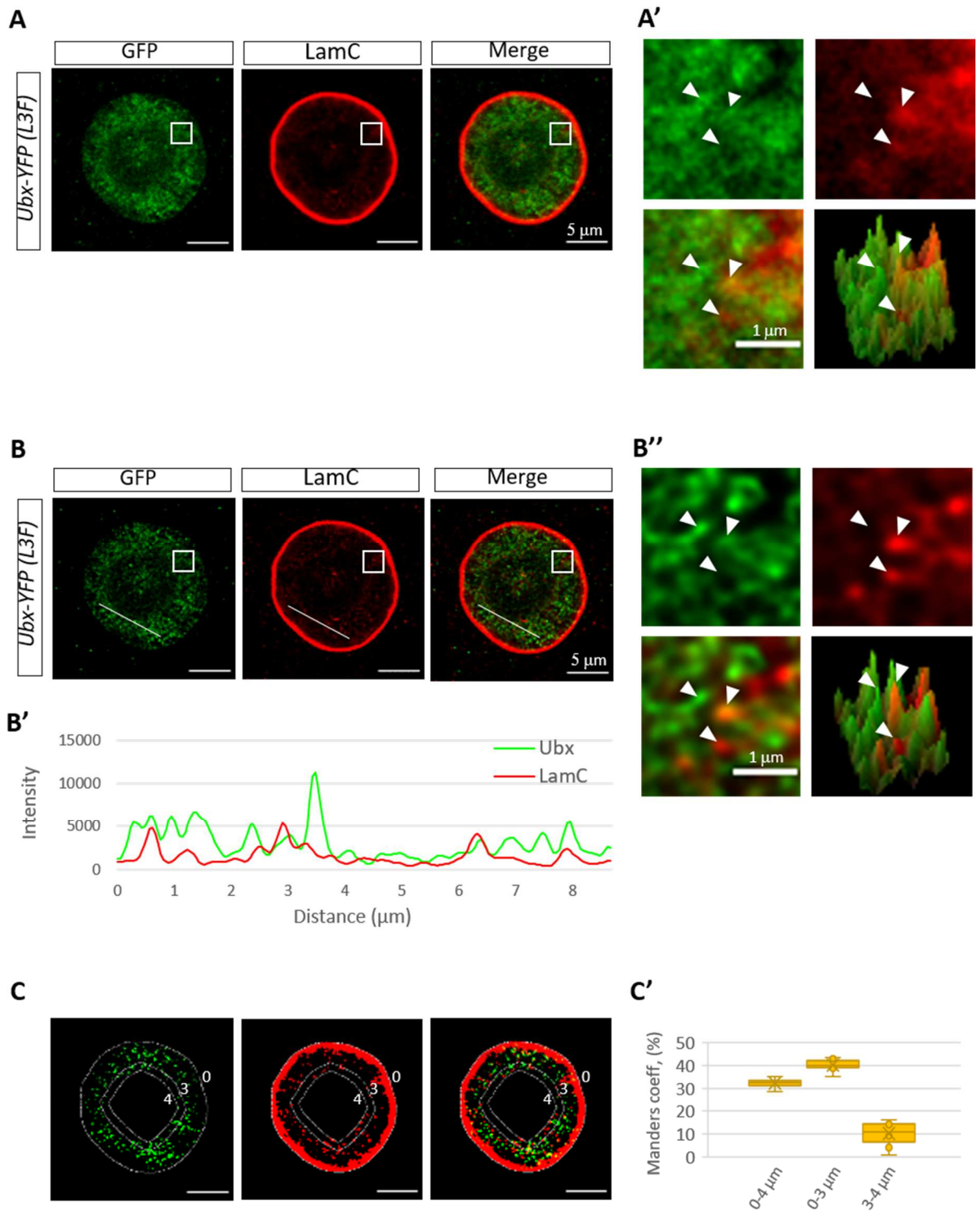


Figure 4

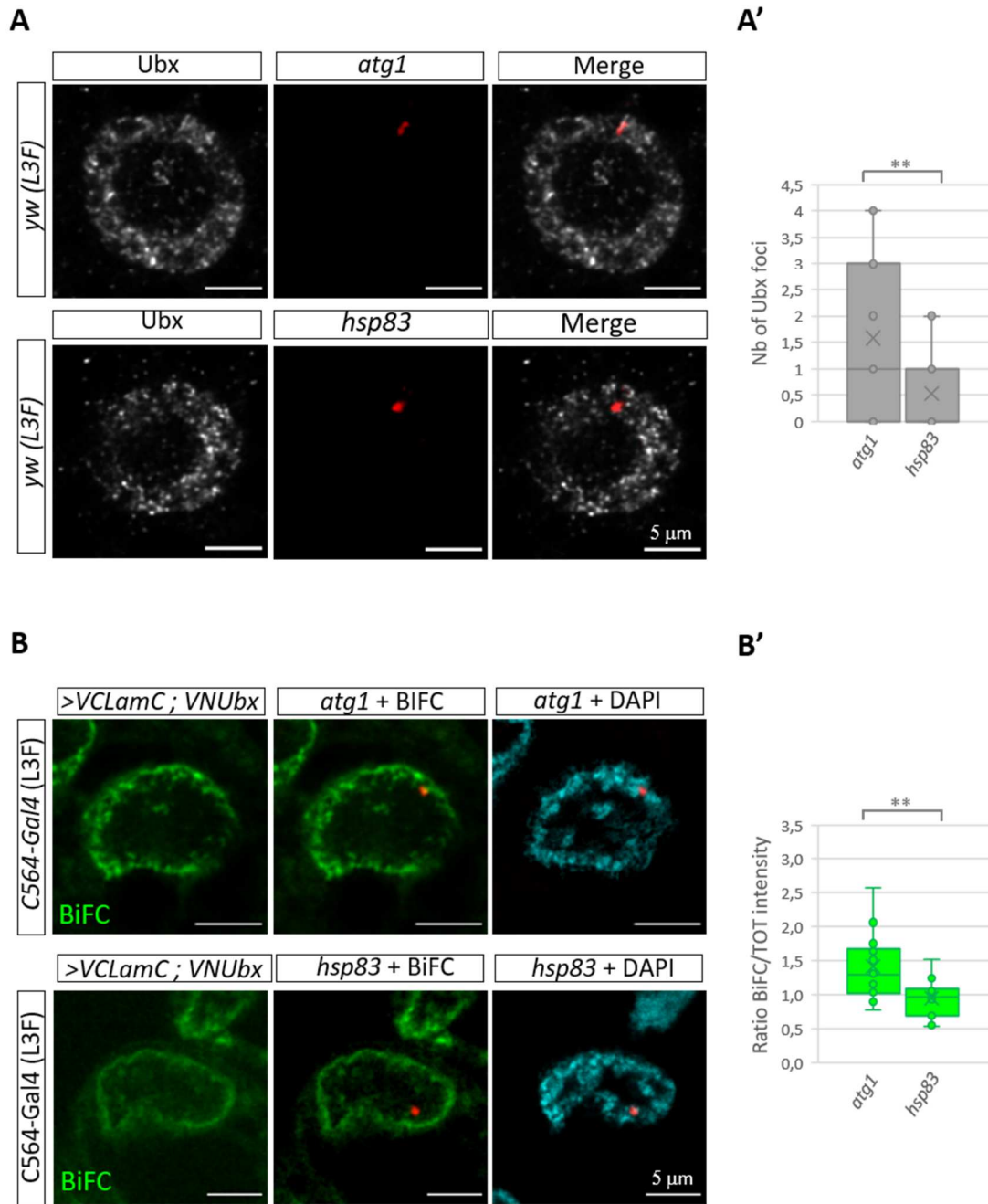
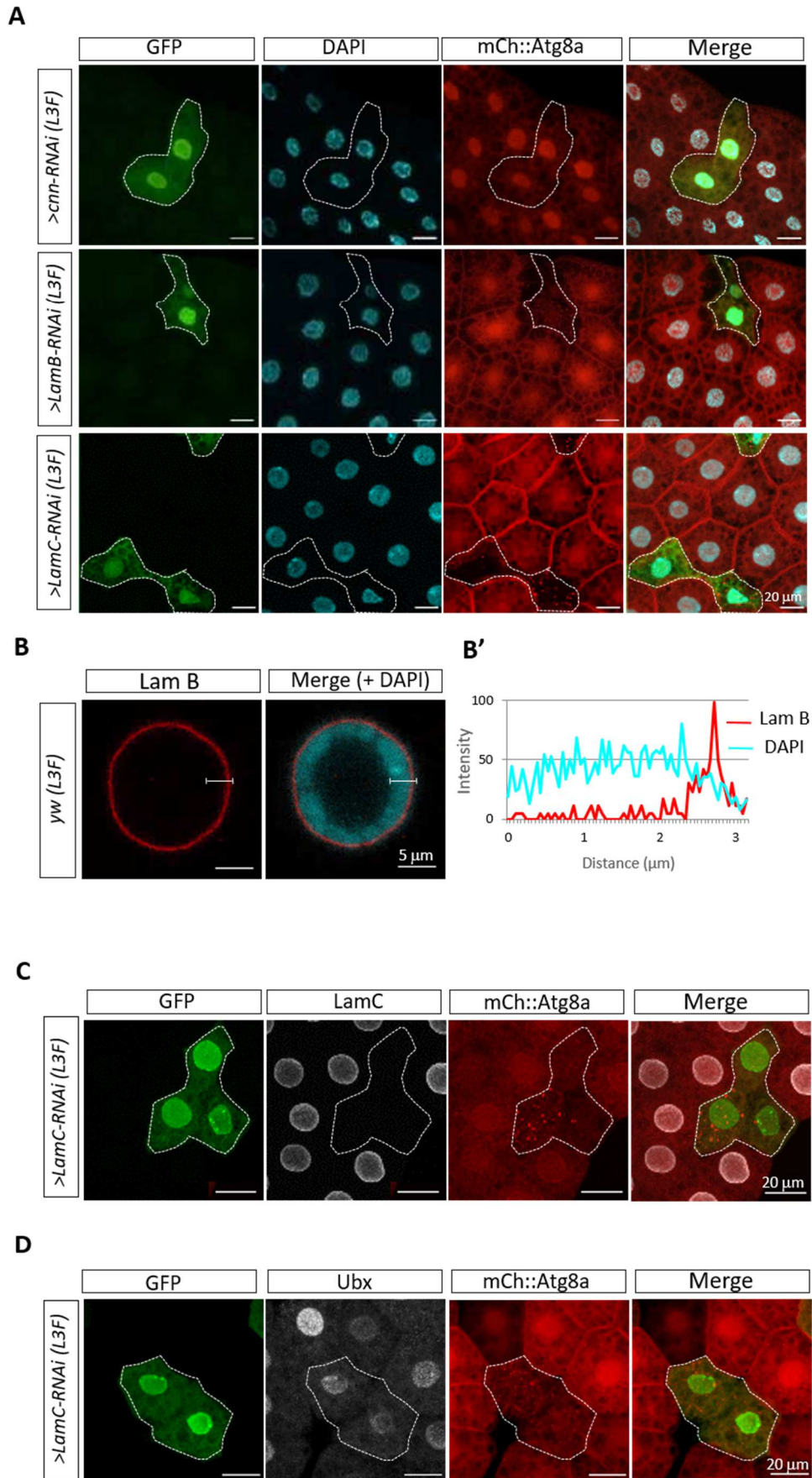


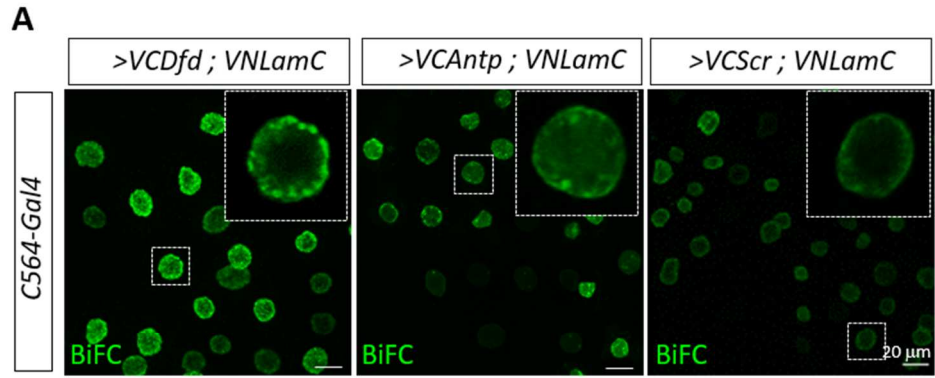
Figure 5

Gene	RNAi fly line (ref)	Autophagy induction
barrier to autointegration factor (baf)	BDSC 36108	-
Bocksbeutel (bocks)	BDSC 38349	-
centrosomin (cnn)	BDSC 35761	-
CG3548	VDRC 26231	-
Dynein light chain 90F (Dlc90F)	VDRC 31749	-
Fasciclin 2 (Fas2)	BDSC 34084	-
female sterile (1) Young arrest (fs(1)Ya)	VDRC 48639	-
klaroid (koi)	BDSC 40924	-
Lamin B (LamB)	VDRC 45636	+
Lamin C (LamC)	NIG-Fly 10119R-2	+
MAN1	VDRC 11149	-
Smrter (Smr)	BDSC 34528	-
Nesprin 1	VDRC 17346	-
Myosin heavy chain (Mhc)	BDSC 35729	-
members only (mbo)	VDRC 47691	-
Nucleoporin 98-96kD (Nup98)	BDSC 28562	-
Otefin (Ote)	BDSC 39009	-
Pendulin (Pen)	BDSC 43142	-
Secretory 10 (Sec 10)	BDSC27843	-

Supplementary Table S1



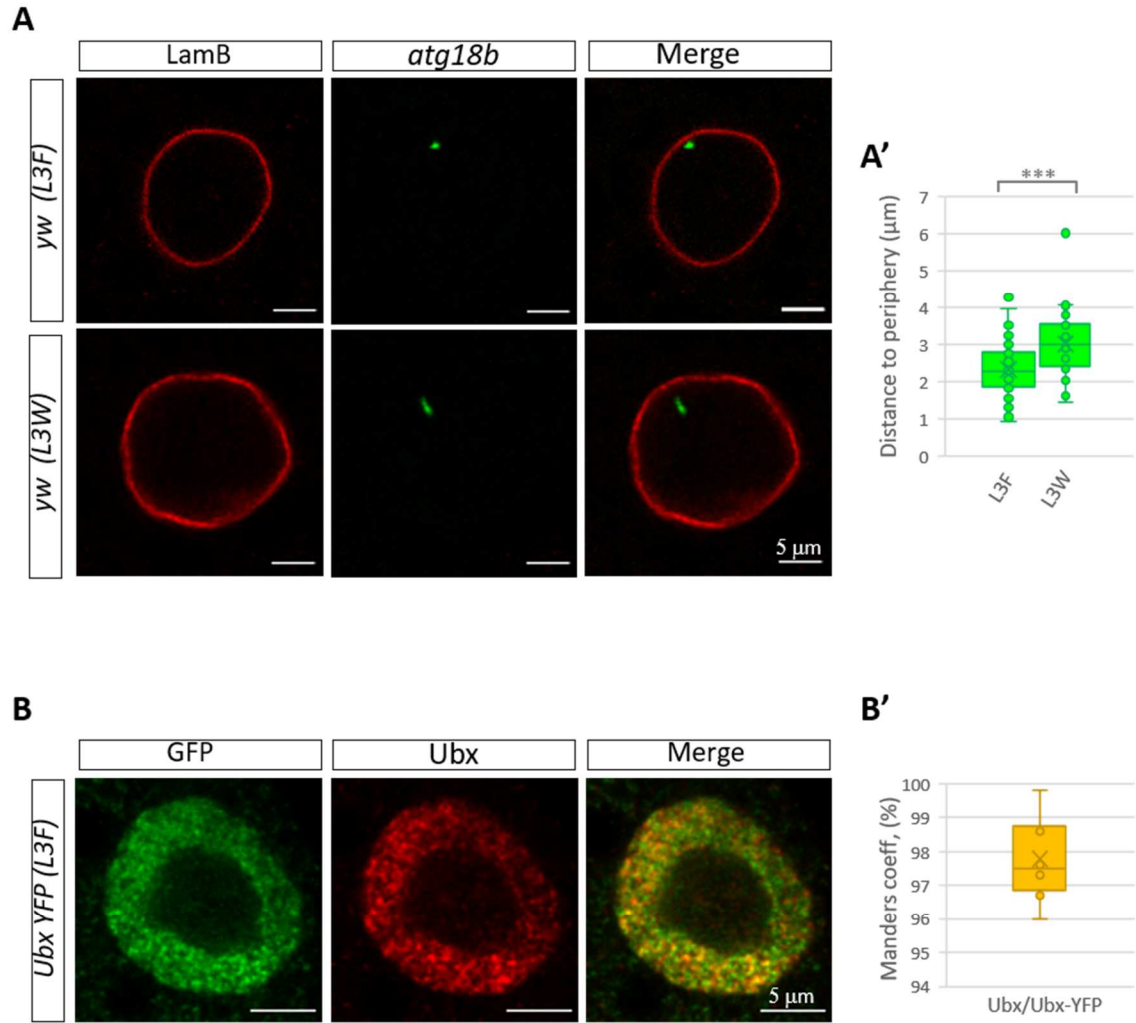
Supplementary Figure 1



B

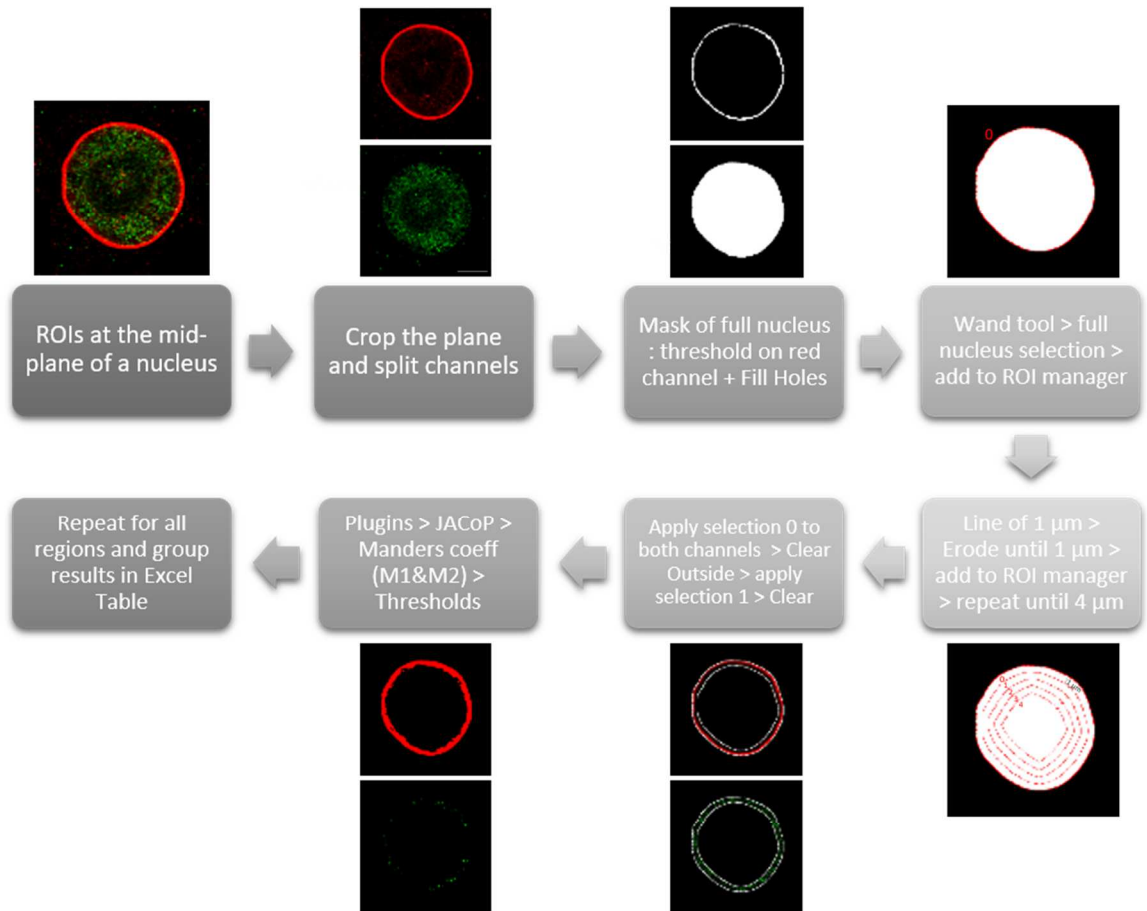
	(1)	(2)	(3)	
LamC HA	+	-	+	
VC Ubx	-	+	+	
CoIP: HA WB: VC				VC-Ubx 55KDa

Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3

A



Supplementary Figure 4

Références

- Agelopoulos, M., McKay, D. J. and Mann, R. S.** (2012). Developmental Regulation of Chromatin Conformation by Hox Proteins in *Drosophila*. *Cell Rep.* **1**, 350–359.
- Alharbi, R. A., Pettengell, R., Pandha, H. S. and Morgan, R.** (2013). The role of HOX genes in normal hematopoiesis and acute leukemia. *Leukemia* **27**, 1000–1008.
- Baëza, M., Viala, S., Heim, M., Dard, A., Hudry, B., Duffraisse, M., Rogulja-Ortmann, A., Brun, C. and Merabet, S.** (2015). Inhibitory activities of short linear motifs underlie Hox interactome specificity in vivo. *Elife*.
- Banreti, A., Hudry, B., Sass, M., Saurin, A. J. and Graba, Y.** (2014). Hox Proteins Mediate Developmental and Environmental Control of Autophagy. *Dev. Cell*.
- Bersaglieri, C. and Santoro, R.** (2019). Genome Organization in and around the Nucleolus. *Cells* **8**, 579.
- Bischof, J., Duffraisse, M., Furger, E., Ajuria, L., Giraud, G., Vanderperre, S., Paul, R., Björklund, M., Ahr, D., Ahmed, A. W., et al.** (2018). Generation of a versatile BiFC ORFeome library for analyzing protein-protein interactions in live *Drosophila*. *Elife* **7**.
- Bobola, N. and Merabet, S.** (2017). Homeodomain proteins in action: similar DNA binding preferences, highly variable connectivity. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **43**.
- Briand, N. and Collas, P.** (2020). Lamina-associated domains: Peripheral matters and internal affairs. *Genome Biol.* **21**.
- Carnesecchi, J., Sigismondo, G., Domsch, K., Eva, C., Baader, P., Rafiee, M.-R., Krijgsveld, J. and Lohmann, I.** (2020). Multi-level and lineage-specific interactomes of the Hox transcription factor Ubx contribute to its functional specificity.
- Crocker, J., Abe, N., Rinaldi, L., McGregor, A. P., Frankel, N., Wang, S., Alsawadi, A., Valenti, P., Plaza, S., Payre, F., et al.** (2015). Low Affinity Binding Site Clusters Confer Hox Specificity and Regulatory Robustness. *Cell* 191–203.
- Demmerle, J., Koch, A. J. and Holaska, J. M.** (2012). The nuclear envelope protein emerin binds directly to histone deacetylase 3 (HDAC3) and activates HDAC3 activity. *J. Biol. Chem.* **287**, 22080–22088.
- Duffraisse, M., Hudry, B. and Merabet, S.** (2014). *Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) in live Drosophila embryos*.

- Harr, J. C., Schmid, C. D., Muñoz-Jiménez, C., Romero-Bueno, R., Kalck, V., Gonzalez-Sandoval, A., Hauer, M. H., Padeken, J., Askjaer, P., Mattout, A., et al.** (2020). Loss of an H3K9me anchor rescues laminopathy-linked changes in nuclear organization and muscle function in an Emery-Dreifuss muscular dystrophy model. *Genes Dev.* **34**, 560–579.
- Hueber, S. D. and Lohmann, I.** (2008). Shaping segments: Hox gene function in the genomic age. *Bioessays* **30**, 965–79.
- Kribelbauer, J. F., Loker, R. E., Feng, S., Rastogi, C., Abe, N., Rube, H. T., Bussemaker, H. J. and Mann, R. S.** (2020). Context-Dependent Gene Regulation by Homeodomain Transcription Factor Complexes Revealed by Shape-Readout Deficient Proteins. *Mol. Cell* **78**, 152-167.e11.
- Mann, R. S., Lelli, K. M. and Joshi, R.** (2009). Chapter 3 Hox Specificity. Unique Roles for Cofactors and Collaborators. *Curr. Top. Dev. Biol.*
- Merabet, S. and Mann, R. S. R. S.** (2016). *To Be Specific or Not: The Critical Relationship Between Hox And TALE Proteins.*
- Rezsohazy, R., Saurin, A. J., Maurel-Zaffran, C. and Graba, Y.** (2015). Cellular and molecular insights into Hox protein action. *Development* **142**, 1212–1227.
- Slattery, M., Riley, T., Liu, P., Abe, N., Gomez-Alcala, P., Dror, I., Zhou, T., Rohs, R., Honig, B., Bussemaker, H. J., et al.** (2011). Cofactor binding evokes latent differences in DNA binding specificity between hox proteins. *Cell* **147**, 1270–1282.
- Solovei, I., Wang, A. S., Thanisch, K., Schmidt, C. S., Krebs, S., Zwerger, M., Cohen, T. V., Devys, D., Foisner, R., Peichl, L., et al.** (2013). LBR and lamin A/C sequentially tether peripheral heterochromatin and inversely regulate differentiation. *Cell* **152**, 584–598.
- Somech, R., Shaklai, S., Geller, O., Amariglio, N., Simon, A. J., Rechavi, G. and Gal-Yam, E. N.** (2005). The nuclear-envelope protein and transcriptional repressor LAP2 β interacts with HDAC3 at the nuclear periphery, and induces histone H4 deacetylation. *J. Cell Sci.* **118**, 4017–4025.
- Tsai, A., Muthusamy, A. K., Alves, M. R., Lavis, L. D., Singer, R. H., Stern, D. L. and Crocker, J.** (2017). Nuclear microenvironments modulate transcription from low-affinity enhancers. *Elife* **6**,.
- Wagner, N. and Krohne, G.** (2007). LEM-Domain Proteins: New Insights into Lamin-Interacting Proteins. *Int. Rev. Cytol.* **261**, 1–46.

Zeiske, T., Baburajendran, N., Kaczynska, A., Brasch, J., Palmer, A. G., Shapiro, L., Honig, B. and Mann, R. S. (2018). Intrinsic DNA Shape Accounts for Affinity Differences between Hox-Cofactor Binding Sites. *Cell Rep.* **24**, 2221–2230.

Zheng, X., Hu, J., Yue, S., Kristiani, L., Kim, M., Sauria, M., Taylor, J., Kim, Y. and Zheng, Y. (2018). Lamins Organize the Global Three-Dimensional Genome from the Nuclear Periphery. *Mol. Cell* **71**, 802-815.e7.

CHAPITRE 4

DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES

I. Déchiffrer et visualiser la régulation de la transcription par un complexe protéique sur ses séquences cibles *cis*-régulatrices

La régulation de la transcription, suite à la fixation des FT sur leurs séquences cibles, est un sujet central pour comprendre comment et pourquoi une cellule se différencie, que cela soit au niveau d'un tissu spécifique ou de l'organisme entier. A l'échelle de l'organisme, les observations phénotypiques permettent, de manière générale, de faire le lien entre caractère physique (visible à l'œil : morphologie, comportement etc.) et manifestation du génome au sein de la cellule (échelle nanométrique) (Chen et al., 2018). Par conséquent, il faut pouvoir considérer toutes les échelles de résolution pour avoir une vue d'ensemble des mécanismes. Plusieurs études génétiques pionnières ont été capables de d'analyser ce lien, mais les mécanismes précis, à l'échelle d'une séquence génomique cible, ne pouvaient être visualisés avec les technologies de l'époque (Keleher et al., 1988; Ryoo and Mann, 1999; Scheidereit et al., 1987).

Aujourd'hui, le développement exponentiel des techniques de microscopie permet de décoder et de visualiser ces mécanismes, et ceci au sein d'un organisme vivant. En effet la microscopie super-résolution permet d'atteindre l'échelle nanométrique du génome et des composants protéiques associés (Gomez-Lamarca et al., 2018). Cependant, les techniques actuelles permettent la visualisation de la fixation d'un unique FT sur sa séquence cible. Or, la régulation de la transcription repose sur l'association de complexes protéiques sur les séquences génomiques cibles. Par exemple, la fixation d'un complexe binaire Hox/Exd sur une séquence cible est indispensable pour la spécificité d'action des protéines Hox. Ceci illustre la nécessité de développer des outils permettant de visualiser non pas une protéine, mais un complexe protéique, sur les séquences *cis*-régulatrices, à l'échelle nanométrique (quantification précise) et *in vivo* (conditions physiologiques). C'est cet objectif que j'ai essayé d'atteindre pendant mon travail de thèse.

I.1. Quantification de l'enrichissement de complexes binaires sur des séquences cis-régulatrices cibles au sein d'un échantillon épais

I.1.1. Une nouvelle méthode pour visualiser et quantifier des interactions protéine-protéine sur leur séquence génomique cible

I.1.1.1. En résolution confocale

La combinaison du système ParB/*INT* et de la BiFC a permis de quantifier en microscopie confocale l'enrichissement des complexes Hox/Exd sur l'enhancer *fkh250*.

Les images BiFC des complexes Hox/Exd dans les glandes salivaires montrent une alternance entre les bandes de BiFC et de DAPI (Figure 51A et A'). Ce profil a déjà été montré pour plusieurs protéines Hox sur les chromosomes polytènes de glandes salivaires (Gabler et al., 2005) ou de corps gras de larves de drosophile (Marchetti et al., 2003). J'ai montré que le signal BiFC Scr/Exd est faible en comparaison du signal Ubx/Exd (Figure 51A, A' et B). Après la formation des glandes salivaires au stade embryonnaire, une boucle de rétroaction négative impliquant Scr, Exd et Hth, provoque la disparition de la protéine Scr. Elle est donc absente au stade larvaire (Henderson and Andrew, 2000). Par conséquent, la surexpression de la protéine Scr et du cofacteur Exd dans les glandes salivaires larvaires pourrait relancer la production de la protéine Scr « froide ». Si tel est le cas, celle-ci pourrait entrer en compétition avec la fusion VC-Scr pour former les complexes Scr/Exd. Cela expliquerait le plus faible signal BiFC Scr/Exd. La protéine Ubx n'étant pas exprimée de manière endogène dans les glandes salivaires, il n'y a aucune compétition, d'où un signal BiFC plus intense. Les bandes intenses du signal Scr/Exd pourraient montrer une plus grande spécificité pour certains loci, donc potentiellement des loci qui sont normalement régulés par ces complexes. En revanche, les complexes Ubx/Exd semblent être dispersés de manière homogène sur l'ensemble des chromosomes, suggérant une liaison plus « aspécifique » et généralisée par rapport aux complexes Scr/Exd. Ces observations semblent donc cohérentes avec le rôle endogène et spécifique des complexes Scr/Exd dans les glandes salivaires.

L'enrichissement en BiFC des complexes Hox/Exd mesuré sur les différents enhancers récapitule les résultats obtenus *in vitro* (Ryoo and Mann, 1999). L'enhancer *fkh250* a une préférence de fixation pour les complexes Scr/Exd en comparaison des complexes Ubx/Exd (Figure 52A-C). Sur l'enhancer *fkh250* muté au niveau des sites de fixation de Scr et Exd, les quantifications de fluorescence montrent que l'affinité des hétérodimères Scr/Exd est réduite de moitié (Figure 52D-F). Enfin, les complexes Scr/Exd et Ubx/Exd se fixent de manière semblable sur l'enhancer *fkh250*_{CONS} qui contient un site consensus de liaison pour les complexes Hox/Exd (Figure 52G-I).

Lors de l'acquisition des images, j'ai remarqué la présence de plusieurs bandes rouges par noyau pour les enhanceurs *fkh250* et *fkh250_{CONS}* (**Figure Supplémentaire 2B**). Cela n'est pas étonnant dans ce contexte de chromosomes polytènes. En effet, ces chromosomes géants ont jusqu'à 1000 copies d'ADN endorépliqué, ce qui est à l'origine du profil en bande des différentes régions chromosomiques (Hales et al., 2015). De plus, il y a toujours une bande majoritaire avec une oligomérisation importante de la protéine ParB1-mCherry sur les séquences *INT1*, et une ou plusieurs bandes avec une intensité plus faible (**Figure Supplémentaire 2B**). Pour l'enhancer *fkh250_{MUT}* il est rare de visualiser plusieurs bandes (**Figure Supplémentaire 2B'**). En effet, l'intensité de la bande mCherry est très faible en comparaison aux deux autres enhanceurs. La différence d'intensité entre l'enhancer *fkh250_{MUT}* et les deux autres enhanceurs pourrait s'expliquer par l'accessibilité de la séquence. L'enhancer muté pourrait être apparenté à une région de chromatine fermée, rendant l'oligomérisation des protéines ParB1-mCherry plus difficile. Il est important de noter que l'enrichissement des complexes Hox/Exd sur les différents enhanceurs, n'est pas dépendante de l'intensité de la bande ParB1-mCherry. En effet, les bandes de faible intensité observées pour les enhanceurs *fkh250* et *fkh250_{CONS}*, ont une intensité équivalente (**Figure Supplémentaire 2B et B'**) à la bande du contexte *fkh250_{MUT}*. Pourtant, on observe des enrichissements significatifs (souvent plus fort que sur la bande majoritaire) (**Figure Supplémentaire 2B et B'**) des complexes Scr/Exd ou Ubx/Exd sur ces bandes de faible intensité des enhanceurs *fkh250* et *fkh250_{CONS}*.

L'ensemble de ces résultats montre tout de même la spécificité de ParB1 pour une reconnaissance spécifique et exploitable des séquences *INT1 in vivo*, rendant cet outil exploitable pour visualiser les séquences cis-régulatrices. Par conséquent, cette méthode pourrait être adaptée à différents contextes biologiques où la fixation d'un complexe sur une séquence régulatrice n'a pas encore été démontrée. De plus, l'avantage de cette méthode est son adaptabilité à l'étude de la dynamique des complexes *in vivo*, ce qui n'est pas envisageable avec une méthode classique de ChIP-seq par exemple.

I.1.1.2. A l'échelle super-résolutive

Imagerie super-résolution et échantillons épais

Cependant, les calculs d'intensité de fluorescence et leur comparaison ne sont pas toujours précis, ce qui peut provoquer une grande variabilité dans les quantifications. En effet, la microscopie confocale ne permet pas de localiser précisément la source de la fluorescence. En microscopie Lightning, la résolution est de 150 nm environ. Ceci signifie que chaque molécule fluorescente est représentée par un halo de 150 nm de rayon. Cela réduit considérablement la précision des mesures de fluorescence. Sur des structures volumineuses comme les

noyaux de glandes salivaires, chaque locus mesure environ 5 μm . Dans ce cas, le rayon de 150 nm est relativement négligeable et les quantifications d'intensité suffisent pour calculer l'enrichissement des complexes BiFC sur l'enhancer. La précision des mesures pourrait être améliorée par la microscopie SIM ou STED, mais le signal BiFC est difficilement compatible avec ces techniques de microscopie. En effet, ces deux méthodes requièrent de fortes intensités laser qui peuvent mener à un photobleaching prématuré de la Vénus. En revanche, dans un contexte tissulaire dans lequel les noyaux mesurent environ 5 μm et ne possèdent pas de chromosome polytènes, comme dans l'embryon de drosophile, la taille de l'enhancer est réduite à un point d'environ 500 nm de diamètre (**Figure Supplémentaire 2C**). La taille du locus est divisée par 10. Il est donc nécessaire d'améliorer la résolution d'un facteur 10 pour atteindre le même objectif. Ceci est possible grâce à la microscopie SMLM, et plus particulièrement la microscopie PALM.

Mes résultats en microscopie PALM ont montré la possibilité de visualiser la protéine Ubx à l'échelle super-résolutive (**Figure 53A**). L'analyse des localisations individuelles a permis de mettre en évidence des clusters d'un rayon de 4 μm . La taille des clusters correspond au diamètre de la fibre d'ADN des chromosomes polytènes (Deng et al., 2005) en vue transversale. Des foci intenses sont visibles au sein de ces clusters. Ces foci de Ubx à l'échelle super-résolutive ont déjà été décrits dans les noyaux d'embryons de drosophile, mais dans des conditions d'expansion (Tsai et al., 2017). Une autre analyse de clustering, focalisée sur les foci de Ubx, pourrait révéler leur taille et la densité de molécules au sein de ces sous-clusters.

Par la suite, j'ai adapté la BiFC-PALM pour imager les complexes Hox/Exd au sein des noyaux de glandes salivaires. Auparavant, la BiFC-PALM a permis la visualisation de complexes au sein d'échantillons fins : cellules en culture (Nickerson et al., 2014) et bactéries (Liu et al., 2014a). Mes résultats ont montré la possibilité d'utiliser la BiFC-PALM dans un tissu plus épais (**Figure 53B-E**). Cependant, il reste difficile de réunir toutes les conditions pour imager un noyau avec une densité de molécules suffisantes et assez proche de la surface (maximum 30 μm). En effet, la majorité des noyaux se trouvent à une distance supérieure à 30 μm au-dessus de la surface. Cependant, au-delà de cette distance seuil, le rapport signal sur bruit est trop faible pour détecter assez de complexes Hox/Exd. Un système optique permettant d'appliquer la microscopie SMLM à une plus grande profondeur faciliterait la procédure.

Dans la littérature, une méthode récente appelée oblique-plane SMLM (obSMLM) permet d'imager en profondeur dans un tissu (Kim et al., 2019). L'approche est basée sur la combinaison d'une illumination en feuillet de lumière (light-sheet microscopy) et d'imagerie SMLM. Ce système permet donc de faire des

sections optiques au sein de tissus ou de petits organismes modèles. Par exemple, la protéine kinase C alpha (PKC α) a été observée dans une coupe de rétine de souris, jusqu'à une profondeur de 66 μm avec une précision de localisation autour de 40 nm (Kim et al., 2019). L'imagerie deux-couleurs ou 3D est aussi possible, ce qui autoriserait la quantification de l'enrichissement de complexes BiFC sur leur séquence cible.

Avec le système optique classique, des résultats préliminaires montrent la possibilité de faire de la microscopie PALM deux-couleurs au sein des noyaux de glandes salivaires de drosophile (Figure 54). Les expériences faites en microscopie confocale doivent être répétées dans le contexte super-résolutif, pour garantir la fiabilité de la méthode. Notamment, les réglages d'alignement entre les différentes couleurs et les paramètres d'acquisition pour garantir un signal optimal dans chaque canal ne sont pas encore établis.

La microscopie super-résolution permet de détecter des structures nanométriques grâce à des systèmes optiques performants. Le problème peut également être vu sous un autre angle. Au lieu d'améliorer les techniques d'imagerie, il est aussi possible de transformer des structures nanométriques en structures micrométriques dépassant la limite de la diffraction. Cette méthode est appelée microscopie par expansion (Min et al., 2020; Truckenbrodt et al., 2019; Vanheusden et al., 2020). Cette technique a déjà été utilisée dans les embryons de drosophile pour imager la protéine de fusion HaloTag-Ubx (Tsai et al., 2017). L'expansion a permis de multiplier par quatre la taille de l'embryon. Les noyaux initiaux ont une taille de 5 μm environ mais après traitement, les noyaux mesurent environ 20 μm . Cette taille est encore légèrement inférieure à celle des noyaux des glandes salivaires mais permettrait de faciliter l'imagerie des complexes BiFC au sein des noyaux d'embryons de drosophile.

Imagerie super-résolution in vivo

Les résultats présentés ci-dessus sont issus d'échantillons fixés, par conséquent il est impossible de suivre la dynamique des complexes dans le noyau. De plus, la fixation chimique avec du formaldéhyde peut créer des artefacts sur les structures cellulaires (Maeshima et al., 2020). Auparavant, le problème était pertinent uniquement en microscopie électronique, mais avec les avancées récentes de la microscopie super-résolution, les artefacts sont aussi détectables en microscopie SIM, STORM, PALM et STED (Maeshima et al., 2020). Par exemple, pour l'imagerie de l'ADN, la fixation chimique n'immobilise pas complètement les nucléosomes (Maeshima et al., 2020; Nagashima et al., 2019; Nozaki et al., 2017). Par conséquent, le mouvement local des nucléosomes au cours de l'acquisition (souvent longue en microscopie SMLM) pourrait former de « faux clusters » qui correspondent en réalité au mouvement d'une seule molécule.

Pour éviter cela, il serait donc intéressant de répéter les expériences précédentes *in vivo* pour visualiser les dynamiques de fixation des complexes au niveau de l'enhancer cible. Le tracking de complexes en BiFC-PALM a déjà été réalisé avec la PF mEOS3.2, au sein de la bactérie *E.coli* (Liu et al., 2014a). La PAmCherry1 n'est cependant pas le meilleur candidat pour le sptPALM. En effet, les molécules ont un seul cycle d'activation/excitation puis sont photobleachées (Subach et al., 2010). Dans 80% des cas, les trajectoires enregistrées sont basées sur deux ou trois images successives et donc très courtes. En dépit de cela, elle a déjà été utilisée pour des expériences de sptPALM (Subach et al., 2009b). Ainsi, pour tester la faisabilité de la méthode, l'utilisation de la PAmCherry1 serait suffisante et ne demanderait donc pas l'élaboration de nouvelles protéines de fusion.

Enfin, une méthode récente appelée RESOLFT (Introduction, (Ha et al., 2016)) serait, d'après moi, un outil adapté pour étudier la dynamique des IPPs lors de leur fixation à une séquence cible, à l'échelle super-résolutive. Cependant, cette méthode ne permet pas de compter le nombre exact de complexes sur la séquence cible. La question d'intérêt (quantification des complexes ou analyse de la dynamique) demande donc de bien choisir sa méthode car aucune ne peut actuellement répondre à tous les critères de manière convaincante.

II.2. Expression endogène et microscopie super-résolution

La quantification de l'enrichissement des hétérodimères Hox/Exd sur l'enhancer *fkx250* dans les glandes salivaires a été réalisée dans des conditions de surexpression des différentes constructions. De plus, le stade larvaire observé ne correspond pas au stade physiologique de la régulation du gène *fkx* par les complexes Scr/Exd. Malgré des résultats cohérents avec les expériences *in vitro* et de régulation *in vivo* réalisées par Ryoo et Mann (Ryoo and Mann, 1999), il serait intéressant d'étendre la méthode à des conditions plus physiologiques, soit avec une expression endogène des constructions.

Le système CRISPR/Cas9 ne cesse de s'améliorer pour insérer des mutations dans le génome, mais l'insertion de fragments (knock-in) restait difficile. Récemment, une avancée dans la méthode permet d'insérer facilement et à faible coût des fragments d'ADN à un locus précis. Auparavant, cette méthode utilisait des bras d'homologie de plus d'1 kb pour insérer un fragment d'ADN d'intérêt, maintenant, des bras d'homologie de 100 nucléotides flanquant l'ADN donneur suffisent pour l'insertion (Kanca et al., 2019). Un ARNg qui n'a pas de site de reconnaissance dans le génome de la drosophile est inséré à chaque extrémité de la cassette. Cela permettra la libération de la cassette après la coupure par la protéine Cas9. Les bras d'homologie permettent de cibler le locus d'intérêt et d'insérer la cassette par un mécanisme de recombinaison homologue. La technique CRISPR pourrait ainsi

être utilisée pour, dans un premier temps, insérer les séquences *INT1* au niveau du locus endogène de l'enhancer *fk250*. L'expression de ParB1-mCherry et des constructions BiFC Hox/Exd permettrait ainsi de visualiser l'enrichissement des complexes sur l'enhancer endogène. Il serait également possible de muter l'enhancer endogène par une méthode de CRISPR classique et ainsi d'avoir accès aux enhancers *fk250^{MUT}* et *fk250^{CONS}* au niveau du locus endogène. Cependant, il faudrait maintenir la lignée hétérozygote et vérifier la viabilité de ces mutations. Ces modifications nous permettraient de faire la même étude, *in vivo* et dans un contexte physiologique adapté, c'est-à-dire au sein des placodes salivaires présentes au stade embryonnaire. Le système UAS-Gal4 pourrait aussi être mieux contrôlé (en jouant sur les températures et/ou le système Gal80), ce qui permettrait d'exprimer les constructions à un niveau se rapprochant des conditions endogènes. Les constructions BiFC Hox et Exd pourraient également résulter de modifications endogènes par CRISPR. Une construction CRISPR GFP-Ubx a par exemple été réalisée par notre collaborateur (groupe de I. Lohmann, COS, Allemagne).

Un système d'expression endogène des différentes constructions représenterait un avantage considérable pour étudier la fixation d'un complexe protéique sur sa séquence cible en « conditions réelles ». Cependant, cette adaptation semble difficilement transposable à la microscopie super-résolution. En effet, les trop faibles niveaux d'expressions ne permettraient pas une densité suffisante de molécules pour la détection en microscopie PALM. En revanche, la qualité des acquisitions pourrait être améliorée, par exemple grâce aux différentes alternatives décrites précédemment (obSMLM, RESOLFT). L'imagerie super-résolution dans les échantillons épais ne cesse de se développer, il sera donc certainement possible de trouver une technique adaptée à ce système endogène.

Une autre alternative se présente si l'on ne considère pas la BiFC-PALM dans le processus. En effet, la densité de molécules étant un paramètre limitant pour la microscopie PALM, la BiFC-PALM n'est pas un avantage dans des conditions endogènes. Il faudrait donc une méthode de visualisation des IPPs qui permettrait de conserver une densité suffisante de molécules fluorescentes. Comme évoqué dans l'introduction, il est possible de détecter des IPPs par microscopie SMLM deux-couleurs. Dans ce cas, la protéine Hox pourrait être fusionnée au HaloTag et le cofacteur Exd au SNAP-Tag. Ce type de combinaison a déjà été utilisé en microscopie STED deux-couleurs (voir Introduction, (Bottanelli et al., 2016)). De plus, en raison de la forte brillance des marqueurs couplés au ligand des différents Tag, la détection d'une faible densité de molécules devient possible. En effet, une protéine bactérienne endogène (nombre de copies par cellule <7) en fusion avec le HaloTag a été détectée avec une efficacité supérieure à 80% (Lepore et al., 2019). Avec ce système, les interactions entre les protéines Hox et Exd seraient représentées par une co-localisation de deux marqueurs fluorescents (rouge et rouge lointain par exemple), et l'enhancer *fk250* endogène serait localisé

grâce à l'oligomérisation des protéines ParB1-Dronpa sur les séquences *INT1* inséré en amont de l'enhancer. En pratique, cela reste un défi car la microscopie SMLM trois-couleurs a seulement été développée au sein d'échantillons fixés (Nahidiazar et al., 2016). De plus, en fonction de la dynamique des molécules observées, une imagerie simultanée pourrait être indispensable, ce qui est également un défi technique. Dans le cas de l'enhancer *fkh250*, sur une échelle de temps de 30 minutes environ, la mobilité de la séquence devrait être assez restreinte, par conséquent ce canal pourrait être imagé indépendamment des deux autres couleurs.

II.3. Observation simultanée du locus génomique et de la transcription associée.

Observer et quantifier l'enrichissement de complexes sur un enhancer ne permet pas de déterminer si cette fixation est liée à la transcription du gène associé. Pour déchiffrer la régulation de la transcription dans son ensemble, il est important de visualiser la fixation des FTs en association avec l'activation ou la répression de la transcription. En 2018, Chen et al. (Chen et al., 2018) ont imagé un locus génomique avec le système ParB/INT, et la distance promoteur-enhancer avec le système *MS2/PP7*. En effet, il est possible de suivre la transcription d'un gène en temps réel, grâce à l'insertion d'une séquence *MS2* au niveau du locus endogène. Lors de la transcription du gène, des ARN boucles se forment et créent une plateforme pour la protéine MCP fusionnée à une protéine fluorescente. Dans notre cas, il serait possible d'insérer les séquences *MS2* et *INT1* au niveau du gène *fkh* endogène, par CRISPR. L'enhancer *fkh250* serait marqué en rouge par les protéines ParB1-mCherry, les complexes en vert avec la BiFC Hox/Exd basée sur la Vénus et enfin la transcription avec la protéine MCP fusionnée à une protéine fluorescente dont le spectre d'émission se situerait dans le rouge lointain, comme mKate2 (Shcherbo et al., 2009) ou mIRFP670 (Shcherbakova et al., 2016). En microscopie confocale Lightning, sur des échantillons vivants, il serait alors possible de visualiser l'enrichissement de fixation des complexes Hox/Exd sur l'enhancer *fkh250* et montrer si cet enrichissement est associé ou non à l'expression du gène *fkh* endogène. Ce contexte permettrait de montrer la faisabilité de la méthode. Par la suite, le système pourrait être étendu à un contexte peu connu ou inconnu pour déterminer certains acteurs de la régulation du gène d'intérêt dans un contexte endogène.

II. Les complexes Hox/LamC et la répression de l'autophagie dans les corps gras de drosophile

L'autophagie est un processus fondamental au cours du développement mais aussi dans l'organisme adulte. La dérégulation de l'autophagie est associée à plusieurs pathologies, dont différents types de cancers et maladies neurodégénératives (Gong et al., 2012; Jiang and Mizushima, 2014). Étonnamment, bien que l'induction de l'autophagie soit dépendante de l'expression des gènes *atg*, les mécanismes moléculaires sous-jacents à leur régulation transcriptionnelle restent très mal compris. Chez la drosophile, il a été montré que les protéines Hox sont impliquées dans la répression de l'autophagie dans les corps gras de drosophile (Banreti et al., 2014). Cependant, le mode d'action moléculaire n'est pas connu.

Nous nous sommes basés sur ces recherches pour déchiffrer les mécanismes de la régulation transcriptionnelle des gènes *atg* par les protéine Hox, au sein des corps gras de drosophile. Des expériences d'immuno-marquage ont montré une distribution en anneau des différentes protéines Hox, à l'intérieur des noyaux du corps gras (**Chapitre 3, Manuscrit, Figure 1**). Cette localisation particulière nous a incité à chercher des partenaires associés à la matrice nucléaire. En effet, un crible ARNi nous a permis de mettre en évidence deux acteurs impliqués dans l'autophagie et appartenant à la lamina nucléaire : les lamines B et C. De plus, outre le marquage intense de la LamC au niveau de l'enveloppe nucléaire, celui-ci diffuse dans le même anneau que Ubx (**Chapitre 3, Manuscrit, Figure 1**) et colocalisent partiellement (**Chapitre 3, Manuscrit, Figure 4**). La diffusion de la LamC dans le nucléoplasme est un phénomène connu (Bronshtein et al., 2015; Dechat et al., 2000; Dechat et al., 2010). Par la suite, des expériences de BiFC ont révélé un potentiel d'interaction entre la protéine Ubx et la LamC (**Chapitre 3, Manuscrit, Figure 2**). Cela a été confirmé par une approche génétique qui montre leur appartenance à une même voie de signalisation liée à l'autophagie (**Chapitre 3, Manuscrit, Figure 2**). Enfin, nous avons établi le lien direct entre les complexes Hox/LamC et la régulation des gènes *atg*, notamment *atg1*, grâce à l'étude de la localisation du locus génomique par FISH. Au stade larvaire « feeding » (L3F), lorsque l'autophagie est réprimée, le locus *atg1* est retenu en périphérie du noyau (**Chapitre 3, Manuscrit, Figure 3**). En revanche, au stade « wandering » (L3W), lorsque l'autophagie est déclenchée, le locus *atg1* est délocalisé vers le centre du noyau. De plus, des quantifications d'intensité de fluorescence montrent un enrichissement des complexes Ubx-LamC (visualisation par BiFC) sur le signal FISH *atg1*, en comparaison à un gène contrôle *Hsp83*, qui n'est pas contrôlé par ces complexes et toujours actif aux stades L3F et L3W (**Chapitre 3, Manuscrit, Figure 5**).

L'ensemble de ces résultats montre l'implication des complexes Ubx-LamC pour la répression des gènes *atg* dans les corps gras de larves de drosophile, au stade L3F. Cependant, le mécanisme de rétention des locus *atg* en périphérie nucléaire n'est pas encore élucidé. Nous avons observé que la suppression de la LamC (ARNi) n'impacte pas la localisation du locus (**Chapitre 3, Manuscrit, Figure 3**). Nous en avons déduit qu'elle n'était pas responsable de l'ancrage du locus en périphérie du noyau. Cependant, la condition LamC ARNi affecte la forme du noyau et pourrait biaiser les analyses de distances. En effet, les mesures de distances FISH-périphérie sont normalisées par le rayon théorique du noyau. Cette approche convient lorsque les noyaux sont sphériques, par exemple pour les analyses de distances entre le stade L3F et L3W. En revanche, si le noyau est déformé, le rayon théorique peut s'avérer différent du rayon réel qui passe par le signal FISH. Pour corriger la mesure de distance, il faudrait développer une nouvelle méthode d'analyse pour mesurer la position du signal FISH sur le rayon correspondant.

Pour déterminer si la protéine Ubx est responsable de l'ancrage en périphérie, nous avons surexprimé Ubx au stade L3W. A ce stade, les protéines Hox sont normalement activement exportées dans le cytoplasme pour être dégradées ((Duffraisse et al., 2019), en révision). Par conséquent, l'expression de Ubx à ce stade devrait maintenir la cellule à un stade L3F, et conserver la localisation périphérique du locus *atg1*. Or, les analyses de distance ne montrent pas de différence entre les noyaux sauvages L3W et les noyaux qui surexpriment la protéine Ubx. Comme pour la condition LamC ARNi, les noyaux des cellules surexprimant Ubx sont déformés. La même méthode d'analyse devrait être appliquée pour confirmer ou réfuter ces premières analyses. La surexpression de Ubx pouvant également saturer le système, il serait plus utile d'être dans des conditions mutantes pour les gènes Hox. Ces conditions sont cependant difficiles à atteindre car ce sont au moins 5 gènes Hox différents qui sont exprimés et capables de réprimer l'autophagie dans le corps gras de drosophile. Il faudrait ainsi trouver une condition permettant d'abolir l'ensemble des activités des protéines Hox. Mon équipe a justement montré que la présence des protéines Hox dans le noyau était dépendante de l'activité de dCBP, et qu'en absence de cette déacétylase les protéines Hox se retrouvaient exportées avec induction anticipée de l'autophagie au stade L3F ((Duffraisse et al., 2019), en révision). La condition *CBP-ARNi* pourrait ainsi mimer une perte généralisée des protéines Hox au stade d'intérêt. L'observation d'un locus *atg1* délocalisé vers le centre au stade L3F dans cette condition, favoriserait l'hypothèse d'un ancrage à la périphérie nucléaire Hox-dépendant. Dans ce cas, la LamC jouerait plutôt un rôle dans l'attraction de partenaires protéiques impliqués dans la répression transcriptionnelle, par exemple, des modificateurs épigénétiques comme l'histone dé-acétylase HDAC3 (Demmerle et al., 2013; Somech et al., 2005).

La distribution en anneau des protéines Hox et de la LamC a vraisemblablement une influence sur le mécanisme de répression des gènes *atg*. Au centre du noyau, le signal fluorescent des immunomarquages de Ubx et de la LamC est absent. Nous avons supposé que cette sphère interne pouvait correspondre au nucléole. Un marquage anti-fibrillarine (composant important du nucléole (Bersaglieri and Santoro, 2019), a confirmé cette hypothèse : le nucléole est l'exact complémentaire des marquages Ubx et LamC (diffusion) (**Figure Supplémentaire 4**). Plusieurs questions se sont donc posées. En particulier : est-ce que le nucléole est nécessaire pour le profil en anneau des protéines Hox et LamC ? Egalement, si c'est le cas, ce profil est-t-il nécessaire pour maintenir les loci *atg* en périphérie, et/ou enrichir les complexes Hox/LamC sur les loci *atg* ? Nous avons donc commencé à étudier le rôle de la fibrillarine (fib) dans la répression de l'autophagie par les protéines Hox. Les résultats étant encore préliminaires, ils sont volontairement présentés hors de l'article.

Nos premières données montrent que les cellules qui expriment l'ARNi contre la fibrillarine sont à un stade avancé d'autophagie, en comparaison aux cellules environnantes (stade L3F, **Figure Supplémentaire 4**). Un marquage anti-fib montre l'efficacité de l'ARNi (**Figure Supplémentaire 4**). Dans cette condition *Fib-ARNi*, nous avons aussi remarqué que le niveau d'expression de Ubx était fortement diminué, mais la distribution en anneau était toujours conservée (**Figure Supplémentaire 4**). La fibrillarine n'étant pas l'unique composant structural du nucléole, il se pourrait que d'autres protéines permettent de conserver/sauver l'intégrité du nucléole et ainsi préserver le profil en anneau. Dans ce contexte, l'inhibition d'autres composants du nucléole pourrait entraîner un phénotype plus drastique.

Par la suite, nous avons testé l'effet de la perte de la fibrillarine sur la localisation du locus *atg1*. Dans les clones *Fib-ARNi*, nos analyses montrent une délocalisation du locus *atg1* vers l'intérieur du noyau au stade L3F (**Figure Supplémentaire 4**). Deux hypothèses sont possibles : (1) la fibrillarine est impliquée, de manière directe ou indirecte, dans la localisation du locus *atg1* en périphérie nucléaire, (2) L'ARNi contre la fibrillarine impacte l'expression de toutes les protéines Hox qui ne sont alors plus en quantité suffisante pour permettre l'ancrage du locus *atg1* à la périphérie du noyau. Pour discriminer entre ces deux options, il serait intéressant de surexprimer la protéine Ubx dans un contexte *Fib-ARNi*, en combinaison avec un marquage du locus *atg1*. Dans ce cas, si la distance FISH-périphérie est similaire à une condition sauvage, l'hypothèse (2) serait la plus probable. Dans le cas inverse, la fibrillarine aurait un rôle « direct » dans la localisation du locus *atg1* au sein des noyaux de corps gras de drosophile. En effet, un marquage faible de la fib est visible en dehors du nucléole. Dans ce cas, ces molécules pourraient jouer un rôle dans la régulation du locus *atg1*.

Le projet Hox/LamC montre le rôle important de la matrice nucléaire pour aider les protéines Hox à réprimer correctement leurs gènes cibles *atg*. Bien que le contexte du noyau du corps gras de drosophile soit particulier, notamment avec cet anneau d'expression tout autour du nucléole, il est légitime de penser que des scénarios similaires existent dans d'autres contextes ; ce qui soulève encore une fois l'importance de considérer les mécanismes de régulation transcriptionnelle *in vivo*.

En conclusion, il serait intéressant de faire le lien entre mes deux projets de thèse. En effet, le projet super-résolution pourrait permettre la compréhension précise de la régulation des gènes *atg* par les complexes Hox/LamC. Des séquences *INT* pourraient être insérées au niveau du gène *atg1* ce qui permettrait de visualiser le locus endogène à l'échelle super-résolutive (ParB1-Dronpa). De plus, des lignées adaptées à la BiFC-PALM entre les protéines Hox et LamC sont déjà à disposition. Il serait donc possible de quantifier l'enrichissement des complexes Hox/LamC fixés sur le gène *atg1*. Une autre possibilité serait de suivre la transcription des gènes *atg* via le système *MS2/MCP*, en corrélation avec un enrichissement des complexes Ubx/LamC (BiFC) sur le locus marqué (ParB/INT), comme expliqué précédemment (résolution confocale Lightning).

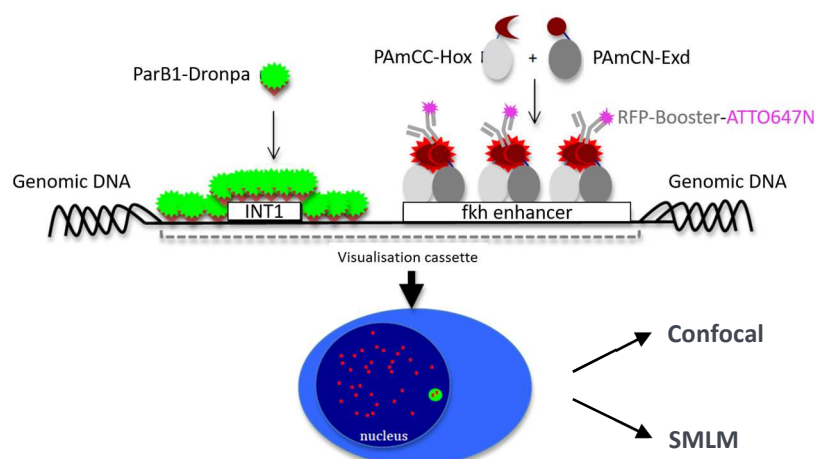
CHAPITRE 5

ANNEXES ET DONNEES SUPPLEMENTAIRES

Au cours de ma thèse, avant d'aboutir aux résultats présentés dans la partie Résultat, j'ai également testé d'autres modèles ou méthodes. Il me paraît important de les évoquer même si les expériences ne sont pas toutes concluantes, elles révèlent des informations utiles par la suite.

I. Visualisation des complexes BiFC sur l'enhancer *fkh250* via le nanobody RFP-booster

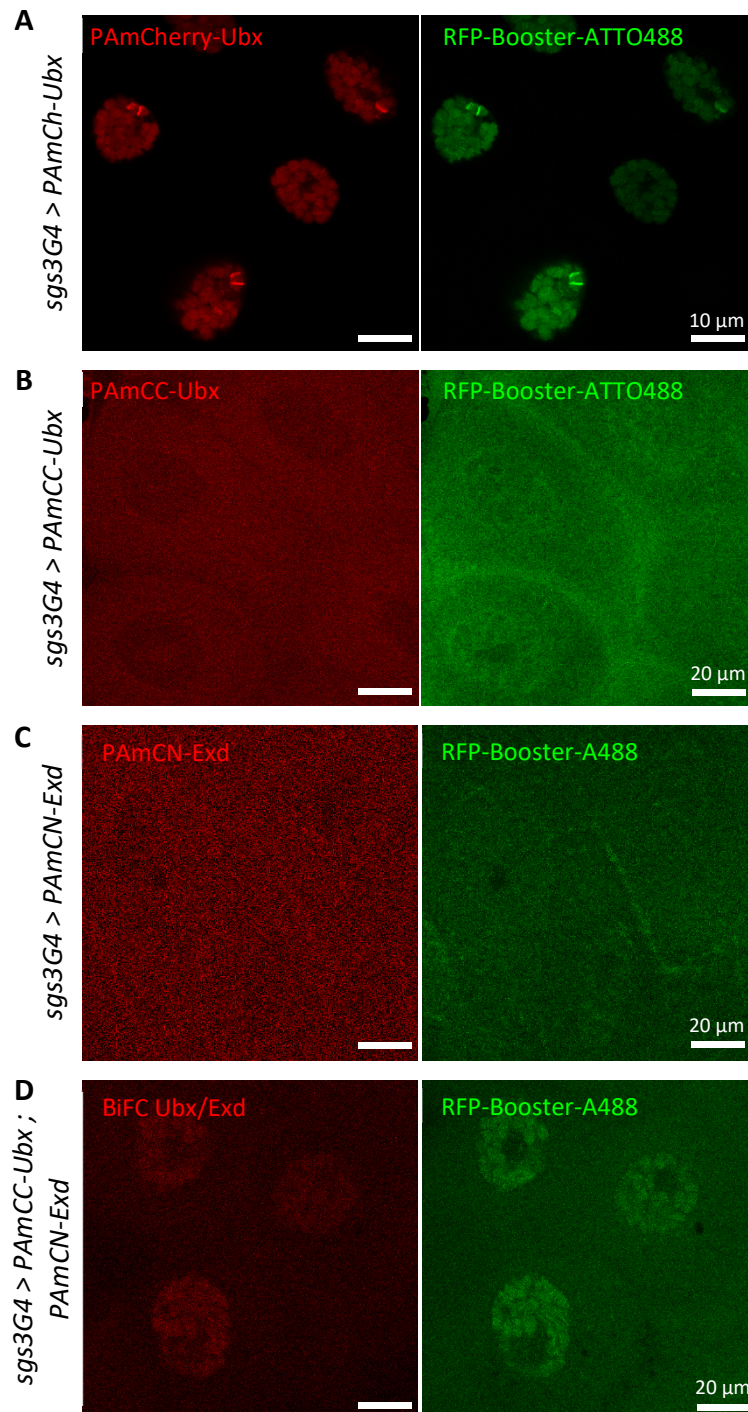
Les nanobodies sont de plus en plus utilisés car leur petite taille a de nombreux avantages comme une pénétration dans les cellules plus facile, marquage d'épitope « cachés » etc. De plus, en microscopie super-résolution, il est préférable d'utiliser des nanobodies puisque cela réduit la différence de localisation entre la protéine elle-même et le marquage fluorescent. Enfin, les nouveaux nanobodies anti-GFP et anti-RFP peuvent être couplés à un fluorophore, comme l'ATTO647N, les rendant directement adaptés pour la microscopie STORM. Il a également été montré que le nanobody anti-GFP reconnaît spécifiquement la Vénus reconstituée après interaction entre les deux partenaires fusionnés aux deux moitiés de la PF (Ariotti et al., 2018). J'ai donc testé si cela était également vrai pour le nanobody anti-RFP (appelé RFP-booster). Cela permettrait de visualiser les complexes PAmCCHox/PAmCNExd au confocal, mais aussi d'amplifier le signal BiFC-PALM en microscopie super-résolution. De plus, cela aurait permis d'avoir une comparaison directe entre les constructions observées en microscopie confocale et PALM. Et d'un point de vue plus pratique, un seul type de lignée à établir. Le schéma ci-dessous récapitule l'objectif :



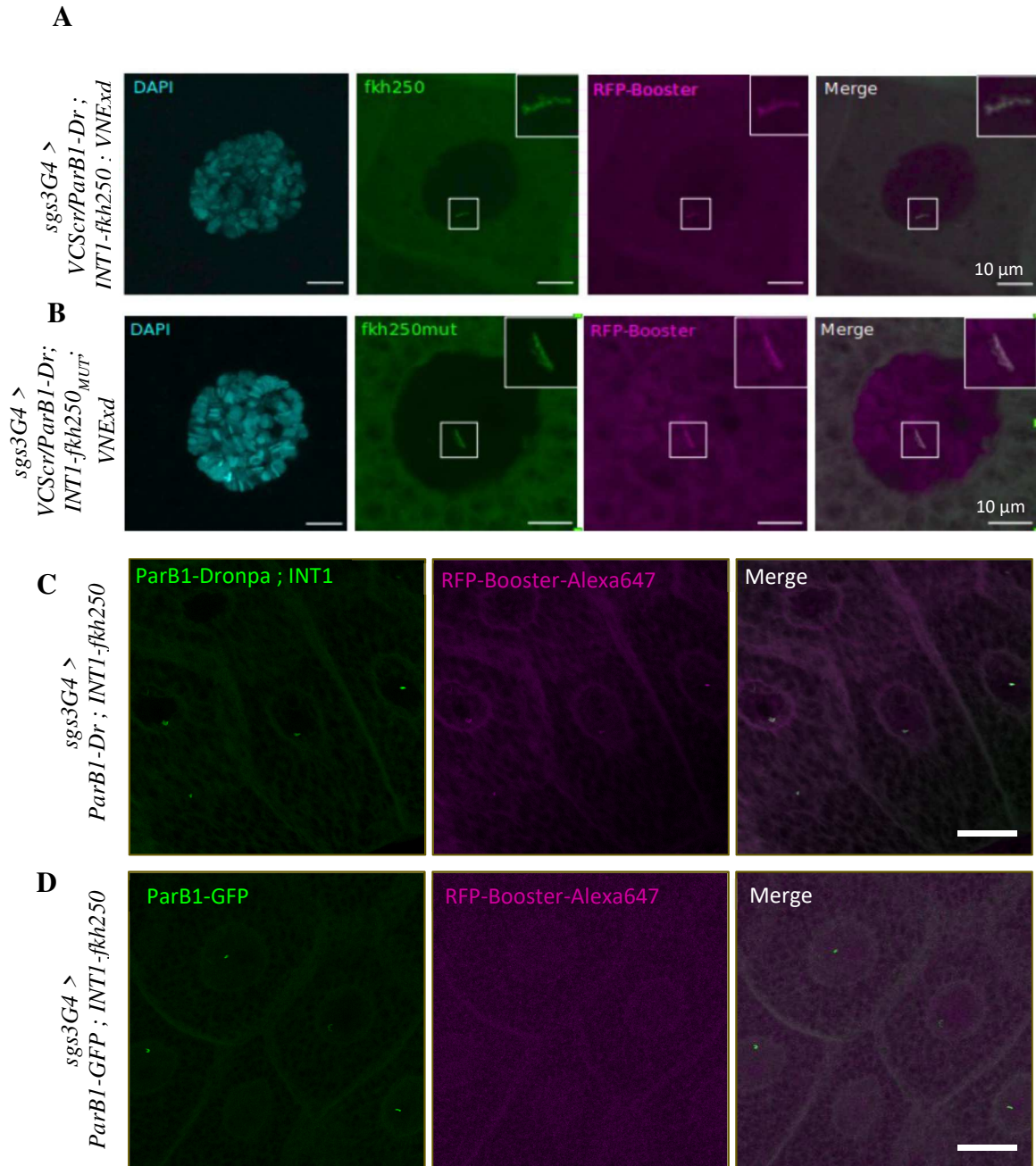
Le RFP-Booster reconnaît la mCherry mais il n'a jamais été testé pour la reconnaissance de la PAmCherry. C'est donc le premier test que j'ai réalisé. Le RFP-booster reconnaît la PAmCherry correctement (**Annexe, Figure 1A**). Le deuxième test concerne la capacité du RFP-booster à reconnaître spécifiquement la BiFC entre les protéines de fusion PAmCCHox et PAmCNExd, sans reconnaître l'un ou l'autre des fragments séparés de la PAmCherry. Après l'expression de chacune des constructions PAmCCHox ou PAmCNExd séparément, aucun signal du RFP-booster n'est observé (**Annexe, Figure 1B et C**). Cependant, lorsque les deux protéines de fusions sont co-exprimées dans les cellules de glandes salivaires, on observe un marquage nucléaire (**Annexe, Figure 1D**). Ce signal correspond à l'interaction entre les protéines Hox et Exd (**Annexe, Figure 1D**). Le RFP-booster peut donc être utilisé pour marquer spécifiquement la BiFC basée sur la PF PAmCherry.

Pour visualiser les complexes Hox/Exd au sein des glandes salivaires de drosophile, les constructions : PAmCCHox, PAmCNExd et ParB1-Dronpa ont été exprimées sous le contrôle du promoteur *sgs3Gal4* dans le contexte génétique *INT1-fkh250* ou *INT1-fkh250^{MUT}*. Après dissection et fixation des glandes salivaires, un immunomarquage a été réalisé avec le nanobody RFP-booster couplé à l'ATTO647N. Les noyaux de glandes salivaires ont ensuite été imagés par microscopie confocale (**Annexes, Figure 2**). Pour les deux conditions *fkh250* et *fkh250^{MUT}*, le marquage RFP-booster est pareillement enrichi au niveau de l'enhancer (**Annexes, Figure 2A et B**), ce qui n'est pas cohérent avec les conclusions de Ryoo et Mann (Ryoo and Mann, 1999). Le RFP-booster semble reconnaître le locus, indépendamment de la fixation des complexes Hox-Exd. Pour vérifier cette hypothèse, seule la construction ParB1-Dronpa a été exprimée dans le contexte génétique *INT1-fkh250*. En l'absence de complexes BiFC, l'enrichissement sur le locus *fkh250* est toujours visible (**Annexes, Figure 2C**). L'hypothèse s'avère être la bonne. Le RFP-booster reconnaît donc également la protéine ParB1 ou la PF Dronpa. Pour faire la distinction, la construction ParB1-GFP a été exprimée dans le même contexte génétique que précédemment. Dans ce cas, aucun enrichissement sur l'enhancer n'est visible (**Annexes, Figure 2C**). Cela indique que le RFP-Booster reconnaît également la protéine Dronpa.

En conclusion, ces expériences ont révélé la spécificité du RFP-booster pour reconnaître la BiFC basée sur la PAmCherry mais aussi la capacité du RFP-booster à reconnaître la PF Dronpa. Ce système n'est donc pas applicable à la quantification de l'enrichissement des complexes Hox/Exd sur l'enhancer *fkh250*.



Annexes, Figure 1 : Spécificité de reconnaissance de la BiFC (PAmCherry1) par le nanobody RFP-Booster. Des glandes salivaires exprimant PAmCh-Ubx (A), PAmCC-Ubx (B), PAmCN-Exd (C) ou PAmCC-Ubx et PAmCN-Exd (D) ont été disséquées puis fixées. Un immunomarquage avec le RFP booster a été réalisé dans chacune de ces conditions (panneaux de droite). Les images des panneaux de gauche ont été acquises avec des paramètres similaires à ceux utilisés pour la microscopie PALM : activation avec le laser 405 et excitation avec le laser 561.

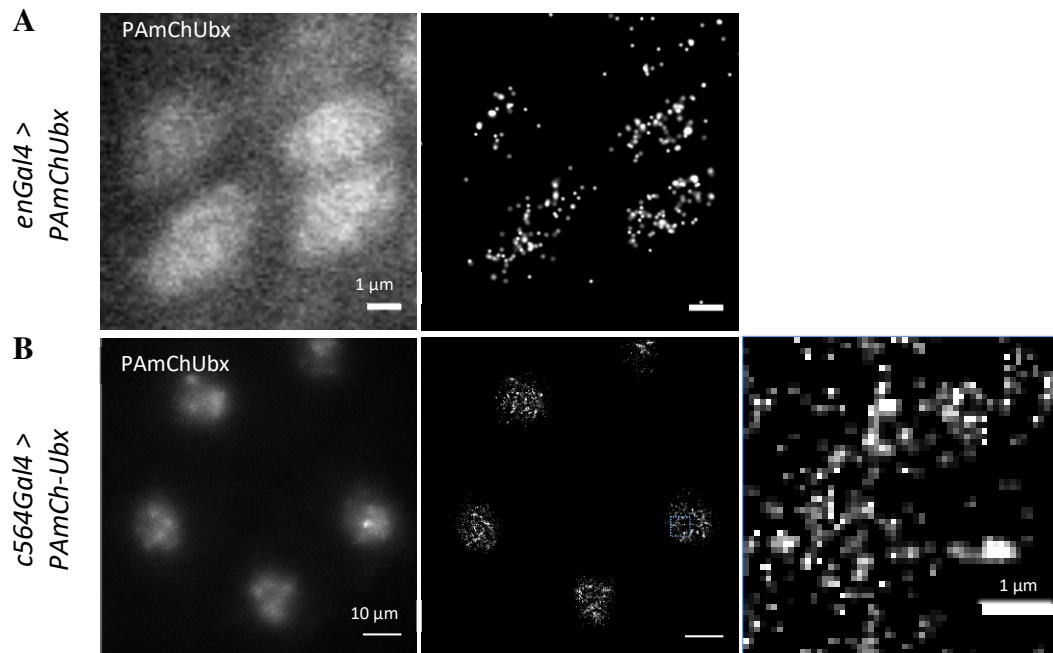


Annexes, Figure 2 : Le RFP-booster reconnaît la protéine photoconvertible Dronpa. Des glandes salivaires larvaires exprimant la BiFC Scr/Exd, la protéine de fusion ParB1-Dronpa et portant les séquences *INT1-fkh250* (A) ou *INT1-fkh250_{MUT}* (B) ont été disséquées puis fixées. La BiFC est représentée en magenta (RFP-booster) et les enhanceurs en vert (ParB1-Dronpa). Chaque image est une coupe optique d'un noyau au niveau de la bande d'un enhanceur. Les cadres blancs correspondent à l'image zoomée dans le coin en haut à droite de chaque image, ils sont centrés sur les enhanceurs. Les images ont été prises en microscopie confocale classique. (C) Les glandes salivaires expriment ParB1-Dronpa et portent la construction *INT1-fkh250*, pourtant, un signal magenta (RFP-booster) colocalise avec le signal vert de l'enhancer. Le RFP-Booster ne reconnaît pas seulement la complémentarité de la PAmCherry. (D) Les glandes salivaires expriment ParB1-GFP et portent la construction *INT1-fkh250*. Le signal magenta détecté précédemment n'est plus observé dans cette condition. Le RFP-booster semble donc être capable de reconnaître la protéine fluorescente Dronpa.

II. La microscopie PALM dans l'embryon et le corps gras de drosophiles

Au cours de ma thèse, j'ai pu étendre la microscopie PALM à d'autres tissus de drosophile : les corps gras et l'embryon. La PAmCh-Ubx a été exprimée au sein de l'embryon et dans les corps gras sous le contrôle des promoteurs *engrailed-Gal4* (*enGal4*) et *c564Gal4*, respectivement. Avant l'imagerie, les embryons ont été dévitellinisés à la main, pour éliminer la membrane vitelline fortement autofluorescente (voir **Mat&Met**). Dans les deux cas, il est possible de reconstruire des images super-résolution comparables à celles décrites pour les glandes salivaires (**Annexes, Figure3A et B**). Les noyaux sont visibles dans les deux cas. On peut noter une faible densité dans les noyaux d'embryon en raison d'un faible nombre d'images (5000) pour faire la reconstruction. D'autres acquisitions sont nécessaires pour déterminer s'il est possible d'étendre la BiFC-PALM à ces tissus. Dans l'embryon de drosophile, les noyaux sont presque 10 fois plus petits que ceux des glandes salivaires, la microscopie PALM serait donc plus avantageuse dans un environnement plus restreint. En effet, mesurer des intensités de fluorescence sur un enhancer dans un noyau de petite taille est limité, en résolution confocale. Alors qu'en microscopie PALM, compter le nombre de molécules est toujours possible. Il serait donc intéressant de poursuivre les expériences et d'adapter la BiFC-PALM aux embryons de drosophile.

Les corps gras contiennent de nombreuses gouttelettes lipidiques. Chacune d'entre elles constitue un changement d'indice de réfraction avec le cytoplasme environnant. Ce genre de tissu adipeux n'est pas recommandé pour l'imagerie à cause d'une diffraction de la lumière encore plus importante que dans d'autres tissus. Cependant, le signal détecté en PALM, avec la PAmCh-Ubx semble exploitable. De plus, le second projet de ma thèse est basé sur l'étude de la régulation de l'autophagie par les protéine Hox et la Lamine C dans les corps gras de drosophile. Il serait donc intéressant de poursuivre les essais pour établir les paramètres de visualisation des complexes BiFC Hox/LamC, dans ce tissu.



Annexes, Figure 3 : Microscopie PALM avec la PAmCherry1, dans l'embryon et les corps gras de drosophile. (A) La protéine de fusion PAmCh-Ubx est exprimée dans les embryons de Drosophile (driver *enGal4*). Le panneau de gauche montre quatre noyaux en épifluorescence. Le panneau de droite est l'image PALM correspondante. **(B)** La protéine de fusion PAmCh-Ubx est exprimée dans les corps gras de Drosophile (driver *c564Gal4*). Le panneau de gauche montre quatre noyaux en épifluorescence. Le panneau central correspond à l'image super-résolue (PALM). Une région zoomée sur un des noyaux est représentée dans le panneau de droite.

III. Données supplémentaires

III.1. Figures supplémentaires (Résultats et Discussion)

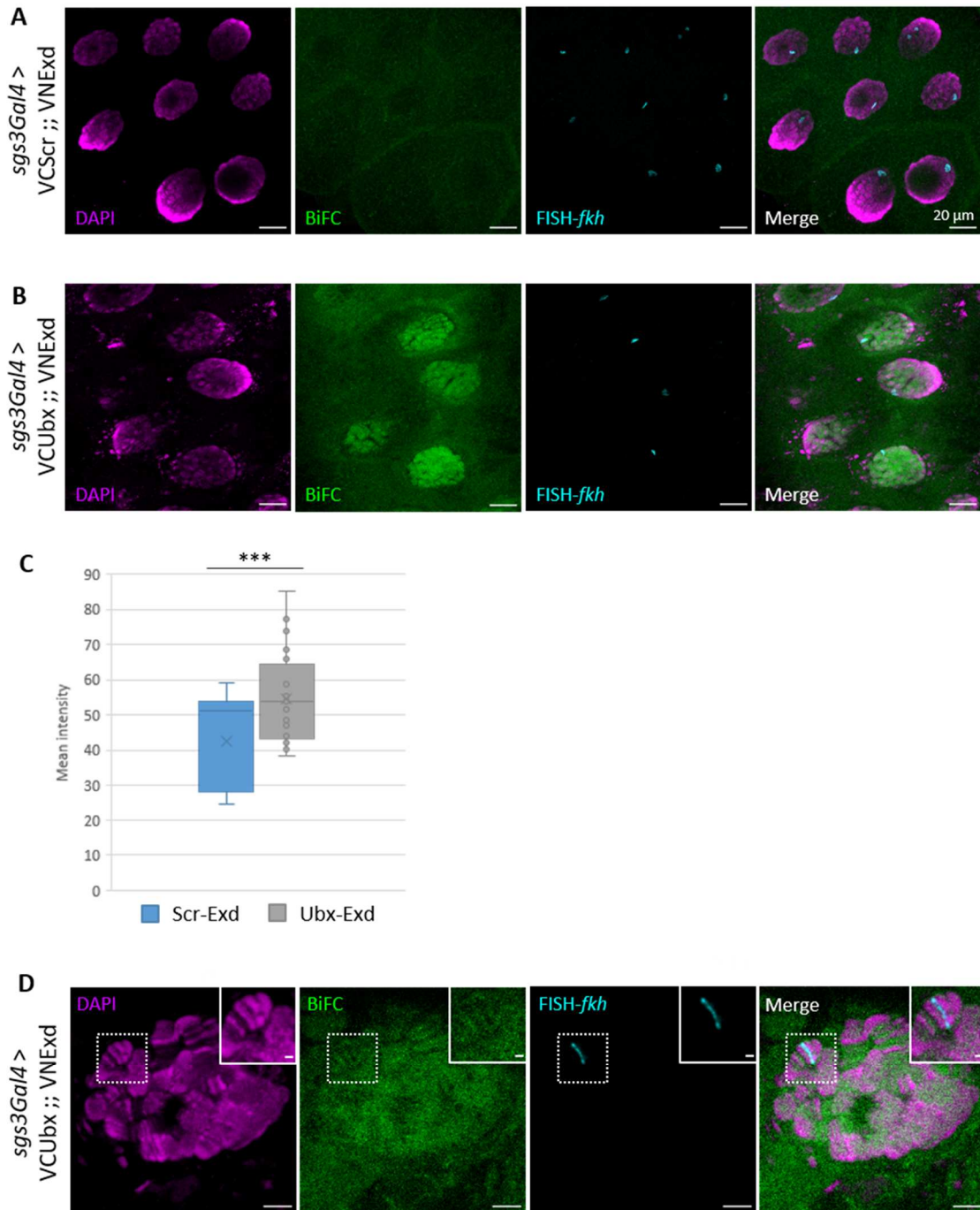


Figure Supplémentaire 1 : Incompatibilité FISH/BiFC. (A-B) Expériences FISH contre le gène *fkh* (cyan) en combinaison avec la BiFC Scr/Exd ou Ubx/Exd (vert), au sein des glandes salivaires larvaires. Le signal BiFC Scr/Exd ne résiste pas au traitement FISH, contrairement au signal Ubx/Exd. On note que l'intégrité des glandes salivaires est altérée. (C) Quantification de l'intensité de fluorescence moyenne dans les noyaux des glandes salivaires, pour la BiFC Scr/Exd et Ubx/Exd. (D) Image confocale correspondant à l'image Lightning de la Figure 2C des Résultats. Barres d'échelles = 5µm. (A-D) Les noyaux ont été marqués par le DAPI (magenta).

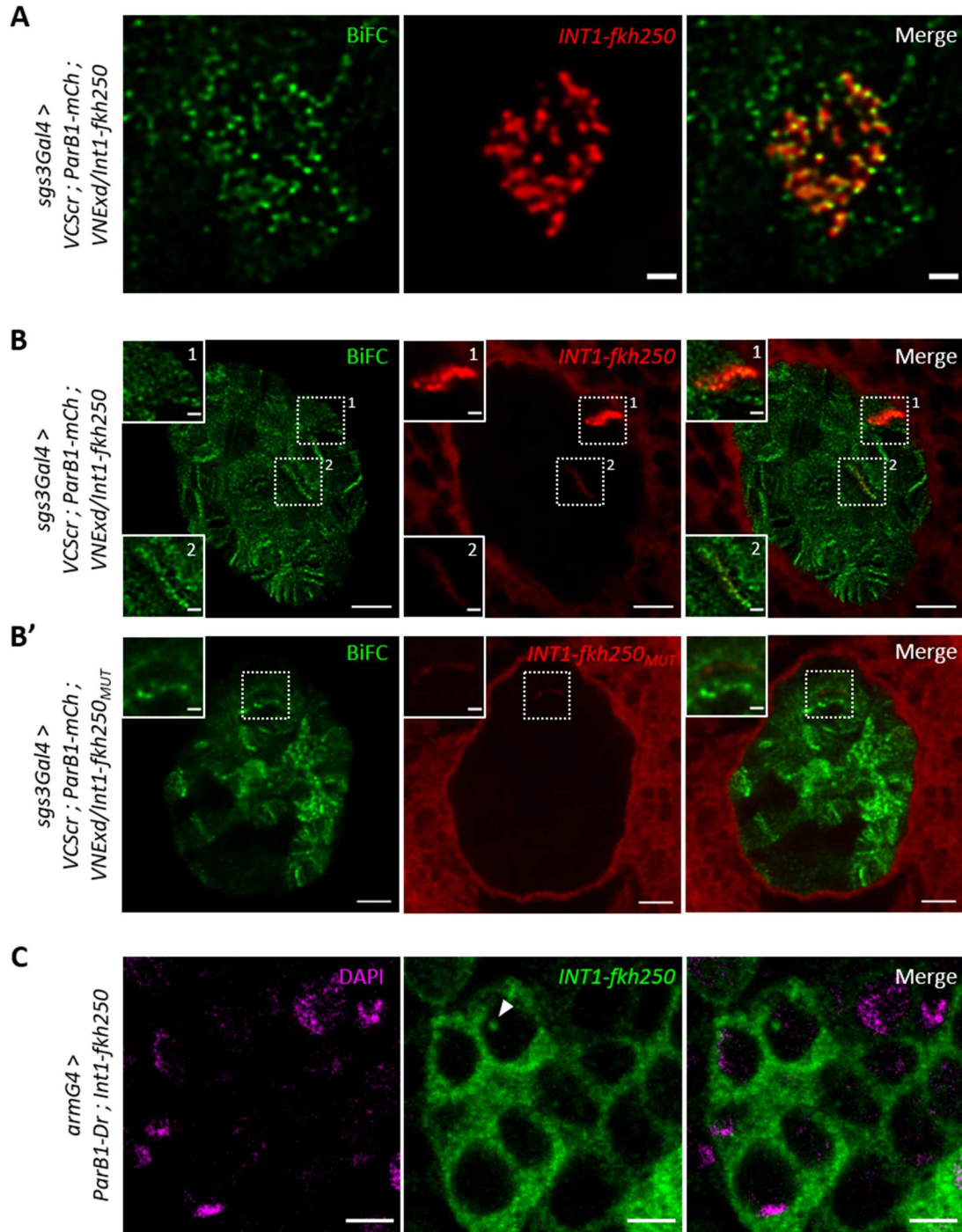


Figure Supplémentaire 2 : Différents aspects des enhanceurs INT1-fkh250. (A) Bande de l'enhancer *INT1-fkh250* (rouge) et BiFC Scr/Exd (vert) en vue transversale de la chromatine. Les différentes constructions sont exprimées sous le contrôle du driver *sgs3Gal4* (29°C). L'endoréplication des séquences *INT1* et des 10 répétitions de l'enhancer *fkh250* se traduit par les multiples clusters rouges et verts, respectivement. Barres d'échelle = 1 µm. (B) Illustration des multiples bandes de l'enhancer *INT1-fkh250* (rouge) et de l'enrichissement BiFC (vert) correspondant. La bande 1 (carré blanc pointillé et numéroté 1) est très intense en comparaison à la bande 2 (carré blanc pointillé et numéroté 2). La bande peu intense montre un enrichissement du signal BiFC que la bande intense (encombrement stérique ?). (B') Illustration de la faible intensité des bandes *INT1-fkh250_{MUT}*. L'intensité rouge est équivalente à l'intensité de la bande 2 de *INT1-fkh250*. Cependant, aucun enrichissement du signal BiFC Scr/Exd n'est visible. Barres d'échelle = 5 µm ou 1 µm pour les grossissements. (C) Enhancer *INT1-fkh250* observé dans un noyau d'embryon de drosophile. La protéine ParB1-Dronpa est exprimée sous le contrôle du driver *armadillo-Gal4* (*armGal4*). La flèche blanche indique la localisation de l'enhancer. Les noyaux sont marqués par le DAPI (magenta). Barre d'échelle = 3 µm.

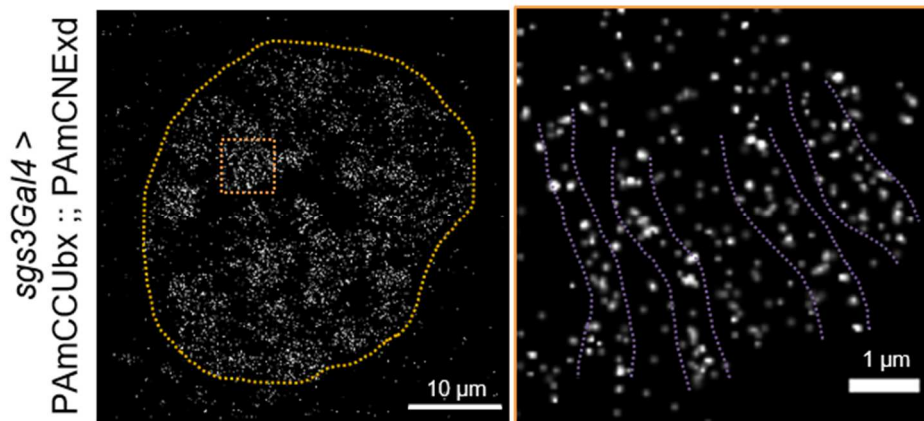


Figure Supplémentaire 3 : La microscopie BiFC-PALM est aussi applicable pour les complexes Scr/Exd. Les complexes Scr/Exd individuelles sont visibles dans le noyau des glandes salivaires. L'organisation des panneaux est identique à celle de la Figure 5B des Résultats.

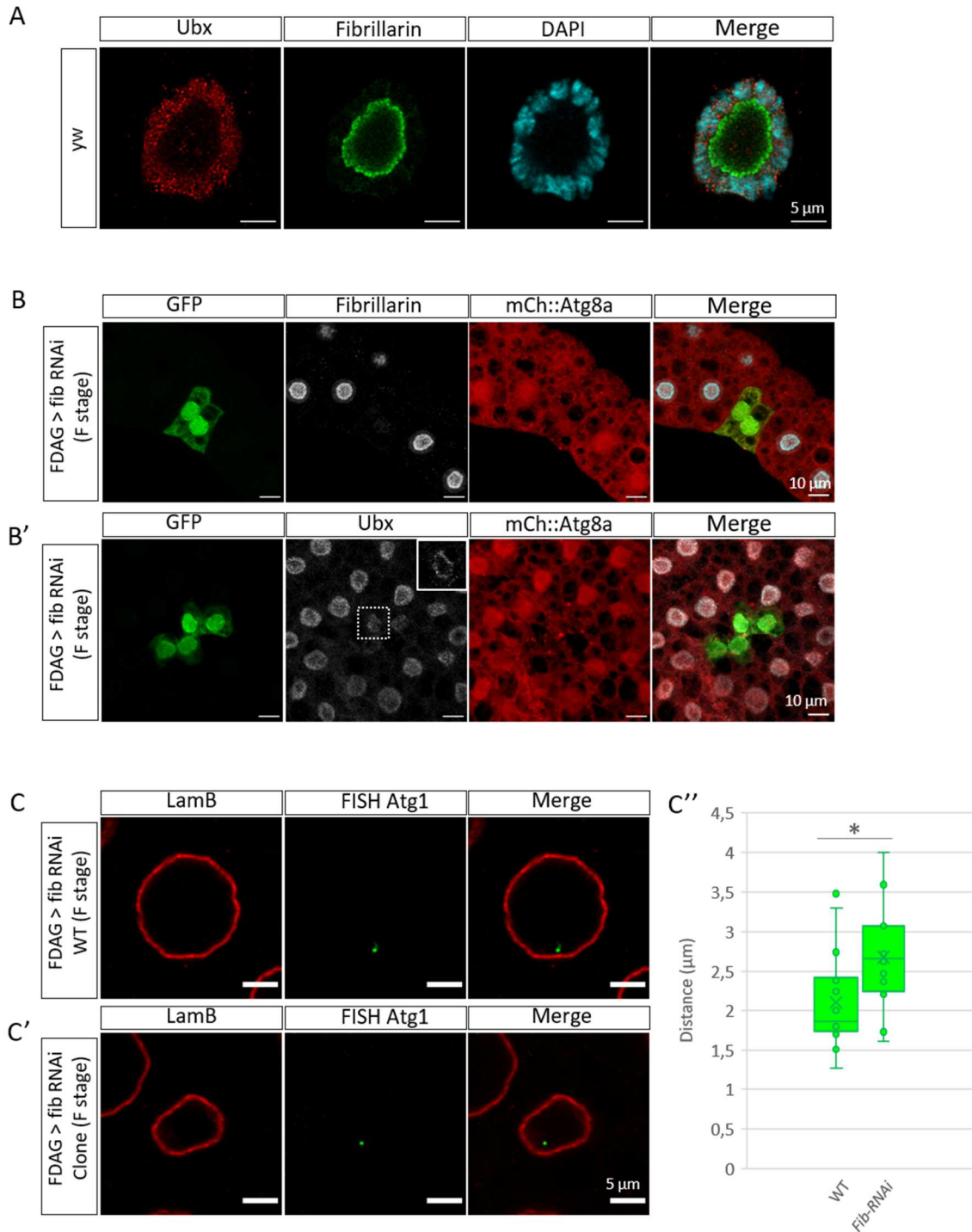
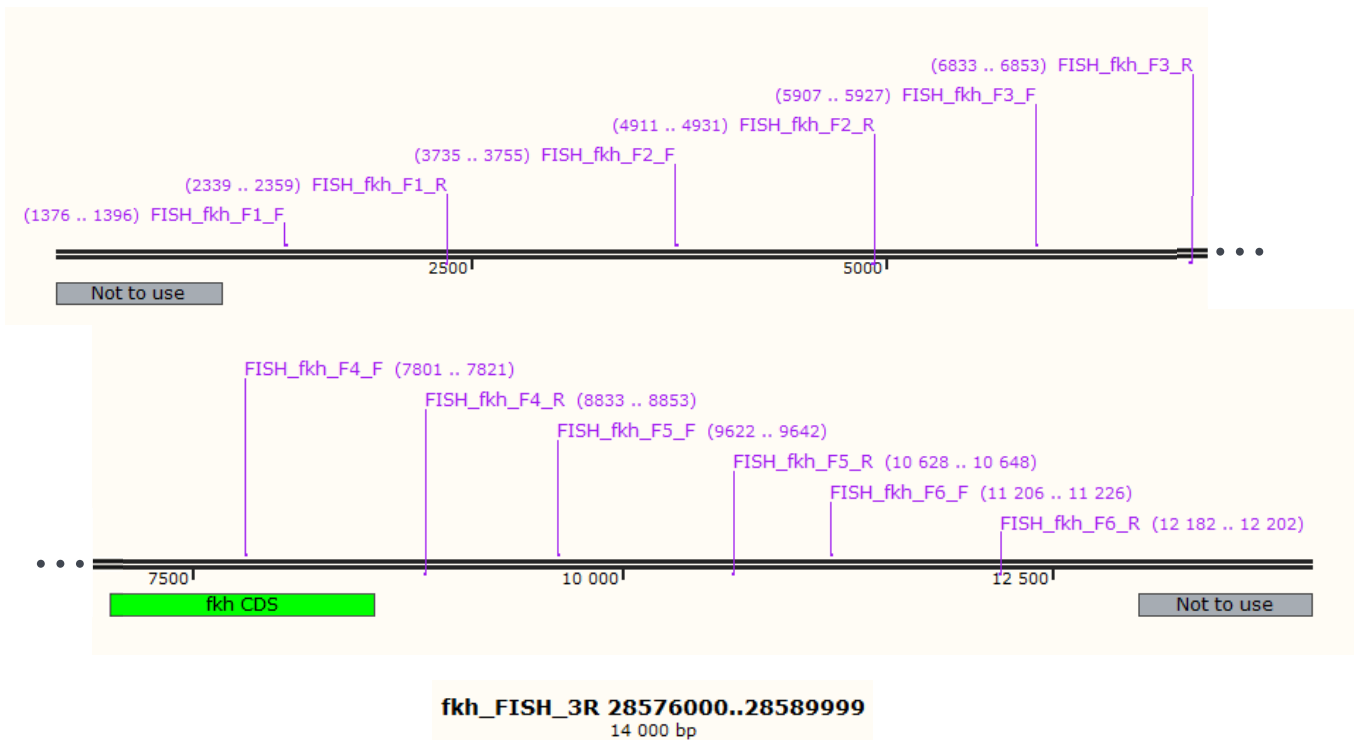


Figure Supplémentaire 4 : Rôle de la fibrillarine dans la localisation nucléaire des complexes Ubx/LamC et du locus génomique *atg1*. (A) Immunomarquage des protéines Ubx (rouge) et fibrillarine (vert) dans les corps gras de drosophile. Le marquage de la fibrillarine est complémentaire du marquage en anneau de Ubx. (B-B') Expression de l'ARNi contre la fibrillarine (*fib*) induit l'autophagie avancée (rouge) dans les clones (vert) au stade L3F. Un marquage anti-*fib* montre l'efficacité du ARNi (gris, (B)). L'ARNi contre la *fib* induit également une perte du marquage Ubx dans les clones en comparaison aux cellules environnantes (gris, (B')). Cependant, la localisation de Ubx en anneau est maintenue (coin supérieur droit, gris, (B')). (C-C'') Marquage FISH du locus *atg1* (vert) au stade L3F. Le marquage LamC (rouge) permet de délimiter la périphérie nucléaire. Le locus *atg1* dans les noyaux sauvages (C) est plus périphérique que le locus dans les noyaux des clones *fib*-ARNi (C'). La quantification de la distance périphérie-FISH est montré en C'' (p-value = 0,031).

III.2. Séquences pour la création des sondes FISH pour le gène *fkh*



III.3. Séquences des enhanceurs *fkh250*, *fkh250_{MUT}* et *fkh250_{CONS}*

- *EcoRI* *fkh250* *XhoI*:
 GAATTCGATCTCAATGTCAAGATTAATCGCCAGCTGTGGGACGAGGGGATCTCAATGTCAAGATT
 AATCGCCAGCTGTGGGACGAGGGATCTCAATGTCAAGATTAATCGCCAGCTGTGGGACGAGGG
 ATCTCAATGTCAAGATTAATCGCCAGCTGTGGGACGAGGGATCTCAATGTCAAGATTAATCGCCA
 GCTGTGGGACGAGGGATCTCAATGTCAAGATTAATCGCCAGCTGTGGGACGAGGGATCTCAAT
 GTCAAGATTAATCGCCAGCTGTGGGACGAGGGATCTCAATGTCAAGATTAATCGCCAGCTGTGG
 GACGAGGGATCTCAATGTCAAGATTAATCGCCAGCTGTGGGACGAGGGATCTCAATGTCAAGAT
 TAATCGCCAGCTGTGGGACGAGGGCTCGAG
- *EcoRI* *fkh250_{MUT}* *XhoI*:
 GAATTCGATCTCAATGTCAAGGTTGGTCGCCAGCTGTGGGACGAGGGGATCTCAATGTCAAGGTT
 GGTCGCCAGCTGTGGGACGAGGGATCTCAATGTCAAGGTTGGTCGCCAGCTGTGGGACGAGGG
 ATCTCAATGTCAAGGTTGGTCGCCAGCTGTGGGACGAGGGATCTCAATGTCAAGGTTGGTCGCC
 AGCTGTGGGACGAGGGATCTCAATGTCAAGGTTGGTCGCCAGCTGTGGGACGAGGGATCTCAA
 TGTCAGGTTGGTCGCCAGCTGTGGGACGAGGGATCTCAATGTCAAGGTTGGTCGCCAGCTGTG
 GGACGAGGGATCTCAATGTCAAGGTTGGTCGCCAGCTGTGGGACGAGGGATCTCAATGTCAAG
 GTTGGTCGCCAGCTGTGGGACGAGGGCTCGAG

- *EcoRI* *fkh250* *CONS* *XhoI*:
 GAATTCGATCTCAATGTCAAGATTTATGGCCAGCTGTGGGACGAGGGATCTCAATGTCAAGATTTATGGCCAGCTGTGGGACGAGGGGA
 ATGGCCAGCTGTGGGACGAGGGATCTCAATGTCAAGATTTATGGCCAGCTGTGGGACGAGGGGA
 TCTCAATGTCAAGATTTATGGCCAGCTGTGGGACGAGGGATCTCAATGTCAAGATTTATGGCCA
 GCTGTGGGACGAGGGATCTCAATGTCAAGATTTATGGCCAGCTGTGGGACGAGGGATCTCAAT
 GTCAAGATTTATGGCCAGCTGTGGGACGAGGGATCTCAATGTCAAGATTTATGGCCAGCTGTGG
 GACGAGGGATCTCAATGTCAAGATTTATGGCCAGCTGTGGGACGAGGGATCTCAATGTCAAGAT
 TTATGGCCAGCTGTGGGACGAGGGCTCGAG

III.4. Macro pour le clustering

```
macro clusteur() //clusters des SuperRes
variable ptsizeH, ptsizeB, ind, centro, nbclust, maxRad, trumpo,
indo, nada, thres, taye, indou, nbpointspercluster
string
indou=-1
do
  indou+=1
  killwaves/A/Z
  newpath/O/Q path1,
"C:Users:christophe:Desktop:data"

  make/T/O Textfeuille={"Feuille"}
  make/T/O TextWave={"191012_PA-BiFC_Ubx51-
Exd54_sgs3G4_29deg_PALM_treated_001.xls", "191012_PA-BiFC_Ubx51-
Exd54_sgs3G4_29deg_PALM_treated_002.xls", \
  "191012_PA-BiFC_Ubx51-
Exd54_sgs3G4_29deg_PALM_treated_003.xls", "191012_PA-BiFC_Ubx-
Exd_sgs3G4_29deg_PALM_treated_001.xls", \
  "191012_PA-BiFC_Ubx-
Exd_sgs3G4_29deg_PALM_treated_002.xls", "191016_PA-BiFC_Ubx51-
Exd54_sgs3G4_29deg_PALM_treated_001.xls", \
  "191016_PA-BiFC_Ubx-Exd_sgs3G4_29deg_PALM_treated_001.xls",
"191016_PA-BiFC_Ubx-Exd_sgs3G4_29deg_PALM_treated_002.xls", \
  "191017_PA-BiFC_Ubx51-
Exd54_sgs3G4_29deg_PALM_treated_001_Localization Microscopy.xls", \
  "191017_PA-BiFC_Ubx51-
Exd54_sgs3G4_29deg_PALM_treated_002_Localization Microscopy.xls", \
  "191017_PA-BiFC_Ubx-
Exd_sgs3G4_29deg_PALM_treated_001_Localization Microscopy.xls", \
```

```

    "191209_PAmCh-Ubx_sgs3G4_29deg_PALM_001_treated.xls",
"191209_PAmCh-Ubx_sgs3G4_29deg_PALM_002_treated.xls", \
    "191209_PAmCh-
Ubx_sgs3G4_29deg_PALM_treated_003.xls", "191209_PAmCh-
Ubx_sgs3G4_29deg_PALM_treated_004_Localization Microscopy.xls", \
    "191209_PAmCh-Ubx_sgs3G4_29deg_PALM_treated_005.xls",
"191209_PAmCh-Ubx_sgs3G4_29deg_PALM_treated_006.xls"}

```

```

Make /O /N=(1024,1024) dataMat=0
Make /O /N=2 traiche=0
SetScale x,0,102400,dataMat
SetScale y,0,102400,dataMat
Duplicate /O dataMat,countMat
XLLoadWave/Q/D/N=clust/S=Textfeuille[0]/P=path1 TextWave[16]
display/K=1/N=graphepreci clust5 vs clust4
ModifyGraph mode=3,marker=19, msize=1
ptsizeH=2
ptsizeB=1
clust5[0]=clust5[1]
clust4[0]=clust4[1]
concatenate/O {clust4,clust5}, Dclust
maxRad=4000
FPClustering/MAXR=(maxRad)/CM Dclust
wavestats/Q W_FPCenterIndex

```

```

//W_FPCenterIndex chaque cluster(x) a un point associé(y) taille =
nbre de clusters

```

```

//W_FPClusterIndex chaque point(x) a un numero de cluster(y)
taille = nbre de points

```

```

nbclust=V_npnts

print nbclust
make/O/N=(nbclust) centrowavex=0,centrowavey=0, poic=1
wavestats/Q W_FPClusterIndex
trumpo=V_npnts
make/O/N=(nbclust) centrowavex=0,centrowavey=0
ind=-1

do
ind+=1
centro=W_FPCenterIndex[ind]

centrowavex[ind]=Dclust[centro][0]

```

```

        centrowavey[ind]=Dclust[centro][1]
        while (ind<nbclust-1)

ModifyGraph zColor(clust5)={W_FPClusterIndex,*,*,Spectrum,0}
ModifyGraph width={Aspect,1}
•ModifyGraph expand=1.5

//suppression des clusters avec peu de points
duplicate/O W_FPClusterIndex, pointclusterindex
sort pointclusterindex,pointclusterindex

nada=0
indo=-1
    do
        indo+=1
        if (pointclusterindex[indo]==pointclusterindex[indo+1])
            poic[nada]=poic[nada]+1
        else
            nada=nada+1
        endif
        while (indo<trumpo-2)
SplitWave/O/N=ast M_clustersCM
duplicate/O poic, past
duplicate/O ast0, ast2
duplicate/O ast1, ast3
thres=50//nombre de points dans un cluster
ast2=past[p]<(thres)? NaN : ast2[p]
ast3=past[p]<(thres)? NaN : ast3[p]
WaveTransform zapNaNs ast2
WaveTransform zapNaNs ast3
taye=umpnts(ast2)
print(taye)
AppendToGraph ast3 vs ast2
•ModifyGraph mode=3,rgb(ast3)=(0,0,65535)
SavePICT/P=path1/O/E=-6/B=360/T="TIFF" as Textfeuill[indou] +".tif"
while (indou<0)

end

```

IV. Article : Generation of a versatile BiFC ORFeome library for analyzing protein-protein interactions in live *Drosophila*.

Pour ce projet, j'ai participé à l'établissement de plusieurs dizaines de lignées transgéniques. Les différents croisements génétiques ont permis de remplacer la cassette HA de l'ORFeome par une cassette CC (Cerulean C-terminal). Cela permet de tester des triples interactions protéine-protéine (trois-couleurs), *in vivo*, chez la drosophile.

J'ai également participé au crible à large échelle en testant une trentaine de lignées de FT avec les protéines Ubx et AbdA.

BIBLIOGRAPHIE

- Abe, N., Dror, I., Yang, L., Slattery, M., Zhou, T., Bussemaker, H. J., Rohs, R. and Mann, R. S. (2015). Deconvolving the recognition of DNA shape from sequence. *Cell* **161**, 307–318.
- Abel, T. and Maniatis, T. (1989). Action of leucine zippers. *Nature* **341**, 24–25.
- Abu-Shaar, M. and Mann, R. S. (1998). Generation of multiple antagonistic domains along the proximodistal axis during *Drosophila* leg development. *Development* **125**, 3821–3830.
- Adelman, K. and Lis, J. T. (2012). Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: emerging roles in metazoans. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 720–731.
- Adkins, N. L., Hagerman, T. A. and Georgel, P. (2006). GAGA protein: A multifaceted transcription factor. In *Biochemistry and Cell Biology*, pp. 559–567. Biochem Cell Biol.
- Aebi, U., Cohn, J., Buhle, L. and Gerace, L. (1986). The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. *Nature* **323**, 560–564.
- Agelopoulos, M., McKay, D. J. and Mann, R. S. (2012). Developmental Regulation of Chromatin Conformation by Hox Proteins in *Drosophila*. *Cell Rep.* **1**, 350–359.
- Akam, M. (1989). Hox and HOM: Homologous gene clusters in insects and vertebrates. *Cell* **57**, 347–349.
- Akam, M. (1998). Hox genes: From master genes to micromanagers. *Curr. Biol.* **8**,
- Akhtar, W., De Jong, J., Pindyurin, A. V., Pagie, L., Meuleman, W., De Ridder, J., Berns, A., Wessels, L. F. A., Van Lohuizen, M. and Van Steensel, B. (2013). Chromatin position effects assayed by thousands of reporters integrated in parallel. *Cell* **154**, 914–927.
- Alam, M. S. (2018). Proximity Ligation Assay (PLA). *Curr Protoc Immunol.*
- Alastalo, T. P., Hellesuo, M., Sandqvist, A., Hietakangas, V., Kallio, M. and Sistonen, L. (2003). Formation of nuclear stress granules involves HSF2 and coincides with the nucleolar localization of Hsp70. *J. Cell Sci.* **116**, 3557–3570.
- Alharbi, R. A., Pettengell, R., Pandha, H. S. and Morgan, R. (2013). The role of HOX genes in normal hematopoiesis and acute leukemia. *Leukemia* **27**, 1000–1008.
- Allahverdi, A., Yang, R., Korolev, N., Fan, Y., Davey, C. A., Liu, C. F. and Nordenskiöld, L. (2011). The effects of histone H4 tail acetylations on cation-induced chromatin folding and self-association. *Nucleic Acids Res.* **39**, 1680–1691.

- Allahyar, A., Vermeulen, C., Bouwman, B. A. M., Krijger, P. H. L., Verstegen, M. J. A. M., Geeven, G., van Kranenburg, M., Pieterse, M., Straver, R., Haarhuis, J. H. I., et al. (2018). Enhancer hubs and loop collisions identified from single-allele topologies. *Nat. Genet.* **50**, 1151–1160.
- Andrey, G., Montavon, T., Mascrez, B., Gonzalez, F., Noordermeer, D., Leleu, M., Trono, D., Spitz, F. and Duboule, D. (2013). A switch between topological domains underlies HoxD genes collinearity in mouse limbs. *Science (80-)*. **340**,.
- Anton, T., Bultmann, S., Leonhardt, H. and Markaki, Y. (2014). Visualization of specific DNA sequences in living mouse embryonic stem cells with a programmable fluorescent CRISPR/Cas system. *Nucleus* **5**, 163–172.
- Appel, B. and Sakonju, S. (1993). Cell-type-specific mechanisms of transcriptional repression by the homeotic gene products UBX and ABD-A in Drosophila embryos. *EMBO J.* **12**, 1099–109.
- Arbel-Goren, R., Shapira, Y. and Stavans, J. (2017). Method for labeling transcripts in individual Escherichia coli cells for single-molecule fluorescence in situ hybridization experiments. *J. Vis. Exp.* **2017**,.
- Ariotti, N., Hall, T. E. and Parton, R. G. (2017). Correlative light and electron microscopic detection of GFP-labeled proteins using modular APEX. *Methods Cell Biol.* **140**, 105–121.
- Ariotti, N., Rae, J., Giles, N., Martel, N., Sierrecki, E., Gambin, Y., Hall, T. E. and Parton, R. G. (2018). Ultrastructural localisation of protein interactions using conditionally stable nanobodies. *PLOS Biol.* **16**, e2005473.
- Arnosti, D. N. and Kulkarni, M. M. (2005). Transcriptional enhancers: Intelligent enhanceosomes or flexible billboards? *J. Cell. Biochem.* **94**, 890–898.
- Arnosti, D. N., Barolo, S., Levine, M. and Small, S. (1996). The eve stripe 2 enhancer employs multiple modes of transcriptional synergy. *Development* **122**, 205–214.
- Arsić, A., Stajković, N., Spiegel, R. and Nikić-Spiegel, I. (2020). Effect of Vectashield-induced fluorescence quenching on conventional and super-resolution microscopy. *Sci. Rep.* **10**,.
- Ashwin, S. S., Nozaki, T., Maeshima, K. and Sasai, M. (2019). Organization of fast and slow chromatin revealed by single-nucleosome dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 19939–19944.
- Aubin, J., Déry, U., Lemieux, M., Chailier, P. and Jeannotte, L. (2002). Stomach regional specification requires Hoxa5-driven mesenchymal-epithelial signaling. *Development* **129**,.
- Aughey, G. N., Cheetham, S. W. and Southall, T. D. (2019). DamID as a versatile tool for understanding gene regulation. *Dev.* **146**,.

- Axelrod, D.** (2016). Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy. In *Encyclopedia of Cell Biology*, pp. 62–69. Munksgaard International Publishers.
- Baëza, M., Viala, S., Heim, M., Dard, A., Hudry, B., Duffraisse, M., Rogulja-Ortmann, A., Brun, C. and Merabet, S.** (2015a). Inhibitory activities of short linear motifs underlie Hox interactome specificity in vivo. *Elife*.
- Baëza, M., Viala, S., Heim, M., Dard, A., Hudry, B., Duffraisse, M., Rogulja-Ortmann, A., Brun, C. and Merabet, S.** (2015b). Inhibitory activities of short linear motifs underlie Hox interactome specificity in vivo. *Elife* 4,.
- Banerji, J., Rusconi, S. and Schaffner, W.** (1981). *Expression of a j&Globin Gene Is Enhanced by Remote SV40 DNA Sequences*.
- Banreti, A., Hudry, B., Sass, M., Saurin, A. J. and Graba, Y.** (2014). Hox Proteins Mediate Developmental and Environmental Control of Autophagy. *Dev. Cell*.
- Bantignies, F. and Cavalli, G.** (2014). Topological organization of drosophila hox genes using DNA fluorescent in situ hybridization. *Methods Mol. Biol.* **1196**, 103–120.
- Bantignies, F., Grimaud, C., Lavrov, S., Gabut, M. and Cavalli, G.** (2003). Inheritance of polycomb-dependent chromosomal interactions in Drosophila. *Genes Dev.* **17**, 2406–2420.
- Barabási, A. L., Gulbahce, N. and Loscalzo, J.** (2011). Network medicine: A network-based approach to human disease. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 56–68.
- Barolo, S.** (2012). Shadow enhancers: Frequently asked questions about distributed cis-regulatory information and enhancer redundancy. *BioEssays* **34**, 135–141.
- Batrakou, D. G.** (2011). Nuclear envelope transmembrane proteins in differentiation systems. *Thesis Present. degree Dr. Philos.*
- Baumgardt, M., Karlsson, D., Salmani, B. Y., Bivik, C., MacDonald, R. B., Gunnar, E. and Thor, S.** (2014). Global Programmed Switch in Neural Daughter Cell Proliferation Mode Triggered by a Temporal Gene Cascade. *Dev. Cell* **30**, 192–208.
- Beagan, J. A. and Phillips-Cremins, J. E.** (2020). On the existence and functionality of topologically associating domains. *Nat. Genet.* **52**, 8–16.
- Beliveau, B. J., Boettiger, A. N., Avendaño, M. S., Jungmann, R., McCole, R. B., Joyce, E. F., Kim-Kiselak, C., Bantignies, F., Fonseka, C. Y., Erceg, J., et al.** (2015). Single-molecule super-resolution imaging of chromosomes and in situ haplotype visualization using Oligopaint FISH probes. *Nat. Commun.*
- Bell, S. P., Learned, R. M., Jantzen, H. M. and Tjian, R.** (1988). Functional cooperativity between transcription factors UBF1 and SL1 mediates human ribosomal RNA synthesis. *Science (80-)*. **241**, 1192–1198.

- Berger, M. F., Badis, G., Gehrke, A. R., Talukder, S., Philippakis, A. A., Peña-Castillo, L., Alleyne, T. M., Mnaimneh, S., Botvinnik, O. B., Chan, E. T., et al. (2008). Variation in Homeodomain DNA Binding Revealed by High-Resolution Analysis of Sequence Preferences. *Cell* **133**, 1266–1276.
- Bergermann, F., Alber, L., Sahl, S. J., Engelhardt, J. and Hell, S. W. (2015). 2000-fold parallelized dual-color STED fluorescence nanoscopy. *Opt. Express* **23**, 211.
- Berman, B. P., Nibu, Y., Pfeiffer, B. D., Tomancak, P., Celniker, S. E., Levine, M., Rubin, G. M. and Eisen, M. B. (2002). Exploiting transcription factor binding site clustering to identify cis-regulatory modules involved in pattern formation in the *Drosophila* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 757–762.
- Berning, S., Willig, K. I., Steffens, H., Dibaj, P. and Hell, S. W. (2012). Nanoscopy in a living mouse brain. *Science (80-.)*. **335**, 551.
- Berry, M. and Gehring, W. J. (2000). Phosphorylation status of the SCR homeodomain determines its functional activity: essential role for protein phosphatase 2A,B'. *EMBO J.* **2**, 4–7.
- Bersaglieri, C. and Santoro, R. (2019). Genome Organization in and around the Nucleolus. *Cells* **8**, 579.
- Berthelsen, J., Zappavigna, V., Mavilio, F. and Blasi, F. (1998). *Prep1, a novel functional partner of Pbx proteins.*
- Berthelsen, J., Kilstrup-Nielsen, C., Blasi, F., Mavilio, F. and Zappavigna, V. (1999). The subcellular localization of PBX1 and EXD proteins depends on nuclear import and export signals and is modulated by association with PREP1 and HTH. *Genes Dev.* **13**, 946–953.
- Bessa, J., Tavares, M. J., Santos, J., Kikuta, H., Laplante, M., Becker, T. S., Gómez-Skarmeta, J. L. and Casares, F. (2008). *meis1* regulates cyclin D1 and *c-myc* expression, and controls the proliferation of the multipotent cells in the early developing zebrafish eye. *Development* **135**, 799–803.
- Betzig, E., Patterson, G. H., Sougrat, R., Lindwasser, O. W., Olenych, S., Bonifacino, J. S., Davidson, M. W., Lippincott-Schwartz, J. and Hess, H. (2006). Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. *Science (80-.)*. **313**, 1638–1642.
- Biamonti, G., Giacca, M., Perini, G., Contreas, G., Zentilin, L., Weighardt, F., Guerra, M., Della Valle, G., Saccone, S. and Riva, S. (1992). The gene for a novel human lamin maps at a highly transcribed locus of chromosome 19 which replicates at the onset of S-phase. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 3499–3506.
- Bintu, B., Mateo, L. J., Su, J. H., Sinnott-Armstrong, N. A., Parker, M., Kinrot, S., Yamaya, K., Boettiger, A. N. and Zhuang, X. (2018). Super-resolution chromatin tracing reveals domains and cooperative interactions in single cells. *Science (80-.)*. **362**,.

- Bischof, J., Maeda, R. K., Hediger, M., Karch, F. and Basler, K. (2007). An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific ϕ C31 integrases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 3312–3317.
- Bischof, J., Duffraisse, M., Furger, E., Ajuria, L., Giraud, G., Vanderperre, S., Paul, R., Björklund, M., Ahr, D., Ahmed, A. W., et al. (2018). Generation of a versatile BiFC ORFeome library for analyzing protein-protein interactions in live *Drosophila*. *Elife* **7**,.
- Blackwood, E. M. and Kadonaga, J. T. (1998). Going the distance: A current view of enhancer action. *Science (80-)*. **281**, 60–63.
- Blom, H. and Widengren, J. (2017). Stimulated Emission Depletion Microscopy. *Chem. Rev.* **117**, 7377–7427.
- Bobola, N. and Merabet, S. (2017a). *Homeodomain proteins in action: similar DNA binding preferences, highly variable connectivity*.
- Bobola, N. and Merabet, S. (2017b). Homeodomain proteins in action: similar DNA binding preferences, highly variable connectivity. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **43**,.
- Boettiger, A. N. and Levine, M. (2009). Synchronous and Stochastic Patterns of Gene Activation in the *Drosophila* Embryo. *Science (80-)*. **325**, 471–473.
- Bohmann, K., Ferreira, J., Santama, N., Weis, K. and Lamond, A. I. (1995). *Molecular analysis of the coiled body*.
- Boija, A., Klein, I. A., Sabari, B. R., Dall’Agnese, A., Coffey, E. L., Zamudio, A. V., Li, C. H., Shrinivas, K., Manteiga, J. C., Hannett, N. M., et al. (2018). Transcription Factors Activate Genes through the Phase-Separation Capacity of Their Activation Domains. *Cell* **175**, 1842-1855.e16.
- Bon, P., Linarès-Loyez, J., Feyeux, M., Alessandri, K., Lounis, B., Nassoy, P. and Cognet, L. (2018). Self-interference 3D super-resolution microscopy for deep tissue investigations. *Nat. Methods* **1**.
- Bosco, G. (2012). Chromosome Pairing: A Hidden Treasure No More. *PLoS Genet.* **8**, e1002737.
- Bothma, J. P., Garcia, H. G., Esposito, E., Schlissel, G., Gregor, T. and Levine, M. (2014). Dynamic regulation of *eve* stripe 2 expression reveals transcriptional bursts in living *Drosophila* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 10598–10603.
- Bottanelli, F., Kromann, E. B., Allgeyer, E. S., Erdmann, R. S., Baguley, S. W., Sirinakis, G., Schepartz, A., Baddeley, D., Toomre, D. K., Rothman, J. E., et al. (2016). Two-colour live-cell nanoscale imaging of intracellular targets. *Nat. Commun.* **7**,.
- Boube, M., Faucher, C., Joulia, L., Cribbs, D. L. and Bourbon, H. M. (2000). *Drosophila* homologs of transcriptional mediator complex subunits are required for adult cell and segment identity specification. *Genes Dev.* **14**,

2906–2917.

- Boube, M., Hudry, B., Immarigeon, C., Carrier, Y., Bernat-Fabre, S., Merabet, S., Graba, Y., Bourbon, H.-M. and Cribbs, D. L. (2014). Drosophila melanogaster Hox Transcription Factors Access the RNA Polymerase II Machinery through Direct Homeodomain Binding to a Conserved Motif of Mediator Subunit Med19. *PLoS Genet.* **10**, e1004303.
- Boucherat, O., Chakir, J. and Jeannotte, L. (2012). The loss of Hoxa5 function promotes Notch-dependent goblet cell metaplasia in lung airways. *Biol. Open* **1**, 677–691.
- Bourgeois, C. A., Hemon, D. and Bouteille, M. (1979). Structural relationship between the nucleolus and the nuclear envelope. *J. Ultrastructure Res.* **68**, 328–340.
- Boute, N., Jockers, R. and Issad, T. (2002). The use of resonance energy transfer in high-throughput screening: BRET versus FRET. *Trends Pharmacol. Sci.* **23**, 351–354.
- Branon, T. C., Bosch, J. A., Sanchez, A. D., Udeshi, N. D., Svinkina, T., Carr, S. A., Feldman, J. L., Perrimon, N. and Ting, A. Y. (2018). Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nat. Biotechnol.* **36**, 880–898.
- Breau, M. A., Wilkinson, D. G. and Xu, Q. (2013). A Hox gene controls lateral line cell migration by regulating chemokine receptor expression downstream of Wnt signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 16892–16897.
- Briand, N. and Collas, P. (2020). Lamina-associated domains: Peripheral matters and internal affairs. *Genome Biol.* **21**,.
- Broers, J. L., Machiels, B. M., van Eys, G. J., Kuijpers, H. J., Manders, E. M., van Driel, R. and Ramaekers, F. C. (1999). Dynamics of the nuclear lamina as monitored by GFP-tagged A-type lamins. *J. Cell Sci.* **112**,.
- Bronshtein, I., Kepten, E., Kanter, I., Berezin, S., Lindner, M., Redwood, A. B., Mai, S., Gonzalo, S., Foisner, R., Shav-Tal, Y., et al. (2015). Loss of lamin A function increases chromatin dynamics in the nuclear interior. *Nat. Commun.* **6**, 1–9.
- Broussard, J. A., Rappaz, B., Webb, D. J. and Brown, C. M. (2013). Fluorescence resonance energy transfer microscopy as demonstrated by measuring the activation of the serine/threonine kinase Akt. *Nat. Protoc.* **8**, 265–281.
- Buffry, A. D., Mendes, C. C. and McGregor, A. P. (2016). The Functionality and Evolution of Eukaryotic Transcriptional Enhancers. *Adv. Genet.*
- Bürglin, T. R. and Affolter, M. (2016). Homeodomain proteins: an update. *Chromosoma* **125**, 497–521.
- Busslinger, G. A., Stocsits, R. R., Van Der Lelij, P., Axelsson, E., Tedeschi, A.,

- Galjart, N. and Peters, J. M. (2017). Cohesin is positioned in mammalian genomes by transcription, CTCF and Wapl. *Nature* **544**, 503–507.
- Butler, J. E. F. and Kadonaga, J. T. (2002). The RNA polymerase II core promoter: A key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev.* **16**, 2583–2592.
- Buxbaum, A. R., Haimovich, G. and Singer, R. H. (2015). In the right place at the right time: Visualizing and understanding mRNA localization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 95–109.
- Cai, S., Chen, C., Tan, Z. Y., Huang, Y., Shi, J. and Gan, L. (2018). Cryo-ET reveals the macromolecular reorganization of *S. pombe* mitotic chromosomes in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 10977–10982.
- Cajigas, I., Leib, D. E., Cochrane, J., Luo, H., Swyter, K. R., Chen, S., Clark, B. S., Thompson, J., Yates, J. R., Kingston, R. E., et al. (2015). Evf2 lncRNA/BRG1/DLX1 interactions reveal RNA-dependent inhibition of chromatin remodeling. *Dev.* **142**, 2641–2652.
- Cannavò, E., Khoueiry, P., Garfield, D. A., Geeleher, P., Zichner, T., Gustafson, E. H., Ciglar, L., Korbil, J. O. and Furlong, E. E. M. (2016). Shadow Enhancers Are Pervasive Features of Developmental Regulatory Networks. *Curr. Biol.* **26**, 38–51.
- Cardozo Gizzi, A. M., Cattoni, D. I. and Nollmann, M. (2020). TADs or no TADs: Lessons From Single-cell Imaging of Chromosome Architecture. *J. Mol. Biol.*
- Carmo-Fonseca, M., Cunha, C., Custódio, L., Custódio, C., Carvalho, L., Jordan, P., Joaõ, J., Ferreira, J. and Parreira, L. (1996). *The Topography of Chromosomes and Genes in the Nucleus*.
- Carnesecchi, J., Sigismondo, G., Domsch, K., Eva, C., Baader, P., Rafiee, M.-R., Krijgsveld, J. and Lohmann, I. (2020). Multi-level and lineage-specific interactomes of the Hox transcription factor Ubx contribute to its functional specificity.
- Carroll, S. B. (1995). Homeotic genes and the evolution of arthropods and chordates. *Nature* **376**, 479–485.
- Carullo, N. V. N. and Day, J. J. (2019). Genomic enhancers in brain health and disease. *Genes (Basel)*. **10**, 43.
- Castelli-Gair Hombría, J., Sánchez-Higueras, C. and Sánchez-Herrero, E. (2016). Control of Organogenesis by Hox Genes. In *Organogenetic Gene Networks*, pp. 319–373. Cham: Springer International Publishing.
- Cattoni, D. I., Gizzi, A. M. C., Georgieva, M., Di Stefano, M., Valeri, A., Chamouset, D., Houbbron, C., Déjardin, S., Fiche, J. B., González, I., et al. (2017). Single-cell absolute contact probability detection reveals chromosomes are organized by multiple low-frequency yet specific interactions. *Nat. Commun.* **8**, 1–10.

- Caudy, M., Vässin, H., Brand, M., Tuma, R., Jah, L. Y. and Jan, Y. N. (1988). daughterless, a Drosophila gene essential for both neurogenesis and sex determination, has sequence similarities to myc and the achaete-scute complex. *Cell* **55**, 1061–1067.
- Causier, B. (2004). Studying the interactome with the yeast two-hybrid system and mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **23**, 350–367.
- Cavalli, G. (2007). Chromosome kissing. *Curr. Opin. Genet. Dev.*
- Cerdá-Esteban, N. and Spagnoli, F. M. (2014). Glimpse into Hox and tale regulation of cell differentiation and reprogramming. *Dev. Dyn.* **243**, 76–87.
- Charbonnier, S., Gallego, O. and Gavin, A. C. (2008). The social network of a cell: Recent advances in interactome mapping. *Biotechnol. Annu. Rev.* **14**, 1–28.
- Chen, Y. and Belmont, A. S. (2019). Genome organization around nuclear speckles: Discovery and rediscoveries of nuclear speckles.
- Chen, H., Chung, S. and Sukumar, S. (2004). HOXA5-Induced Apoptosis in Breast Cancer Cells Is Mediated by Caspases 2 and 8. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 924–935.
- Chen, B., Gilbert, L. A., Cimini, B. A., Schnitzbauer, J., Zhang, W., Li, G. W., Park, J., Blackburn, E. H., Weissman, J. S., Qi, L. S., et al. (2013). Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. *Cell* **155**, 1479–1491.
- Chen, B.-C., Legant, W. R., Wang, K., Shao, L., Milkie, D. E., Davidson, M. W., Janetopoulos, C., Wu, X. S., Hammer, J. A., Liu, Z., et al. (2014). Lattice light-sheet microscopy: Imaging molecules to embryos at high spatiotemporal resolution. *Science (80-)*.
- Chen, K. H., Boettiger, A. N., Moffitt, J. R., Wang, S. and Zhuang, X. (2015). Spatially resolved, highly multiplexed RNA profiling in single cells. *Science (80-)*. **348**, aaa6090–aaa6090.
- Chen, H., Levo, M., Barinov, L., Fujioka, M., Jaynes, J. B. and Gregor, T. (2018). Dynamic interplay between enhancer–promoter topology and gene activity. *Nat. Genet.* **50**, 1296–1303.
- Chen, Q., Shao, X., Hao, M., Fang, H., Guan, R., Tian, Z., Li, M., Wang, C., Ji, L., Chao, H., et al. (2020). Quantitative analysis of interactive behavior of mitochondria and lysosomes using structured illumination microscopy. *Biomaterials* **250**,.
- Chmyrov, A., Keller, J., Grotjohann, T., Ratz, M., D’Este, E., Jakobs, S., Eggeling, C. and Hell, S. W. (2013). Nanoscopy with more than 100,000 “doughnuts.” *Nat. Methods* **10**, 737–740.
- Cho, W. K., Spille, J. H., Hecht, M., Lee, C., Li, C., Grube, V. and Cisse, I. I. (2018). Mediator and RNA polymerase II clusters associate in transcription-dependent condensates. *Science (80-)*. **361**, 412–415.

- Choe, S. K., Lu, P., Nakamura, M., Lee, J. and Sagerström, C. G. (2009). Meis Cofactors Control HDAC and CBP Accessibility at Hox-Regulated Promoters during Zebrafish Embryogenesis. *Dev. Cell* **17**, 561–567.
- Choi, H. M. T., Chang, J. Y., Trinh, L. A., Padilla, J. E., Fraser, S. E. and Pierce, N. A. (2010). Programmable in situ amplification for multiplexed imaging of mRNA expression. *Nat. Biotechnol.* **28**, 1208–1212.
- Chong, S., Dugast-Darzacq, C., Liu, Z., Dong, P., Dailey, G. M., Cattoglio, C., Heckert, A., Banala, S., Lavis, L., Darzacq, X., et al. (2018). Imaging dynamic and selective low-complexity domain interactions that control gene transcription. *Science* **361**,.
- Choo, S. W., White, R. and Russell, S. (2011). Genome-wide analysis of the binding of the hox protein ultrabithorax and the hox cofactor homothorax in *Drosophila*. *PLoS One* **6**, e14778.
- Cisse, I. I., Izeddin, I., Causse, S. Z., Boudarene, L., Senecal, A., Muresan, L., Dugast-Darzacq, C., Hajj, B., Dahan, M. and Darzacq, X. (2013). Real-time dynamics of RNA polymerase II clustering in live human cells. *Science (80-)*. **341**, 664–667.
- Clark, S., Myers, J. B., King, A., Fiala, R., Novacek, J., Pearce, G., Heierhorst, J., Reichow, S. L. and Barbar, E. J. (2018). Multivalency regulates activity in an intrinsically disordered transcription factor. *Elife* **7**, e36258.
- Collins, C., Wang, J., Miao, H., Bronstein, J., Nawer, H., Xu, T., Figueroa, M., Muntean, A. G. and Hess, J. L. (2014). C/EBP α is an essential collaborator in Hoxa9/Meis1-mediated leukemogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 9899–9904.
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., et al. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science (80-)*. **339**, 819–823.
- Costa, M., Weir, M., Coulson, A., Sulston, J. and Kenyon, C. (1988). Posterior pattern formation in *C. elegans* involves position-specific expression of a gene containing a homeobox. *Cell* **55**, 747–756.
- Cremer, T. and Cremer, C. (2001). Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 292–301.
- Cremer, T. and Cremer, M. (2010). Chromosome territories. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**,.
- Crocker, J., Abe, N., Rinaldi, L., McGregor, A. P., Frankel, N., Wang, S., Alsawadi, A., Valenti, P., Plaza, S., Payre, F., et al. (2015a). Low affinity binding site clusters confer HOX specificity and regulatory robustness. *Cell* **160**, 191–203.
- Crocker, J., Abe, N., Rinaldi, L., McGregor, A. P., Frankel, N., Wang, S., Alsawadi, A., Valenti, P., Plaza, S., Payre, F., et al. (2015b). Low Affinity Binding Site Clusters Confer Hox Specificity and Regulatory Robustness. *Cell* **160**, 191–203.

- Crocker, J., Preger-Ben Noon, E. and Stern, D. L.** (2016). The Soft Touch: Low-Affinity Transcription Factor Binding Sites in Development and Evolution. In *Current Topics in Developmental Biology*, pp. 455–469. Academic Press Inc.
- Crossley, M. and Brownlee, G. G.** (1990). Disruption of a C/EBP binding site in the factor IX promoter is associated with haemophilia B. *Nature* **345**, 444–446.
- D’Orlando, A.** (2015). Nano-structuration de nanoparticules métalliques pour exaltation de champs électromagnétiques locaux en spectroscopie Raman.
- Dani, A., Huang, B., Bergan, J., Dulac, C. and Zhuang, X.** (2010). Superresolution Imaging of Chemical Synapses in the Brain. *Neuron* **68**, 843–856.
- Dard, A., Reboulet, J., Jia, Y., Vanaker, J.-M., Forcet, C., Correspondence, S. M., Oise Bleicher, F., Duffraisse, M. and Merabet, S.** (2018). Human HOX Proteins Use Diverse and Context-Dependent Motifs to Interact with TALE Class Cofactors. *Cell Rep.* **22**, 3058–3071.
- Davey, N. E., Cyert, M. S. and Moses, A. M.** (2015). Short linear motifs - Ex nihilo evolution of protein regulation Short linear motifs - The unexplored frontier of the eukaryotic proteome. *Cell Commun. Signal.* **13**, 1–15.
- De Munter, S., Görnemann, J., Derua, R., Lesage, B., Qian, J., Heroes, E., Waelkens, E., Van Eynde, A., Beullens, M. and Bollen, M.** (2017). Split-BioID: a proximity biotinylation assay for dimerization-dependent protein interactions. *FEBS Lett.* **591**, 415–424.
- Dechat, T., Korbei, B., Vaughan, O. A., Vlcek, S., Hutchison, C. J. and Foisner, R.** (2000). Lamina-associated polypeptide 2 α binds intranuclear A-type lamins. *J. Cell Sci.* **113**,.
- Dechat, T., Gesson, K. and Foisner, R.** (2010). Lamina-independent lamins in the nuclear interior serve important functions. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **75**, 533–543.
- Dedecker, P., De Schryver, F. C. and Hofkens, J.** (2013). Fluorescent proteins: Shine on, you crazy diamond. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 2387–2402.
- Dekker, J., Rippe, K., Dekker, M. and Kleckner, N.** (2002). Capturing chromosome conformation. *Science (80-)*. **295**, 1306–1311.
- Demmerle, J., Koch, A. J. and Holaska, J. M.** (2012). The nuclear envelope protein emerin binds directly to histone deacetylase 3 (HDAC3) and activates HDAC3 activity. *J. Biol. Chem.* **287**, 22080–22088.
- Demmerle, J., Koch, A. J. and Holaska, J. M.** (2013). Emerin and histone deacetylase 3 (HDAC3) cooperatively regulate expression and nuclear positions of MyoD, Myf5, and Pax7 genes during myogenesis. *Chromosom. Res.* **21**, 765–779.
- Denegri, M., Chiodi, I., Corioni, M., Cobianchi, F., Riva, S. and Biamonti, G.** (2001). Stress-induced nuclear bodies are sites of accumulation of pre-mRNA

- processing factors. *Mol. Biol. Cell* **12**, 3502–3514.
- Deng, H., Zhang, W., Bao, X., Martin, J. N., Girton, J., Johansen, J. and Johansen, K. M. (2005). The JIL-1 kinase regulates the structure of *Drosophila* polytene chromosomes. *Chromosoma* **114**, 173–182.
- Deng, W., Rupon, J. W., Krivega, I., Breda, L., Motta, I., Jahn, K. S., Reik, A., Gregory, P. D., Rivella, S., Dean, A., et al. (2014). Reactivation of developmentally silenced globin genes by forced chromatin looping. *Cell* **158**, 849–860.
- DeRosa, M. C. and Crutchley, R. J. (2002). Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord. Chem. Rev.* **233–234**, 351–371.
- Deschout, H., Zancchi, F. C., Mlodzianoski, M., Diaspro, A., Bewersdorf, J., Hess, S. T. and Braeckmans, K. (2014). Precisely and accurately localizing single emitters in fluorescence microscopy. *Nat. Methods* **11**, 253–266.
- Dessain, S., Gross, C. T., Kuziora, M. A. and McGinnis, W. (1992). Antp-type homeodomains have distinct DNA binding specificities that correlate with their different regulatory functions in embryos. *EMBO J.* **11**, 991–1002.
- Dickson, R. M., Cubitt, A. B., Tsient, R. Y. and Moerner, W. E. (1997). On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein. *Nature* **388**, 355–358.
- Dinkel, H., Van Roey, K., Michael, S., Kumar, M., Uyar, B., Altenberg, B., Milchevskaya, V., Schneider, M., Uhn, H. K., Behrendt, A., et al. (2016). ELM 2016-data update and new functionality of the eukaryotic linear motif resource. *Nucleic Acids Res.* **44**.
- Dion, V., Kalck, V., Seeber, A., Schleker, T. and Gasser, S. M. (2013). Cohesin and the nucleolus constrain the mobility of spontaneous repair foci. *EMBO Rep.* **14**, 984–991.
- Dixon, J. R., Selvaraj, S., Yue, F., Kim, A., Li, Y., Shen, Y., Hu, M., Liu, J. S. and Ren, B. (2012). Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* **485**, 376–380.
- Dixon, J. R., Jung, I., Selvaraj, S., Shen, Y., Antosiewicz-Bourget, J. E., Lee, A. Y., Ye, Z., Kim, A., Rajagopal, N., Xie, W., et al. (2015). Chromatin architecture reorganization during stem cell differentiation. *Nature* **518**, 331–336.
- Doğan, E. S. and Liu, C. (2018). Three-dimensional chromatin packing and positioning of plant genomes. *Nat. Plants* **4**, 521–529.
- Doksani, Y., Wu, J. Y., De Lange, T. and Zhuang, X. (2013). Super-resolution fluorescence imaging of telomeres reveals TRF2-dependent T-loop formation. *Cell* **155**, 345.
- Dolzblasz, A., Nardmann, J., Clerici, E., Causier, B., van der Graaff, E., Chen, J., Davies, B., Werr, W. and Laux, T. (2016). Stem Cell Regulation by Arabidopsis

WOX Genes. *Mol. Plant* **9**, 1028–1039.

- Donnert, G., Keller, J., Wurm, C. A., Rizzoli, S. O., Westphal, V., Schönle, A., Jahn, R., Jakobs, S., Eggeling, C. and Hell, S. W. (2007). Two-color far-field fluorescence nanoscopy. *Biophys. J.* **92**, L67–L69.
- Dorigo, B., Schalch, T., Bystricky, K. and Richmond, T. J. (2003). Chromatin fiber folding: Requirement for the histone H4 N-terminal tail. *J. Mol. Biol.* **327**, 85–96.
- Dreze, M., Monachello, D., Lurin, C., Cusick, M. E., Hill, D. E., Vidal, M. and Braun, P. (2010). High-quality binary interactome mapping. *Methods Enzymol.* **470**, 281–315.
- Dror, I., Golan, T., Levy, C., Rohs, R. and Mandel-Gutfreund, Y. (2015). A widespread role of the motif environment in transcription factor binding across diverse protein families. *Genome Res.* **25**, 1268–1280.
- Dubarry, M., Loïodice, I., Chen, C. L., Thermes, C. and Taddei, A. (2011). Tight protein-DNA interactions favor gene silencing. *Genes Dev.* **25**, 1365–1370.
- DuBuc, T., Stephenson, T., Rock, A. and Martindale, M. (2017). Hox genes pattern the primary body axis of an anthozoan cnidarian prior to gastrulation. *bioRxiv* 219758.
- DuBuc, T. Q., Stephenson, T. B., Rock, A. Q. and Martindale, M. Q. (2018). Hox and Wnt pattern the primary body axis of an anthozoan cnidarian before gastrulation. *Nat. Commun.* **9**, 2007.
- Duffraisse, M., Hudry, B. and Merabet, S. (2014). *Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) in live Drosophila embryos.*
- Duffraisse, M., Paul, R., Hudry, B., Carnesecchi, J., Banretti, A., Reboulet, J., Ajuria, L., Lohmann, I. and Merabet, S. (2019). Role of a versatile peptide motif in controlling Hox nuclear export and autophagy in the *Drosophila* fat body. *bioRxiv* 843383.
- Dunham, W. H., Mullin, M. and Gingras, A. C. (2012a). Affinity-purification coupled to mass spectrometry: Basic principles and strategies. *Proteomics* **12**, 1576–1590.
- Dunham, I., Kundaje, A., Aldred, S. F., Collins, P. J., Davis, C. A., Doyle, F., Epstein, C. B., Frietze, S., Harrow, J., Kaul, R., et al. (2012b). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* **489**, 57–74.
- Eklund, E. A., Goldenberg, I., Lu, Y., Andrejic, J. and Kakar, R. (2002). SHP1 protein-tyrosine phosphatase regulates HoxA10 DNA binding and transcriptional repression activity in undifferentiated myeloid cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 36878–36888.
- Endesfelder, U., Malkusch, S., Flottmann, B., Mondry, J., Liguzinski, P., Vermeer, P. J., Heilemann, M., Endesfelder, U., Malkusch, S., Flottmann, B., et al.

- (2011). Chemically Induced Photoswitching of Fluorescent Probes—A General Concept for Super-Resolution Microscopy. *Molecules* **16**, 3106–3118.
- Engström, P. G., Ho Sui, S. J., Drivenes, Ø., Becker, T. S. and Lenhard, B.** (2007). Genomic regulatory blocks underlie extensive microsynteny conservation in insects. *Genome Res.*
- Erdelyi, M., Rees, E., Metcalf, D., Schierle, G. S. K., Dudas, L., Sinko, J., Knight, A. E. and Kaminski, C. F.** (2013). Correcting chromatic offset in multicolor super-resolution localization microscopy. *Opt. Express* **21**, 10978.
- Erenpreisa, J., Krigerts, J., Salminaa, K., Selgac, T., Sorokins, H. and Freivalds, T.** (2018). Differential staining of peripheral nuclear chromatin with acridine orange implies an A-form epichromatin conformation of the DNA. *Nucleus* **9**, 171–181.
- Evans, R. M.** (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science (80-)*. **240**, 889–895.
- Fan, J. Y., Cui, Z. Q., Wei, H. P., Zhang, Z. P., Zhou, Y. F., Wang, Y. P. and Zhang, X. E.** (2008). Split mCherry as a new red bimolecular fluorescence complementation system for visualizing protein-protein interactions in living cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **367**, 47–53.
- Farley, E. K., Olson, K. M., Zhang, W., Rokhsar, D. S. and Levine, M. S.** (2016). Syntax compensates for poor binding sites to encode tissue specificity of developmental enhancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 6508–6513.
- Fellermann, M., Wondany, F., Carle, S., Nemeth, J., Sadhanasatish, T., Frick, M., Barth, H. and Michaelis, J.** (2020). Super-resolution microscopy unveils transmembrane domain-mediated internalization of cross-reacting material 197 into diphtheria toxin-resistant mouse J774A.1 cells and primary rat fibroblasts in vitro. *Arch. Toxicol.*
- Femino, A. M., Fay, F. S., Fogarty, K. and Singer, R. H.** (1998). Visualization of single RNA transcripts in situ. *Science (80-)*. **280**, 585–590.
- Feric, M., Vaidya, N., Harmon, T. S., Kriwacki, R. W., Pappu, R. V, Correspondence, C. P. B., Mitrea, D. M., Zhu, L., Richardson, T. M. and Brangwynne, C. P.** (2016). Coexisting Liquid Phases Underlie Nucleolar Subcompartments Article Coexisting Liquid Phases Underlie Nucleolar Subcompartments. *Cell* **165**, 1686–1697.
- Ferrier, D. E. K. and Holland, P. W. H.** (2001). Ancient origin of the Hox gene cluster. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 33–38.
- Fields, S. and Song, O. K.** (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245–246.
- Filion, G. J., van Bommel, J. G., Braunschweig, U., Talhout, W., Kind, J., Ward, L. D., Brugman, W., de Castro, I. J., Kerkhoven, R. M., Bussemaker, H. J., et al.** (2010). Systematic Protein Location Mapping Reveals Five Principal

- Chromatin Types in *Drosophila* Cells. *Cell* **143**, 212–224.
- Fiolka, R., Shao, L., Hesper Rego, E., Davidson, M. W. and Gustafsson, M. G. L.** (2012). Time-lapse two-color 3D imaging of live cells with doubled resolution using structured illumination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 5311–5315.
- Fisher, D. Z., Chaudhary, N. and Blobel, G.** (1986). cDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 6450–6454.
- Flors, C., Hotta, J. I., Uji-i, H., Dedecker, P., Ando, R., Mizuno, H., Miyawaki, A. and Hofkens, J.** (2007). A stroboscopic approach for fast photoactivation-localization microscopy with Dronpa mutants. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 13970–13977.
- Flors, C., Ravarani, C. N. J. and Dryden, D. T. F.** (2009). Super-Resolution Imaging of DNA Labelled with Intercalating Dyes. *ChemPhysChem* **10**, 2201–2204.
- Flyamer, I. M., Gassler, J., Imakaev, M., Brandão, H. B., Ulianov, S. V., Abdennur, N., Razin, S. V., Mirny, L. A. and Tachibana-Konwalski, K.** (2017). Single-nucleus Hi-C reveals unique chromatin reorganization at oocyte-to-zygote transition. *Nature* **544**, 110–114.
- Foisner, R. and Gerace, L.** (1993). Integral membrane proteins of the nuclear envelope interact with lamins and chromosomes, and binding is modulated by mitotic phosphorylation. *Cell* **73**, 1267–1279.
- Foos, N., Maurel-Zaffran, C., Maté, M. J., Vincentelli, R., Hainaut, M., Berenger, H., Pradel, J., Saurin, A. J., Ortiz-Lombardía, M. and Graba, Y.** (2015). A Flexible extension of the *drosophila* ultrabithorax homeodomain defines a Novel Hox/PBC interaction mode. *Structure* **23**, 270–279.
- Förster, R., Lu-Walther, H.-W., Jost, A., Kielhorn, M., Wicker, K. and Heintzmann, R.** (2014). Simple structured illumination microscope setup with high acquisition speed by using a spatial light modulator. *Opt. Express* **22**, 20663.
- Foster, H. A. and Bridger, J. M.** (2005). The genome and the nucleus: A marriage made by evolution. Genome organisation and nuclear architecture. *Chromosoma* **114**, 212–229.
- Fox, A. H., Nakagawa, S., Hirose, T. and Bond, C. S.** (2018). Paraspeckles: Where Long Noncoding RNA Meets Phase Separation. *Trends Biochem. Sci.* **43**, 124–135.
- Franke, M., Ibrahim, D. M., Andrey, G., Schwarzer, W., Heinrich, V., Schöpflin, R., Kraft, K., Kempfer, R., Jerković, I., Chan, W. L., et al.** (2016). Formation of new chromatin domains determines pathogenicity of genomic duplications. *Nature* **538**, 265–269.
- Frankel, N., Wang, S. and Stern, D. L.** (2012). Conserved regulatory architecture underlies parallel genetic changes and convergent phenotypic evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 20975–20979.

- Fredriksson, S., Gullberg, M., Jarvius, J., Olsson, C., Pietras, K., Gústafsdóttir, S. M., Östman, A. and Landegren, U. (2002). Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays. *Nat. Biotechnol.* **20**, 473–477.
- Frolikova, M., Otcenaskova, T., Valasková, E., Postlerova, P., Stopkova, R., Stopka, P. and Komrskov, K. (2020). The role of taste receptor mTAS1R3 in chemical communication of gametes. *Int. J. Mol. Sci.* **21**,.
- Frost, N. A., Shroff, H., Kong, H., Betzig, E. and Blanpied, T. A. (2010). Single-molecule discrimination of discrete perisynaptic and distributed sites of actin filament assembly within dendritic spines. *Neuron* **67**, 86–99.
- Fu, Y., Rocha, P. P., Luo, V. M., Raviram, R., Deng, Y., Mazzoni, E. O. and Skok, J. A. (2016). CRISPR-dCas9 and sgRNA scaffolds enable dual-colour live imaging of satellite sequences and repeat-enriched individual loci. *Nat. Commun.*
- Fudenberg, G., Imakaev, M., Lu, C., Goloborodko, A., Abdennur, N. and Mirny, L. A. (2016). Formation of Chromosomal Domains by Loop Extrusion. *Cell Rep.* **15**, 2038–2049.
- Fujioka, M., Mistry, H., Schedl, P. and Jaynes, J. B. (2016). Determinants of Chromosome Architecture: Insulator Pairing in cis and in trans. *PLOS Genet.* **12**, e1005889.
- Fukaya, T., Lim, B. and Levine, M. (2016). Enhancer Control of Transcriptional Bursting. *Cell* **166**, 358–368.
- Furlong, E. E. M. and Levine, M. (2018). Developmental enhancers and chromosome topology. *Science* **361**, 1341–1345.
- Gabler, M., Volkmar, M., Weinlich, S., Herbst, A., Dobberthien, P., Sklarss, S., Fanti, L., Pimpinelli, S., Kress, H., Reuter, G., et al. (2005). Trans-splicing of the mod(mdg4) complex locus is conserved between the distantly related species *Drosophila melanogaster* and *D. virilis*. *Genetics* **169**, 723–736.
- Galant, R., Walsh, C. M. and Carroll, S. B. (2002). Hox repression via monomer sites. *Development*.
- Galarneau, A., Primeau, M., Trudeau, L. E. and Michnick, S. W. (2002). β -Lactamase protein fragment complementation assays as in vivo and in vitro sensors of protein-protein interactions. *Nat. Biotechnol.* **20**, 619–622.
- Galganski, L., Urbanek, M. O. and Krzyzosiak, W. J. (2017). SURVEY AND SUMMARY Nuclear speckles: molecular organization, biological function and role in disease. *Nucleic Acids Res.* **45**, 10350–10368.
- Garcia, H. G., Tikhonov, M., Lin, A. and Gregor, T. (2013). Quantitative imaging of transcription in living *Drosophila* embryos links polymerase activity to patterning. *Curr. Biol.* **23**, 2140–2145.
- Garin, É., Lemieux, M., Coulombe, Y., Robinson, G. W. and Jeannotte, L. (2006).

- StromalHoxa5 function controls the growth and differentiation of mammary alveolar epithelium. *Dev. Dyn.* **235**, 1858–1871.
- Gaspar, I. and Ephrussi, A.** (2015). Strength in numbers: Quantitative single-molecule RNA detection assays. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **4**, 135–150.
- Gautier, A., Juillerat, A., Heinis, C., Corrêa, I. R., Kindermann, M., Beaufils, F. and Johnsson, K.** (2008). An Engineered Protein Tag for Multiprotein Labeling in Living Cells. *Chem. Biol.* **15**, 128–136.
- Gavalas, A., Davenne, M., Lumsden, A., Chambon, P. and Rijli, F. M.** (1997). Role of Hoxa-2 in axon pathfinding and rostral hindbrain patterning. *Development* **124**,.
- Gavis, E. R. and Hogness, D. S.** (1991). Phosphorylation, expression and function of the Ultrabithorax protein family in *Drosophila melanogaster*. *Development* **112**,.
- Gemkow, M. J., Verveer, P. J. and Arndt-Jovin, D. J.** (1998). Homologous association of the Bithorax-Complex during embryogenesis: consequences for transvection in *Drosophila melanogaster*. *Development* **125**,.
- Gentz, R., Rauscher, F. J., Abate, C. and Curran, T.** (1989). Parallel association of Fos and Jun leucine zippers juxtaposes DNA binding domains. *Science (80-)*. **243**, 1695–1699.
- Georgieva, M., Cattoni, D. I., Fiche, J.-B., Mutin, T., Chamousset, D. and Nollmann, M.** (2016). Nanometer resolved single-molecule colocalization of nuclear factors by two-color super resolution microscopy imaging. *Methods* **105**, 44–55.
- Germier, T., Kocanova, S., Walther, N., Bancaud, A., Shaban, H. A., Sellou, H., Politi, A., Ellenberg, J., Gallardo, F. and Bystricky, K.** (2017). Real-time chromatin dynamics at the single gene level during transcription activation. *bioRxiv* 111179.
- Gesson, K., Rescheneder, P., Skoruppa, M. P., Von Haeseler, A., Dechat, T. and Foisner, R.** (2016). A-type Lamins bind both hetero- and euchromatin, the latter being regulated by lamina-associated polypeptide 2 alpha. *Genome Res.* **26**, 462–473.
- Ghavi-Helm, Y., Klein, F. A., Pakozdi, T., Ciglar, L., Noordermeer, D., Huber, W. and Furlong, E. E. M.** (2014). Enhancer loops appear stable during development and are associated with paused polymerase. *Nature* **512**, 96–100.
- Ghiselin, M. T.** (2001). Shaking the Tree: Readings from Nature in the History of Life . Henry Gee. *Q. Rev. Biol.* **76**, 71–71.
- Gibson, G., Schier, A., LeMotte, P. and Gehring, W. J.** (1990). The specificities of sex combs reduced and Antennapedia are defined by a distinct portion of each protein that includes the homeodomain. *Cell* **62**, 1087–1103.

- Gilchrist, D. A., Dos Santos, G., Fargo, D. C., Xie, B., Gao, Y., Li, L. and Adelman, K. (2010). Pausing of RNA polymerase II disrupts DNA-specified nucleosome organization to enable precise gene regulation. *Cell* **143**, 540–551.
- Gilchrist, D. A., Fromm, G., dos Santos, G., Pham, L. N., Mcdaniel, I. E., Burkholder, A., Fargo, D. C. and Adelman, K. (2012). Regulating the regulators: The pervasive effects of Pol II pausing on stimulus-responsive gene networks. *Genes Dev.* **26**, 933–944.
- Giot, L., Bader, J. S., Brouwer, C., Chaudhuri, A., Kuang, B., Li, Y., Hao, Y. L., Ooi, C. E., Godwin, B., Vitols, E., et al. (2003). A Protein Interaction Map of *Drosophila melanogaster*. *Science (80-)*. **302**, 1727–1736.
- Godwin, A. R. and Capecchi, M. R. (1998). Hoxc13 mutant mice lack external hair. *Genes Dev.* **12**, 11–20.
- Goh, K. II, Cusick, M. E., Valle, D., Childs, B., Vidal, M. and Barabási, A. L. (2007). The human disease network. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 8685–8690.
- Goldberg, M. W., Huttenlauch, I., Hutchison, C. J. and Stick, R. (2008). Filaments made from A- and B-type lamins differ in structure and organization. *J. Cell Sci.* **121**, 215–225.
- Gomez-Lamarca, M. J., Falo-Sanjuan, J., Stojnic, R., Abdul Rehman, S., Muresan, L., Jones, M. L., Pillidge, Z., Cerda-Moya, G., Yuan, Z., Baloul, S., et al. (2018). Activation of the Notch Signaling Pathway In Vivo Elicits Changes in CSL Nuclear Dynamics. *Dev. Cell* **44**, 611-623.e7.
- Gong, C., Song, E., Codogno, P. and Mehrpour, M. (2012). The roles of BECN1 and autophagy in cancer are context dependent. *Autophagy* **8**, 1853–5.
- González-Crespo, S. and Morata, G. (1996). Genetic evidence for the subdivision of the arthropod limb into coxopodite and telopodite. *Development* **122**, 3921–8.
- González-Crespo, S., Abu-Shaar, M., Torres, M., Martínez-A, C., Mann, R. S. and Morata, G. (1998). Antagonism between extradenticle function and Hedgehog signalling in the developing limb. *Nature* **394**, 196–200.
- Gonzalez, T. F. (1985). Clustering to minimize the maximum intercluster distance. *Theor. Comput. Sci.* **38**, 293–306.
- Göttfert, F., Wurm, C. A., Mueller, V., Berning, S., Cordes, V. C., Honigmann, A. and Hell, S. W. (2013). Coaligned dual-channel STED nanoscopy and molecular diffusion analysis at 20 nm resolution. *Biophys. J.* **105**, L01–L03.
- Grande, M. A., van der Kraan, I., de Jong, L. and van Driel, R. (1997a). Nuclear distribution of transcription factors in relation to sites of transcription and RNA polymerase II. *J. Cell Sci.* **110**.
- Grande, M. A., van der Kraan, I., de Jong, L., van Driel, R. and Marjolein A. Grande, Ineke van der Kraan, L. de J. and R. van D. (1997b). *Nuclear distribution of transcription factors in relation to sites of transcription and*

RNA polymerase II.

- Griffin, B. A., Adams, S. R. and Tsien, R. Y. (1998). Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science (80-.)*. **281**, 269–272.
- Griffith, J. D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R. M., Bianchi, A., Moss, H. and De Lange, T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* **97**, 503–514.
- Grimaud, C., Bantignies, F., Pal-Bhadra, M., Ghana, P., Bhadra, U. and Cavalli, G. (2006). RNAi components are required for nuclear clustering of polycomb group response elements. *Cell* **124**, 957–971.
- Grimm, J. B., English, B. P., Chen, J., Slaughter, J. P., Zhang, Z., Revyakin, A., Patel, R., Macklin, J. J., Normanno, D., Singer, R. H., et al. (2015). A general method to improve fluorophores for live-cell and single-molecule microscopy. *Cell* **163**, 244–250.
- Gu, B., Swigut, T., Spencley, A., Bauer, M. R., Chung, M., Meyer, T. and Wysocka, J. (2018). Transcription-coupled changes in nuclear mobility of mammalian cis-regulatory elements. *Science (80-.)*. **359**, 1050–1055.
- Guelen, L., Pagie, L., Brasset, E., Meuleman, W., Faza, M. B., Talhout, W., Eussen, B. H., De Klein, A., Wessels, L., De Laat, W., et al. (2008). Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature* **453**, 948–951.
- Guenther, M. G. and Young, R. A. (2012). Grounded: Transcriptional Pausing in Naive mESCs.
- Guitton, A. E. and Berger, F. (2005). Control of reproduction by Polycomb Group complexes in animals and plants. *Int. J. Dev. Biol.* **49**, 707–716.
- Gullberg, M., Gústafsdóttir, S. M., Schallmeiner, E., Jarvius, J., Bjarnegård, M., Betsholtz, C., Landegren, U. and Fredriksson, S. (2004). Cytokine detection by antibody-based proximity ligation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 8420–8424.
- Guo, Y., Kim, Y., Shimi, T., Goldman, R. D. and Zheng, Y. (2014). Concentration-dependent lamin assembly and its roles in the localization of other nuclear proteins. *Mol. Biol. Cell* **25**, 1287–1297.
- Gupta, G. D., Coyaud, É., Gonçalves, J., Mojarad, B. A., Liu, Y., Wu, Q., Gheiratmand, L., Comartin, D., Tkach, J. M., Cheung, S. W. T., et al. (2015). A Dynamic Protein Interaction Landscape of the Human Centrosome-Cilium Interface. *Cell* **163**, 1484–1499.
- Gustafsson, M. G. L. (2000). *Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy.*
- Gustafsson, M. G. L. (2005). Nonlinear structured-illumination microscopy: Wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. *Proc. Natl.*

Acad. Sci. U. S. A. **102**, 13081–13086.

- Gustafsson, M. G. L., Shao, L., Carlton, P. M., Wang, C. J. R., Golubovskaya, I. N., Cande, W. Z., Agard, D. A. and Sedat, J. W. (2008). Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination. *Biophys. J.* **94**, 4957–4970.
- Ha, T., Schnorrenberg, S., Grotjohann, T., Vorbrüggen, G., Herzig, A., Hell, S. W. and Jakobs, S. (2016). In vivo super-resolution RESOLFT microscopy of *Drosophila melanogaster*.
- Haarhuis, J. H. I., van der Weide, R. H., Blomen, V. A., Yáñez-Cuna, J. O., Amendola, M., van Ruiten, M. S., Krijger, P. H. L., Teunissen, H., Medema, R. H., van Steensel, B., et al. (2017). The Cohesin Release Factor WAPL Restricts Chromatin Loop Extension. *Cell* **169**, 693-707.e14.
- Haberle, V. and Lenhard, B. (2016). *Promoter Architectures and Developmental Gene Regulation*.
- Hajj, B., Wisniewski, J., Beheiry, M. El, Chen, J., Revyakin, A., Wu, C. and Dahan, M. (2014). Whole-cell, multicolor superresolution imaging using volumetric multifocus microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 17480–17485.
- Hales, K. G., Korey, C. A., Larracuenta, A. M. and Roberts, D. M. (2015). Genetics on the fly: A primer on the drosophila model system. *Genetics* **201**, 815–842.
- Hall, L. L., Smith, K. P., Byron, M. and Lawrence, J. B. (2006). Molecular anatomy of a speckle. In *Anatomical Record - Part A Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, pp. 664–675. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*.
- Haller, K., Rambaldi, I., Daniels, E. and Featherstone, M. (2004). Subcellular localization of multiple PREP2 isoforms is regulated by actin, tubulin, and nuclear export. *J. Biol. Chem.* **279**, 49384–49394.
- Hamdan, F. F., Percherancier, Y., Breton, B. and Bouvier, M. (2006). Monitoring Protein-Protein Interactions in Living Cells by Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET). *Curr. Protoc. Neurosci.* **34**, 5.23.1-5.23.20.
- Hansen, J. C. (2002). Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: Determinants, mechanisms, and functions. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **31**, 361–392.
- Harborth, J., Elbashir, S. M., Bechert, K., Tuschl, T. and Weber, K. (2001). Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J. Cell Sci.* **114**.
- Harr, J. C., Schmid, C. D., Muñoz-Jiménez, C., Romero-Bueno, R., Kalck, V., Gonzalez-Sandoval, A., Hauer, M. H., Padeken, J., Askjaer, P., Mattout, A., et al. (2020). Loss of an H3K9me anchor rescues laminopathy-linked changes in nuclear organization and muscle function in an Emery-Dreifuss muscular dystrophy model. *Genes Dev.* **34**, 560–579.

- Harrigan, J. A., Belotserkovskaya, R., Coates, J., Dimitrova, D. S., Polo, S. E., Bradshaw, C. R., Fraser, P. and Jackson, S. P. (2011). Replication stress induces 53BP1-containing OPT domains in G1 cells. *J. Cell Biol.* **193**, 97–108.
- Hatzis, P. and Talianidis, I. (2002). Dynamics of enhancer-promoter communication during differentiation-induced gene activation. *Mol. Cell* **10**, 1467–1477.
- Hausmann, M., Winkler, R., Hildenbrand, G., Finsterle, J., Weisel, A., Rapp, A., Schmitt, E., Janz, S. and Cremer, C. (2003). COMBO-FISH: Specific labeling of non-denatured chromatin targets by computer-selected DNA oligonucleotide probe combinations. *Biotechniques* **35**, 564–577.
- Hay, D., Hughes, J. R., Babbs, C., Davies, J. O. J., Graham, B. J., Hanssen, L. L. P., Kassouf, M. T., Oudelaar, A. M., Sharpe, J. A., Suci, M. C., et al. (2016). Genetic dissection of the α -globin super-enhancer in vivo. *Nat. Genet.* **48**, 895–903.
- Hayashi, S. and Scott, M. P. (1990). What determines the specificity of action of Drosophila homeodomain proteins? *Cell* **63**, 883–894.
- He, S., del Viso, F., Chen, C.-Y., Ikmi, A., Kroesen, A. E. and Gibson, M. C. (2018). An axial Hox code controls tissue segmentation and body patterning in *Nematostella vectensis*. *Science (80-)*. **361**, 1377–1380.
- Heard, E. (2005). Delving into the diversity of facultative heterochromatin: The epigenetics of the inactive X chromosome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **15**, 482–489.
- Heckl, D. and Charpentier, E. (2015). Toward Whole-Transcriptome Editing with CRISPR-Cas9. *Mol. Cell* **58**, 560–562.
- Heidbreder, M., Zander, C., Malkusch, S., Widera, D., Kaltschmidt, B., Kaltschmidt, C., Nair, D., Choquet, D., Sibarita, J. B. and Heilemann, M. (2012). TNF- α influences the lateral dynamics of TNF receptor I in living cells. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1823**, 1984–1989.
- Heilemann, M., Van De Linde, S., Schüttpelz, M., Kasper, R., Seefeldt, B., Mukherjee, A., Tinnefeld, P. and Sauer, M. (2008). Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **47**, 6172–6176.
- Hell, S. W., Sahl, S. J., Bates, M., Zhuang, X., Heintzmann, R., Booth, M. J., Bewersdorf, J., Shtengel, G., Hess, H., Tinnefeld, P., et al. (2015). The 2015 super-resolution microscopy roadmap. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **48**, 443001.
- HELL, S., Reiner, G., CREMER, C. and Stelzer, E. H. K. (1993). Aberrations in confocal fluorescence microscopy induced by mismatches in refractive index. *J. Microsc.* **169**, 391–405.
- Henderson, K. D. and Andrew, D. J. (2000). Regulation and function of Scr, exd, and hth in the Drosophila salivary gland. *Dev. Biol.* **217**, 362–374.

- Henriques, R., Griffiths, C., Hesper Rego, E. and Mhlanga, M. M. (2011). PALM and STORM: Unlocking live-cell super-resolution. *Biopolymers* **95**, 322–331.
- Hernandez, N. (1992). 11 Transcription of Vertebrate snRNA Genes and Related Genes. *Cold Spring Harb. Monogr. Arch.* **22**, 281–313.
- Hess, S. T., Girirajan, T. P. K. K. and Mason, M. D. (2006). Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy. *Biophys. J.* **91**, 4258–4272.
- Hihara, S., Pack, C. G., Kaizu, K., Tani, T., Hanafusa, T., Nozaki, T., Takemoto, S., Yoshimi, T., Yokota, H., Imamoto, N., et al. (2012). Local Nucleosome Dynamics Facilitate Chromatin Accessibility in Living Mammalian Cells. *Cell Rep.* **2**, 1645–1656.
- Hirvonen, L. M., Wicker, K., Mandula, O. and Heintzmann, R. (2009). Structured illumination microscopy of a living cell. *Eur. Biophys. J.* **38**, 807–812.
- Hnisz, D., Abraham, B. J., Lee, T. I., Lau, A., Saint-André, V., Sigova, A. A., Hoke, H. A. and Young, R. A. (2013). XSuper-enhancers in the control of cell identity and disease. *Cell* **155**, 934.
- Hnisz, D., Shrinivas, K., Young, R. A., Chakraborty, A. K. and Sharp, P. A. (2017). A Phase Separation Model for Transcriptional Control. *Cell* **169**, 13–23.
- Hong, J. W., Hendrix, D. A. and Levine, M. S. (2008). Shadow enhancers as a source of evolutionary novelty. *Science (80-)*. **321**, 1314.
- Horikoshi, M., Carey, M. F., Kakidani, H. and Roeder, R. G. (1988). Mechanism of action of a yeast activator: Direct effect of GAL4 derivatives on mammalian TFIID-promoter interactions. *Cell* **54**, 665–669.
- Hou, C., Li, L., Qin, Z. S. and Corces, V. G. (2012). Gene Density, Transcription, and Insulators Contribute to the Partition of the Drosophila Genome into Physical Domains. *Mol. Cell* **48**, 471–484.
- Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F. A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E. J., Wu, X., Shalem, O., et al. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol.* **31**, 827–832.
- Hu, C. D. and Kerppola, T. K. (2003). Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nat. Biotechnol.* **21**, 539–545.
- Hu, C. D., Chinenov, Y. and Kerppola, T. K. (2002). Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol. Cell* **9**, 789–798.
- Huang, H., Paliouras, M., Rambaldi, I., Lasko, P. and Featherstone, M. (2003). Nonmuscle Myosin Promotes Cytoplasmic Localization of PBX. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 3636–3645.

- Hudry, B., Viala, S., Graba, Y. and Merabet, S.** (2011). Visualization of protein interactions in living *Drosophila* embryos by the bimolecular fluorescence complementation assay. *BMC Biol.*
- Hudry, B., Remacle, S., Delfini, M. C., Rezsöházy, R., Graba, Y. and Merabet, S.** (2012). Hox proteins display a common and ancestral ability to diversify their interaction mode with the pbc class cofactors. *PLoS Biol.* **10**, 1001351.
- Hudry, B., Thomas-Chollier, M., Volovik, Y., Duffraisse, M., Dard, A., Frank, D., Technau, U. and Merabet, S.** (2014). Molecular insights into the origin of the Hox-TALE patterning system. *Elife* **2014**,.
- Hueber, S. D. and Lohmann, I.** (2008). Shaping segments: Hox gene function in the genomic age. *Bioessays* **30**, 965–79.
- Hueber, S. D., Bezdán, D., Henz, S. R., Blank, M., Wu, H. and Lohmann, I.** (2007). Comparative analysis of Hox downstream genes in *Drosophila*. *Development* **134**, 381–392.
- Hueber, S. D., Rauch, J., Djordjevic, M. A., Gunter, H., Weiller, G. F. and Frickey, T.** (2013). Analysis of central Hox protein types across bilaterian clades: On the diversification of central Hox proteins from an Antennapedia/Hox7-like protein. *Dev. Biol.* **383**, 175–185.
- Hug, C. B., Grimaldi, A. G., Kruse, K. and Vaquerizas, J. M.** (2017). Chromatin Architecture Emerges during Zygotic Genome Activation Independent of Transcription. *Cell* **169**, 216-228.e19.
- Irianto, J., Pfeifer, C. R., Ivanovska, I. L., Swift, J. and Discher, D. E.** (2016). Nuclear lamins in cancer. *Cell. Mol. Bioeng.* **9**, 258–267.
- Jacobs, Y., Schnabel, C. A. and Cleary, M. L.** (1999). Trimeric Association of Hox and TALE Homeodomain Proteins Mediates Hoxb2 Hindbrain Enhancer Activity. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 5134–5142.
- Jaffe, L., Ryoo, H. D. and Mann, R. S.** (1997). A role for phosphorylation by casein kinase II in modulating antennapedia activity in *Drosophila*. *Genes Dev.* **11**, 1327–1340.
- Jiang, P. and Mizushima, N.** (2014). Autophagy and human diseases. *Cell Res.* **24**, 69–79.
- Jiang, Y., Shi, H., Amin, N. M., Sultan, I. and Liu, J.** (2008). Mesodermal expression of the *C. elegans* HMX homolog mls-2 requires the PBC homolog CEH-20. *Mech. Dev.* **125**, 451–461.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A. and Charpentier, E.** (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (80-.)*. **337**, 816–821.
- Johansson, J. A. and Headon, D. J.** (2014). Regionalisation of the skin. *Semin. Cell Dev. Biol.* **25–26**, 3–10.

- Johnston, R. J. and Desplan, C.** (2014). Interchromosomal communication coordinates intrinsically stochastic expression between alleles. *Science (80-.)*. **343**, 661–665.
- Jorgens, D. M., Inman, J. L., Wojcik, M., Robertson, C., Palsdottir, H., Tsai, W. T., Huang, H., Bruni-Cardoso, A., López, C. S., Bissell, M. J., et al.** (2017). Deep nuclear invaginations are linked to cytoskeletal filaments - integrated bioimaging of epithelial cells in 3D culture. *J. Cell Sci.* **130**, 177–189.
- Joshi, R., Passner, J. M., Rohs, R., Jain, R., Sosinsky, A., Crickmore, M. A., Jacob, V., Aggarwal, A. K., Honig, B. and Mann, R. S.** (2007). Functional Specificity of a Hox Protein Mediated by the Recognition of Minor Groove Structure. *Cell* **131**, 530–543.
- Jost, A. and Heintzmann, R.** (2013). Superresolution Multidimensional Imaging with Structured Illumination Microscopy. *Annu. Rev. Mater. Res.* **43**, 261–282.
- Jungmann, R., Avendaño, M. S., Woehrstein, J. B., Dai, M., Shih, W. M. and Yin, P.** (2014). Multiplexed 3D cellular super-resolution imaging with DNA-PAINT and Exchange-PAINT. *Nat. Methods* **11**, 313–318.
- Jungmann, R., Avendaño, M. S., Dai, M., Woehrstein, J. B., Agasti, S. S., Feiger, Z., Rodal, A. and Yin, P.** (2016). Quantitative super-resolution imaging with qPAINT. *Nat. Methods*.
- Jusuk, I., Vietz, C., Raab, M., Dammeyer, T. and Tinnefeld, P.** (2015). Super-Resolution Imaging Conditions for enhanced Yellow Fluorescent Protein (eYFP) Demonstrated on DNA Origami Nanorulers. *Sci. Rep.* **5**, 14075.
- Juven-Gershon, T. and Kadonaga, J. T.** (2010). Regulation of Gene Expression via the Core Promoter and the Basal Transcriptional Machinery. *Dev. Biol.*
- Kachgal, S., Mace, K. A. and Boudreau, N. J.** (2012). The dual roles of homeobox genes in vascularization and wound healing. *Cell Adhes. Migr.* **6**, 457–470.
- Kagey, M. H., Newman, J. J., Bilodeau, S., Zhan, Y., Orlando, D. A., Van Berkum, N. L., Ebmeier, C. C., Goossens, J., Rahl, P. B., Levine, S. S., et al.** (2010). Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature* **467**, 430–435.
- Kanca, O., Zirin, J., Garcia-Marques, J., Knight, S. M., Yang-Zhou, D., Amador, G., Chung, H., Zuo, Z., Ma, L., He, Y., et al.** (2019). An efficient CRISPR-based strategy to insert small and large fragments of DNA using short homology arms. *Elife* **8**.
- Karoutas, A., Szymanski, W., Rausch, T., Guhathakurta, S., Rog-Zielinska, E. A., Peyronnet, R., Seyfferth, J., Chen, H. R., de Leeuw, R., Herquel, B., et al.** (2019). The NSL complex maintains nuclear architecture stability via lamin A/C acetylation. *Nat. Cell Biol.* **21**, 1248–1260.
- Kataoka, K., Yoshitomo-Nakagawa, K., Shioda, S. and Nishizawa, M.** (2001). A set of Hox proteins interact with the Maf oncoprotein to inhibit its DNA binding,

- transactivation, and transforming activities. *J. Biol. Chem.* **276**, 819–826.
- Keleher, C. A., Goutte, C. and Johnson, A. D.** (1988). *The Yeast Cell-Type-Specific Repressor Acts Cooperatively with a Non-Cell-Type-Specific Protein.*
- Keppler, A., Gendreizig, S., Gronemeyer, T., Pick, H., Vogel, H. and Johnsson, K.** (2003). A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo. *Nat. Biotechnol.* **21**, 86–89.
- Keppler, A., Pick, H., Arrivoli, C., Vogel, H. and Johnsson, K.** (2004). Labeling of fusion proteins with synthetic fluorophores in live cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 9955–9959.
- Kerppola, T. K.** (2008). Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) Analysis as a Probe of Protein Interactions in Living Cells. *Annu. Rev. Biophys.* **37**, 465–487.
- Kerppola, T. K.** (2009). Visualization of molecular interactions using bimolecular fluorescence complementation analysis: Characteristics of protein fragment complementation. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 2876–2886.
- Khan, A. O., Simms, V. A., Pike, J. A., Thomas, S. G. and Morgan, N. V.** (2017). CRISPR-Cas9 Mediated Labelling Allows for Single Molecule Imaging and Resolution. *Sci. Rep.* **7**, 1–9.
- Kim, D. I. and Roux, K. J.** (2016). Filling the Void: Proximity-Based Labeling of Proteins in Living Cells. *Trends Cell Biol.* **26**, 804–817.
- Kim, J., Wojcik, M., Wang, Y., Moon, S., Zin, E. A., Marnani, N., Newman, Z. L., Flannery, J. G., Xu, K. and Zhang, X.** (2019). Oblique-plane single-molecule localization microscopy for tissues and small intact animals. *Nat. Methods* **16**, 853–857.
- Kishino, A. and Yanagida, T.** (1988). Force measurements by micromanipulation of a single actin filament by glass needles. *Nature* **334**, 74–76.
- Klapper, M., Exner, K., Kempf, A., Gehrig, C., Stuurman, N., Fisher, P. A. and Krohne, G.** (1997). *Authors' correction Assembly of A- and B-type lamins studied in vivo with the baculovirus system.*
- Klar, T. A. and Hell, S. W.** (1999). Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy. *Opt. Lett.* **24**, 954.
- Klar, T. A., Jakobs, S., Dyba, M., Egner, A. and Hell, S. W.** (2000). Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 8206–8210.
- Kleckner, N. and Weiner, B. M.** (1993). Potential advantages of unstable interactions for pairing of chromosomes in meiotic, somatic, and premeiotic cells. In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, pp. 553–565. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Klein, T., Löschberger, A., Proppert, S., Wolter, S., van de Linde, S. and Sauer, M. (2010). Live-cell dSTORM with SNAP-tag fusion proteins. *Nat. Methods* **8**, 7–9.
- Klug, A. and Rhodes, D. (1987). Zinc fingers: A novel protein fold for nucleic acid recognition. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **52**, 473–482.
- Kner, P., Chhun, B. B. and Griffis, E. R. (2008). Super-resolution video microscopy of live cells by structured illumination. *Nat. Methods* **6**, .
- Kochin, V., Shimi, T., Torvaldson, E., Adam, S. A., Goldman, A., Pack, C. G., Melo-Cardenas, J., Imanishi, S. Y., Goldman, R. D. and Eriksson, J. E. (2014). Interphase phosphorylation of lamin A. *J. Cell Sci.* **127**, 2683–2696.
- Kodama, Y. and Hu, C. D. (2012). Bimolecular fluorescence complementation (BiFC): A 5-year update and future perspectives. *Biotechniques*.
- Konig, K. (2000). *Multiphoton microscopy in life sciences*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Kornfeld, K., Saint, R. B., Beachy, P. A., Harte, P. J., Peattie, D. A. and Hogness, D. S. (1989). Structure and expression of a family of Ultrabithorax mRNAs generated by alternative splicing and polyadenylation in *Drosophila*. *Genes Dev.* **3**, 243–258.
- Korzhevskii, D. E., Gusel'nikova, V. V., Kirik, O. V., Sukhorukova, E. G. and Grigorev, I. P. (2017). The Spatial Organization of the Intranuclear Structures of Human Brain Dopaminergic Neurons. *Acta Naturae* **9**, 81.
- Kosak, S. T., Skok, J. A., Medina, K. L., Riblet, R., Le Beau, M. M., Fisher, A. G. and Singh, H. (2002). Subnuclear compartmentalization of immunoglobulin loci during lymphocyte development. *Science (80-)*. **296**, 158–162.
- Kribelbauer, J. F., Loker, R. E., Feng, S., Rastogi, C., Abe, N., Rube, H. T., Bussemaker, H. J. and Mann, R. S. (2020). Context-Dependent Gene Regulation by Homeodomain Transcription Factor Complexes Revealed by Shape-Readout Deficient Proteins. *Mol. Cell* **78**, 152-167.e11.
- Krufczik, M., Sievers, A., Hausmann, A., Lee, J. H., Hildenbrand, G., Schaufler, W. and Hausmann, M. (2017). Combining low temperature fluorescence DNA-hybridization, immunostaining, and super-resolution localization microscopy for nano-structure analysis of ALU elements and their influence on chromatin structure. *Int. J. Mol. Sci.*
- Krumlauf, R. (1994). Hox genes in vertebrate development. *Cell* **78**, 191–201.
- Küpper, K., Kölbl, A., Biener, D., Dittrich, S., von Hase, J., Thormeyer, T., Fiegler, H., Carter, N. P., Speicher, M. R., Cremer, T., et al. (2007). Radial chromatin positioning is shaped by local gene density, not by gene expression. *Chromosoma* **116**, 285–306.
- Kvon, E. Z., Kazmar, T., Stampfel, G., Yáñez-Cuna, J. O., Pagani, M., Schernhuber, K., Dickson, B. J. and Stark, A. (2014). Genome-scale functional

- characterization of *Drosophila* developmental enhancers in vivo. *Nature* **512**, 91–95.
- La Celle, P. T. and Polakowska, R. R.** (2001). Human Homeobox HOXA7 Regulates Keratinocyte Transglutaminase Type 1 and Inhibits Differentiation. *J. Biol. Chem.* **276**, 32844–32853.
- Lafarga, M., Berciano, M. T., Pena, E., Mayo, I., Castaño, J. G., Bohmann, D., Rodrigues, J. P., Tavanez, J. P. and Carmo-Fonseca, M.** (2002). Clastosome: A subtype of nuclear body enriched in 19S and 20S proteasomes, ubiquitin, and protein substrates of proteasome. *Mol. Biol. Cell* **13**, 2771–2782.
- Lagha, M., Bothma, J. P., Esposito, E., Ng, S., Stefanik, L., Tsui, C., Johnston, J., Chen, K., Gilmour, D. S., Zeitlinger, J., et al.** (2013). XPaused Pol II coordinates tissue morphogenesis in the *drosophila* embryo. *Cell* **153**, 976.
- Laine, R. F., Albecka, A., Van De Linde, S., Rees, E. J., Crump, C. M. and Kaminski, C. F.** (2015). Structural analysis of herpes simplex virus by optical super-resolution imaging. *Nat. Commun.*
- Lam, M. T. Y., Li, W., Rosenfeld, M. G. and Glass, C. K.** (2014). Enhancer RNAs and regulated transcriptional programs. *Trends Biochem. Sci.* **39**, 170–182.
- Lamond, A. I. and Earnshaw, W. C.** (1998). Structure and function in the nucleus. *Science (80-)*. **280**, 547–553.
- Landschulz, W. H., Johnson, P. F. and McKnight, S. L.** (1989). The DNA binding domain of the rat liver nuclear protein C/EBP is bipartite. *Science (80-)*. **243**, 1681–1688.
- LaRonde-LeBlanc, N. A. and Wolberger, C.** (2003). Structure of HoxA9 and Pbx1 bound to DNA: Hox hexapeptide and DNA recognition anterior to posterior. *Genes Dev.* **17**, 2060–2072.
- Larson, A. G., Elnatan, D., Keenen, M. M., Trnka, M. J., Johnston, J. B., Burlingame, A. L., Agard, D. A., Redding, S. and Narlikar, G. J.** (2017). Liquid droplet formation by HP1 α suggests a role for phase separation in heterochromatin. *Nature* **547**, 236–240.
- Latchman, D. S.** (1990). *Eukaryotic transcription factors*.
- Latchman, D. S.** (1993). *Transcription factors: an overview Function of transcription factors*.
- Laughon, A. and Scott, M. P.** (1984). Sequence of a *Drosophila* segmentation gene: Protein structure homology with DNA-binding proteins. *Nature* **310**, 25–31.
- Le Dily, F. L., Baù, D., Pohl, A., Vicent, G. P., Serra, F., Soronellas, D., Castellano, G., Wright, R. H. G., Ballare, C., Filion, G., et al.** (2014). Distinct structural transitions of chromatin topological domains correlate with coordinated hormone-induced gene regulation. *Genes Dev.* **28**, 2151–2162.

- Lee, G. M., Donaldson, L. W., Pufall, M. A., Kang, H. S., Pot, I., Graves, B. J. and McIntosh, L. P. (2005). The structural and dynamic basis of Ets-1 DNA binding autoinhibition. *J. Biol. Chem.* **280**, 7088–7099.
- Lee, Y. R., Park, J. H., Hahm, S. H., Kang, L. W., Chung, J. H., Nam, K. H., Hwang, K. Y., Kwon, I. C. and Han, Y. S. (2010). Development of bimolecular fluorescence complementation using dropa for visualization of protein-protein interactions in cells. *Mol. Imaging Biol.* **12**, 468–478.
- Lee, A., Rosenbloom, A. B., Lee, S.-H. and Bustamante, C. (2014). Super-Resolution Imaging of Protein-Protein Interactions by Bimolecular Complementation of Photoactivatable Fluorescent Proteins. *Biophys. J.* **106**, 25a.
- Legant, W. R., Shao, L., Grimm, J. B., Brown, T. A., Milkie, D. E., Avants, B. B., Lavis, L. D. and Betzig, E. (2016). High-density three-dimensional localization microscopy across large volumes. *Nat. Methods* **13**,.
- Lehnertz, B., Pabst, C., Su, L., Miller, M., Liu, F., Yi, L., Zhang, R., Krosl, J., Yung, E., Kirschner, J., et al. (2014). The methyltransferase G9a regulates HoxA9-dependent transcription in AML. *Genes Dev.* **28**, 317–327.
- Lelli, K. M., Noro, B., Mann, R. S. and Eric Davidson, by H. (2011). Variable motif utilization in homeotic selector (Hox) – cofactor complex formation controls specificity. *PNAS*.
- Lemaître, C. and Bickmore, W. A. (2015). Chromatin at the nuclear periphery and the regulation of genome functions. *Histochem Cell Biol* **144**, 111–122.
- Lemmer, P., Gunkel, M., Baddeley, D., Kaufmann, R., Urich, A., Weiland, Y., Reymann, J., Müller, P., Hausmann, M. and Cremer, C. (2008). SPDM: Light microscopy with single-molecule resolution at the nanoscale. *Appl. Phys. B Lasers Opt.* **93**, 1–12.
- Lemmer, P., Gunkel, M., Weiland, Y., Müller, P., Baddeley, D., Kaufmann, R., Urich, A., Eipel, H., Amberger, R., Hausmann, M., et al. (2009). Using conventional fluorescent markers for far-field fluorescence localization nanoscopy allows resolution in the 10-nm range. *J. Microsc.* **235**, 163–171.
- Lepore, A., Taylor, H., Landgraf, D., Okumus, B., Jaramillo-Riveri, S., McLaren, L., Bakshi, S., Paulsson, J. and Karoui, M. El (2019). Quantification of very low-abundant proteins in bacteria using the HaloTag and epi-fluorescence microscopy. *Sci. Rep.* **9**,.
- Lewis, E. B. (1978). A Gene Complex Controlling Segmentation in Drosophila. In *Genes, Development and Cancer*, pp. 205–217. Boston, MA: Springer US.
- Li, J. and Gilmour, D. S. (2013). Distinct mechanisms of transcriptional pausing orchestrated by GAGA factor and M1BP, a novel transcription factor. *EMBO J.* **32**, 1829–1841.
- Li, H. and Vaughan, J. C. (2018). Switchable Fluorophores for Single-Molecule

- Localization Microscopy. *Chem. Rev.* **118**, 9412–9454.
- Li, X. Y., Thomas, S., Sabo, P. J., Eisen, M. B., Stamatoyannopoulos, J. A. and Biggin, M. D. (2011). The role of chromatin accessibility in directing the widespread, overlapping patterns of *Drosophila* transcription factor binding. *Genome Biol.* **12**, 1–17.
- Li, J., Dong, A., Saydaminova, K., Chang, H., Wang, G., Ochiai, H., Yamamoto, T. and Pertsinidis, A. (2019). Single-Molecule Nanoscopy Elucidates RNA Polymerase II Transcription at Single Genes in Live Cells. *Cell* **178**, 491–506.e28.
- Licht, J. D., Grossel, M. J., Figge, J. and Hansen, U. M. (1990). *Drosophila* Krüppel protein is a transcriptional repressor. *Nature* **346**, 76–79.
- Lin, L. and McGinnis, W. (1992). Mapping functional specificity in the *Dfd* and *Ubx* homeo domains. *Genes Dev.* **6**, 1071–1081.
- Lin, C., Garrett, A. S., de Kumar, B., Smith, E. R., Gogol, M., Seidel, C., Krumlauf, R. and Shilatifard, A. (2011a). Dynamic transcriptional events in embryonic stem cells mediated by the super elongation complex (SEC). *Genes Dev.* **25**, 1486–1498.
- Lin, M., Zhou, X., Shen, X., Mao, C. and Chen, X. (2011b). The predicted Arabidopsis interactome resource and network topology-based systems biology analyses. *Plant Cell* **23**, 911–922.
- Liu, H., Strauss, T. J., Potts, M. B. and Cameron, S. (2006). Direct regulation of *egl-1* of programmed cell death by the Hox protein MAB-5 and CEH-20, a *C. elegans* homolog of Pbx1. *Development* **133**, 641–650.
- Liu, Z., Xing, D., Su, Q. P., Zhu, Y., Zhang, J., Kong, X., Xue, B., Wang, S., Sun, H., Tao, Y., et al. (2014a). Super-resolution imaging and tracking of protein-protein interactions in sub-diffraction cellular space. *Nat. Commun.* **5**.
- Liu, Z., Legant, W. R., Chen, B.-C. C., Li, L., Grimm, J. B., Lavis, L. D., Betzig, E. and Tjian, R. (2014b). 3D imaging of Sox2 enhancer clusters in embryonic stem cells. *Elife* **3**, e04236.
- Liu, Z., Lavis, L. D. and Betzig, E. (2015). Imaging Live-Cell Dynamics and Structure at the Single-Molecule Level. *Mol. Cell* **58**, 644–659.
- Lohmann, I., McGinnis, N., Bodmer, M. and McGinnis, W. (2002). The *Drosophila* Hox gene Deformed sculpts head morphology via direct regulation of the apoptosis activator reaper. *Cell* **110**, 457–466.
- Los, G. V., Darzins, A., Zimprich, C., Karassina, N., Learish, R., Mcdougall, M. G., Encell, L. P., Friedman-Ohana, R., Wood, M., Vidugiris, G., et al. (2008). HaloTag™ Interchangeable Labeling Technology for Cell Imaging, Protein Capture and Immobilization. *Promega* **89**, 1–5.
- Löschberger, A., Van De Linde, S., Dabauvalle, M.-C. C., Rieger, B., Heilemann,

- M., Krohne, G., Sauer, M., Lö Schberger, A., Van De Linde, S., Dabauvalle, M.-C. C., et al. (2012). Super-resolution imaging visualizes the eightfold symmetry of gp210 proteins around the nuclear pore complex and resolves the central channel with nanometer resolution. *J. Cell Sci.* **125**, 570–575.
- Lovén, J., Hoke, H. A., Lin, C. Y., Lau, A., Orlando, D. A., Vakoc, C. R., Bradner, J. E., Lee, T. I. and Young, R. A. (2013). Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers. *Cell* **153**, 320–334.
- Lucas, T., Ferraro, T., Roelens, B., De Las Heras Chanes, J., Walczak, A. M., Coppey, M. and Dostatni, N. (2013). Live imaging of bicoid-dependent transcription in *Drosophila* embryos. *Curr. Biol.* **23**, 2135–2139.
- Luker, K. E., Smith, M. C. P., Luker, G. D., Gammon, S. T., Piwnica-Worms, H. and Piwnica-Worms, D. (2004). Kinetics of regulated protein-protein interactions revealed with firefly luciferase complementation imaging in cells and living animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 12288–12293.
- Lukeš, T., Pospíšil, J., Fliegel, K., Lasser, T. and Hagen, G. M. (2018). Quantitative super-resolution single molecule microscopy dataset of YFP-tagged growth factor receptors. *Gigascience*.
- Luna-Zurita, L., Stirnimann, C. U., Glatt, S., Kaynak, B. L., Thomas, S., Baudin, F., Samee, M. A. H., He, D., Small, E. M., Mileikovsky, M., et al. (2016). Complex Interdependence Regulates Heterotypic Transcription Factor Distribution and Coordinates Cardiogenesis. *Cell* **164**, 999–1014.
- Lund, E., Oldenburg, A. R. and Collas, P. (2014). Enriched domain detector: a program for detection of wide genomic enrichment domains robust against local variations. *Nucleic Acids Res.* **42**, 92.
- Lund, E. G., Duband-Goulet, I., Oldenburg, A., Buendia, B. and Collas, P. (2015). Distinct features of lamin A-interacting chromatin domains mapped by Chip-sequencing from sonicated or micrococcal nuclease-digested chromatin. *Nucleus* **6**, 30–39.
- Luo, L., Yang, X., Takihara, Y., Knoetgen, H. and Kessel, M. (2004). The cell-cycle regulator geminin inhibits Hox function through direct and polycomb-mediated interactions. *Nature* **427**, 749–753.
- Luperchio, T., Sauria, M., Hoskins, V., Wong, X., DeBoy, E., Gaillard, M.-C., Tsang, P., Pekrun, K., Ach, R., Yamada, N., et al. (2018). The repressive genome compartment is established early in the cell cycle before forming the lamina associated domains. *bioRxiv* 481598.
- Ma, L., Yang, F. and Zheng, J. (2014). Application of fluorescence resonance energy transfer in protein studies. *J. Mol. Struct.* **1077**, 87–100.
- Ma, H., Tu, L. C., Naseri, A., Huisman, M., Zhang, S., Grunwald, D. and Pederson, T. (2016). CRI SPR-Cas9 nuclear dynamics and target recognition in living cells. *J. Cell Biol.* **214**, 529–537.

- Ma, H., Tu, L. C., Chung, Y. C., Naseri, A., Grunwald, D., Zhang, S. and Pederson, T. (2019). Cell cycle– and genomic distance–dependent dynamics of a discrete chromosomal region. *J. Cell Biol.* **218**, 1467–1477.
- Machida, S., Takizawa, Y., Ishimaru, M., Sugita, Y., Sekine, S., Nakayama, J. ichi, Wolf, M. and Kurumizaka, H. (2018). Structural Basis of Heterochromatin Formation by Human HP1. *Mol. Cell* **69**, 385–397.e8.
- Maeshima, K., Matsuda, T., Shindo, Y., Imamura, H., Tamura, S., Imai, R., Kawakami, S., Nagashima, R., Soga, T., Noji, H., et al. (2018). A Transient Rise in Free Mg²⁺ Ions Released from ATP-Mg Hydrolysis Contributes to Mitotic Chromosome Condensation. *Curr. Biol.* **28**, 444–451.e6.
- Maeshima, K., Tamura, S., Hansen, J. C. and Itoh, Y. (2020). Fluid-like chromatin: Toward understanding the real chromatin organization present in the cell. *Curr. Opin. Cell Biol.* **64**, 77–89.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Norville, J. E. and Church, G. M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science (80-)*. **339**, 823–826.
- Mandula, O., Kielhorn, M., Wicker, K., Krampert, G., Kleppe, I. and Heintzmann, R. (2012). Line scan - structured illumination microscopy super-resolution imaging in thick fluorescent samples. *Opt. Express* **20**, 24167.
- Manilal, S., Man, N. T. and Morris, G. E. (1998). Colocalization of emerin and lamins in interphase nuclei and changes during mitosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **249**, 643–647.
- Manley, S., Gillette, J. M., Patterson, G. H., Shroff, H., Hess, H. F., Betzig, E. and Lippincott-Schwartz, J. (2008). High-density mapping of single-molecule trajectories with photoactivated localization microscopy. *Nat. Methods* **5**, 155–157.
- Mann, R. S. and Affolter, M. (1998). Hox proteins meet more partners. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 423–429.
- Mann, R. S. and Chan, S. K. (1996). Extra specificity from extradenticle: The partnership between HOX and PBX/EXD homeodomain proteins. *Trends Genet.* **12**, 258–262.
- Mann, R. S. and Hogness, D. S. (1990). Functional dissection of ultrabithorax proteins in *D. melanogaster*. *Cell* **60**, 597–610.
- Mann, R. S. and Morata, G. (2000). The Developmental and Molecular Biology of Genes that Subdivide the Body of *Drosophila* . *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 243–271.
- Mann, R. S., Lelli, K. M. and Joshi, R. (2009). Chapter 3 Hox Specificity. Unique Roles for Cofactors and Collaborators. *Curr. Top. Dev. Biol.*
- Mannix, K. M., Starble, R. M., Kaufman, R. S. and Cooley, L. (2019). Proximity

labeling reveals novel interactomes in live *Drosophila* tissue.

- Marchetti, M., Fanti, L., Berloco, M. and Pimpinelli, S.** (2003). Differential expression of the *Drosophila* BX-C in polytene chromosomes in cells of larval fat bodies: A cytological approach to identifying in vivo targets of the homeotic Ubx, Abd-A and Abd-B proteins. *Development* **130**, 3683–3689.
- Maria I. Arnone and Eric H. Davidson** (1997). *The hardwiring of development: organization and function of genomic regulatory systems*.
- Markaki, Y., Smeets, D., Fiedler, S., Schmid, V. J., Schermelleh, L., Cremer, T. and Cremer, M.** (2012). The potential of 3D-FISH and super-resolution structured illumination microscopy for studies of 3D nuclear architecture: 3D structured illumination microscopy of defined chromosomal structures visualized by 3D (immuno)-FISH opens new perspectives for stud. *BioEssays*.
- Markstein, M., Markstein, P., Markstein, V. and Levine, M. S.** (2002). Genome-wide analysis of clustered Dorsal binding sites identifies putative target genes in the *Drosophila* embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 763–768.
- Marshall, M. R., Pattu, V., Halimani, M., Maier-Peuschel, M., Müller, M. L., Becherer, U., Hong, W., Hoth, M., Tschernig, T., Bryceson, Y. T., et al.** (2015). VAMP8-dependent fusion of recycling endosomes with the plasma membrane facilitates T lymphocyte cytotoxicity. *J. Cell Biol.* **210**, 135–151.
- Marx, V.** (2013). Is super-resolution microscopy right for you? *Nat. Methods* **10**, 1157–1163.
- Mattout, A., Cabianca, D. S. and Gasser, S. M.** (2015). Chromatin states and nuclear organization in development - a view from the nuclear lamina. *Genome Biol.* **16**,.
- McKee, B. D.** (2004). Homologous pairing and chromosome dynamics in meiosis and mitosis. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* **1677**, 165–180.
- McKinney, S. A., Murphy, C. S., Hazelwood, K. L., Davidson, M. W. and Looger, L. L.** (2009). A bright and photostable photoconvertible fluorescent protein. *Nat. Methods* **6**, 131–133.
- Merabet, S. and Galliot, B.** (2015). The TALE face of Hox proteins in animal evolution. *Front. Genet.* **6**,.
- Merabet, S. and Mann, R. S. R. S.** (2016). *To Be Specific or Not: The Critical Relationship Between Hox And TALE Proteins*.
- Merabet, S., Kambris, Z., Capovilla, M., Bérenger, H., Pradel, J. and Graba, Y.** (2003). The Hexapeptide and Linker Regions of the AbdA Hox Protein Regulate Its Activating and Repressive Functions. *Dev. Cell* **4**, 761–768.
- Merabet, S., Ebner, A. and Affolter, M.** (2005). The *Drosophila* Extradenticle and Homothorax selector proteins control branchless/FGF expression in mesodermal bridge-cells. *EMBO Rep.* **6**, 762–768.

- Merabet, S., Saadaoui, M., Sambrani, N., Hudry, B., Pradel, J., Affolter, M. and Graba, Y. (2007). A unique Extradenticle recruitment mode in the Drosophila Hox protein Ultrabithorax. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 16946–51.
- Merabet, S., Litim-Mecheri, I., Karlsson, D., Dixit, R., Saadaoui, M., Monier, B., Brun, C., Thor, S., Vijayraghavan, K., Perrin, L., et al. (2011). Insights into Hox Protein Function from a Large Scale Combinatorial Analysis of Protein Domains. *PLoS Genet.* **7**, e1002302.
- Mercader, N., Leonardo, E., Piedra, M. E., Martinez-A., C., Ros, M. A. and Torres, M. (2000). Opposing RA and FGF signals control proximodistal vertebrate limb development through regulation of Meis genes. *Development* **127**, 3961–3970.
- Mercer, T. R. and Mattick, J. S. (2013). Structure and function of long noncoding RNAs in epigenetic regulation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 300–307.
- Merika, M. and Thanos, D. (2001). Enhanceosomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 205–208.
- Michnick, S. W., Remy, I., Campbell-Valois, F. X., Vallee-Belisle, A. and Pelletier, J. N. (2000). Detection of protein-protein interactions by protein fragment complementation strategies. *Methods Enzymol.* **328**, 208–230.
- Michnick, S. W., Landry, C. R., Levy, E. D., Diss, G., Ear, P. H., Kowarzyk, J., Malleshiah, M. K., Messier, V. and Tchekanda, E. (2016). Protein-fragment complementation assays for large-scale analysis, functional dissection, and spatiotemporal dynamic studies of protein-protein interactions in living cells. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2016**, 917–919.
- Mifsud, B., Tavares-Cadete, F., Young, A. N., Sugar, R., Schoenfelder, S., Ferreira, L., Wingett, S. W., Andrews, S., Grey, W., Ewels, P. A., et al. (2015). Mapping long-range promoter contacts in human cells with high-resolution capture Hi-C. *Nat. Genet.* **47**, 598–606.
- Miller, J., McLachlan, A. D. and Klug, A. (1985). Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* **4**, 1609–1614.
- Miller, L. W., Cai, Y., Sheetz, M. P. and Cornish, V. W. (2005). In vivo protein labeling with trimethoprim conjugates: A flexible chemical tag. *Nat. Methods* **2**, 255–257.
- Miller, K. E., Kim, Y., Huh, W.-K. and Park, H.-O. (2015). Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis: advances and recent applications for genome-wide interaction studies.
- Min, K., Cho, I., Choi, M. and Chang, J. B. (2020). Multiplexed expansion microscopy of the brain through fluorophore screening. *Methods* **174**, 3–10.
- Mir, M., Reimer, A., Haines, J. E., Li, X. Y., Stadler, M., Garcia, H., Eisen, M. B. and Darzacq, X. (2017). Dense bicoid hubs accentuate binding along the

- morphogen gradient. *Genes Dev.* **31**, 1784–1794.
- Mir, M., Stadler, M. R., Ortiz, S. A., Harrison, M. M., Darzacq, X. and Eisen, M. B.** (2018). Dynamic multifactor hubs interact transiently with sites of active transcription in *Drosophila* embryos. *bioRxiv* 377812.
- Mizuno, H., Abe, M., Dedecker, P., Makino, A., Rocha, S., Ohno-Iwashita, Y., Hofkens, J., Kobayashi, T. and Miyawaki, A.** (2011). Fluorescent probes for superresolution imaging of lipid domains on the plasma membrane. *Chem. Sci.* **2**, 1548–1553.
- Moens, C. B. and Selleri, L.** (2006). Hox cofactors in vertebrate development. *Dev. Biol.* **291**, 193–206.
- Mohammadi, S., Davila-Velderrain, J. and Kellis, M.** (2019). Reconstruction of Cell-type-Specific Interactomes at Single-Cell Resolution Graphical Abstract Highlights d SCINET reconstructs cell-type interactomes from scRNA-seq and network data d Single-cell resolution networks allow for analysis of gene-interaction dynamics d Disease-associated perturbations exhibit cell-type-specific modularity. *Cell Syst.* **9**, 559–568.
- Morell, M., Ventura, S. and Avilés, F. X.** (2009). Protein complementation assays: Approaches for the in vivo analysis of protein interactions. *FEBS Lett.* **583**, 1684–1691.
- Morgan, R., In Der Rieden, P., Hooiveld, M. H. W. and Durston, A. J.** (2000). Identifying HOX paralog groups by the PBX-binding region. *Trends Genet.* **16**, 66–67.
- Mortin, M. A., Zuerner, R., Berger, S. and Hamilton, B. J.** (1992). Mutations in the second-largest subunit of *Drosophila* RNA polymerase II interact with Ubx. *Genetics* **131**, 895–903.
- Mostafavi, S. and Morris, Q.** (2012). Combining many interaction networks to predict gene function and analyze gene lists. *Proteomics* **12**, 1687–1696.
- Muchir, A., Medioni, J., Laluc, M., Massart, C., Arimura, T., Van Der Kooi, A. J., Desguerre, I., Mayer, M., Ferrer, X., Briault, S., et al.** (2004). Nuclear envelope alterations in fibroblasts from patients with muscular dystrophy, cardiomyopathy, and partial lipodystrophy carrying lamin A/C gene mutations. *Muscle and Nerve* **30**, 444–450.
- Mueller, M.** (2019). SIM Data Acquisition and Processing for Fast Live-Cell Imaging. *J. Biomol. Tech.* **30**, S60–S61.
- Mukherjee, K. and Bürglin, T. R.** (2007). Comprehensive analysis of animal TALE homeobox genes: New conserved motifs and cases of accelerated evolution. *J. Mol. Evol.* **65**, 137–153.
- Müller, P., Schmitt, E., Jacob, A., Hoheisel, J., Kaufmann, R., Cremer, C. and Hausmann, M.** (2010). COMBO-FISH enables high precision localization microscopy as a prerequisite for nanostructure analysis of genome loci. *Int. J.*

Mol. Sci. **11**, 4094–4105.

- Müller, P., Röbner, J., Schwarz-Finsterle, J., Schmitt, E. and Hausmann, M. (2016). PNA-COMBO-FISH: From combinatorial probe design in silico to vitality compatible, specific labelling of gene targets in cell nuclei. *Exp. Cell Res.* **345**, 51–59.
- Murre, C., Schonleber McCaw, P., Vaessin, I., Caudy, M., Jan, L. Y., Jan, Y. N., Cabrera, C. V., Buskin, J. N., Lassar, A. B., Harold Weintraub, H., et al. (1989). *Interactions between Heterologous Helix-Loop-Helix Proteins Generate Complexes That Bind Specifically to a Common DNA Sequence.*
- Nagano, T., Lubling, Y., Várnai, C., Dudley, C., Leung, W., Baran, Y., Mendelson Cohen, N., Wingett, S., Fraser, P. and Tanay, A. (2017). Cell-cycle dynamics of chromosomal organization at single-cell resolution. *Nature* **547**, 61–67.
- Nagashima, R., Hibino, K., Ashwin, S. S., Babokhov, M., Fujishiro, S., Imai, R., Nozaki, T., Tamura, S., Tani, T., Kimura, H., et al. (2019). Single nucleosome imaging reveals loose genome chromatin networks via active RNA polymerase II. *J. Cell Biol.* **218**, 1511–1530.
- Nägerl, U. V., Willig, K. I., Hein, B., Hell, S. W. and Bonhoeffer, T. (2008). Live-cell imaging of dendritic spines by STED microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 18982–18987.
- Nahidiazar, L., Agronskaia, A. V., Broertjes, J., van den Broek, B., Jalink, K., Van Broek, B. Den and Jalink, K. (2016). Optimizing Imaging Conditions for Demanding Multi-Color Super Resolution Localization Microscopy. *PLoS One* **11**, e0158884.
- Nan, X., Collisson, E. A., Lewis, S., Huang, J., Tamgüney, T. M., Liphardt, J. T., McCormick, F., Gray, J. W. and Chu, S. (2013). Single-molecule superresolution imaging allows quantitative analysis of RAF multimer formation and signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 18519–18524.
- Nasmyth, K. and Haering, C. H. (2005). THE STRUCTURE AND FUNCTION OF SMC AND KLEISIN COMPLEXES. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 595–648.
- Navlakha, S. and Kingsford, C. (2010). The power of protein interaction networks for associating genes with diseases. **26**, 1057–1063.
- Neguembor, M. V, Sebastian-Perez, R., Aulicino, F., Gomez-Garcia, P. A., Cosma, M. P. and Lakadamyali, M. (2017). (Po)STAC (Polycistronic SunTAg modified CRISPR) enables live-cell and fixed-cell super-resolution imaging of multiple genes. *Nucleic Acids Res.*
- Nickerson, A., Huang, T., Lin, L. J. and Nan, X. (2014). Photoactivated localization microscopy with Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC-PALM) for nanoscale imaging of protein-protein interactions in cells. *PLoS One* **9**,
- Nickerson, A., Huang, T., Lin, L. J. and Nan, X. (2015). Photoactivated localization microscopy with bimolecular fluorescence complementation (Bifc-palm). *J. Vis.*

Exp. 2015,.

- Niedojadlo, J., Perret-Vivancos, C., Kalland, K. H., Cmarko, D., Cremer, T., Van Driel, R. and Fakan, S. (2011). Transcribed DNA is preferentially located in the perichromatin region of mammalian cell nuclei. *Exp. Cell Res.* **317**, 433–444.
- Nienhaus, K. and Ulrich Nienhaus, G. (2014). Fluorescent proteins for live-cell imaging with super-resolution. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 1088–1106.
- Nikitina, T. and Woodcock, C. L. (2004). Closed chromatin loops at the ends of chromosomes. *J. Cell Biol.* **166**, 161–165.
- Nir, G., Farabella, I., Pérez Estrada, C., Ebeling, C. G., Beliveau, B. J., Sasaki, H. M., Lee, S. H., Nguyen, S. C., McCole, R. B., Chatteraj, S., et al. (2018). Walking along chromosomes with super-resolution imaging, contact maps, and integrative modeling. *PLoS Genet.* **14**, e1007872.
- Nishino, Y., Eltsov, M., Joti, Y., Ito, K., Takata, H., Takahashi, Y., Hihara, S., Frangakis, A. S., Imamoto, N., Ishikawa, T., et al. (2012). Human mitotic chromosomes consist predominantly of irregularly folded nucleosome fibres without a 30-nm chromatin structure. *EMBO J.* **31**, 1644–1653.
- Nishiyama, T. (2019). Cohesion and cohesin-dependent chromatin organization. *Curr. Opin. Cell Biol.* **58**, 8–14.
- Nora, E. P., Lajoie, B. R., Schulz, E. G., Giorgetti, L., Okamoto, I., Servant, N., Piolot, T., Van Berkum, N. L., Meisig, J., Sedat, J., et al. (2012). Spatial partitioning of the regulatory landscape of the X-inactivation centre. *Nature* **485**, 381–385.
- Normanno, D., Boudarène, L., Dugast-Darzacq, C., Chen, J., Richter, C., Proux, F., Bénichou, O., Voituriez, R., Darzacq, X. and Dahan, M. (2015). Probing the target search of DNA-binding proteins in mammalian cells using TetR as model searcher. *Nat. Commun.* **6**, 1–10.
- Novelli, G., Muchir, A., Sangiuolo, F., Helbling-Leclerc, A., D'apice, M. R., Massart, C., Capon, F., Sbraccia, P., Federici, M., Lauro, R., et al. (2002). Mandibuloacral dysplasia is caused by a mutation in LMNA-encoding lamin A/C. *Am. J. Hum. Genet.* **71**, 426–431.
- Noyes, M. B., Christensen, R. G., Wakabayashi, A., Stormo, G. D., Brodsky, M. H. and Wolfe, S. A. (2008). Analysis of Homeodomain Specificities Allows the Family-wide Prediction of Preferred Recognition Sites. *Cell* **133**, 1277–1289.
- Nozaki, T., Kaizu, K., Pack, C. G., Tamura, S., Tani, T., Hihara, S., Nagai, T., Takahashi, K. and Maeshima, K. (2013). Flexible and dynamic nucleosome fiber in living mammalian cells. *Nucl. (United States)* **4**, 349–356.
- Nozaki, T., Imai, R., Tanbo, M., Nagashima, R., Tamura, S., Tani, T., Joti, Y., Tomita, M., Hibino, K., Kanemaki, M. T., et al. (2017). Dynamic Organization of Chromatin Domains Revealed by Super-Resolution Live-Cell Imaging. *Mol.*

Cell **67**, 282-293.e7.

- O'Connor, M. B., Binari, R., Perkins, L. A. and Bender, W. (1988). Alternative RNA products from the Ultrabithorax domain of the bithorax complex. *EMBO J.* **7**, 435–445.
- Ohno, M., Ando, T., Priest, D. G., Kumar, V., Yoshida, Y. and Taniguchi, Y. (2019). Sub-nucleosomal Genome Structure Reveals Distinct Nucleosome Folding Motifs. *Cell* **176**, 520-534.e25.
- Olins, D. E. and Olins, A. L. (2003). Chromatin history: Our view from the bridge. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 809–814.
- Olivares-Chauvet, P., Fennessy, D., Jackson, D. A. and Maya-Mendoza, A. (2011). Innate Structure of DNA Foci Restricts the Mixing of DNA from Different Chromosome Territories. *PLoS One* **6**, e27527.
- Olivier, N., Keller, D., Rajan, V. S., Gönczy, P. and Manley, S. (2013). Simple buffers for 3D STORM microscopy. *Biomed. Opt. Express* **4**, 885.
- Opazo, F. (2014). Probing biological samples in high-resolution microscopy: Making sense of spots. *Neuromethods* **86**, 369–386.
- Ou, H. D., Phan, S., Deerinck, T. J., Thor, A., Ellisman, M. H. and O'Shea, C. C. (2017). ChromEMT: Visualizing 3D chromatin structure and compaction in interphase and mitotic cells. *Science (80-.).* **357**,.
- Padrick, S. B. and Rosen, M. K. (2010). Physical Mechanisms of Signal Integration by WASP Family Proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 707–735.
- Paiano, A., Margiotta, A., De Luca, M. and Bucci, C. (2019). Yeast Two-Hybrid Assay to Identify Interacting Proteins. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **95**, e70.
- Papagiannouli, F., Schardt, L., Grajcarek, J., Ha, N. and Lohmann, I. (2014). The Hox Gene Abd-B Controls Stem Cell Niche Function in the Drosophila Testis. *Dev. Cell* **28**, 189–202.
- Passner, J. M., Ryoo², H. D., Shen, L., Mann², R. S. and Aggarwal, A. K. (1999). *Structure of a DNA-bound Ultrabithorax±Extradenticle homeodomain complex.*
- Patterson, G. H. and Lippincott-Schwartz, J. (2002). A Photoactivatable GFP for Selective Photolabeling of Proteins and Cells. *Science (80-.).* **297**,.
- Paulsen, J., Liyakat Ali, T. M., Nekrasov, M., Delbarre, E., Baudement, M. O., Kurscheid, S., Tremethick, D. and Collas, P. (2019). Long-range interactions between topologically associating domains shape the four-dimensional genome during differentiation. *Nat. Genet.* **51**, 835–843.
- Pearson, J. C., Lemons, D. and McGinnis, W. (2005). Modulating Hox gene functions during animal body patterning. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 893–904.
- Pederson, T. (2011). The nucleolus. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, 1–15.

- Pelletier, J. N., Campbell-Valois, F. X. and Michnick, S. W. (1998). Oligomerization domain-directed reassembly of active dihydrofolate reductase from rationally designed fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 12141–12146.
- Perry, M. W., Boettiger, A. N., Bothma, J. P. and Levine, M. (2010). Shadow enhancers foster robustness of drosophila gastrulation. *Curr. Biol.* **20**, 1562–1567.
- Philippidou, P. and Dasen, J. S. (2013). Hox Genes: Choreographers in Neural Development, Architects of Circuit Organization. *Neuron* **80**, 12–34.
- Pichon, X., Lagha, M., Mueller, F. and Bertrand, E. (2018). A Growing Toolbox to Image Gene Expression in Single Cells: Sensitive Approaches for Demanding Challenges. *Mol. Cell* **71**, 468–480.
- Pick, L. and Heffer, A. (2012). Hox gene evolution: Multiple mechanisms contributing to evolutionary novelties. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1256**, 15–32.
- Pindyurin, A. V., Ilyin, A. A., Ivankin, A. V., Tselebrovsky, M. V., Nenasheva, V. V., Mikhaleva, E. A., Pagie, L., Van Steensel, B. and Shevelyov, Y. Y. (2018). The large fraction of heterochromatin in Drosophila neurons is bound by both B-type lamin and HP1a. *11*, 65.
- Pires, H. R. and Boxem, M. (2018). Mapping the Polarity Interactome. *J. Mol. Biol.* **430**, 3521–3544.
- Plaza, S., Prince, F., Adachi, Y., Punzo, C., Cribbs, D. L. and Gehring, W. J. (2008). Cross-regulatory protein-protein interactions between Hox and Pax transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 13439–13444.
- Pollard, K. M., Chan, E. K., Grant, B. J., Sullivan, K. F., Tan, E. M. and Glass, C. A. (1990). In vitro posttranslational modification of lamin B cloned from a human T-cell line. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 2164–2175.
- Pombo, A., Cuello, P., Schul, W., Yoon, J.-B., Roeder, R. G., Cook, P. R., Murphy, S. and William, S. (1998). *Regional and temporal specialization in the nucleus: a transcriptionally-active nuclear domain rich in PTF, Oct1 and PIKA antigens associates with specific chromosomes early in the cell cycle.*
- Pope, B. D., Ryba, T., Dileep, V., Yue, F., Wu, W., Denas, O., Vera, D. L., Wang, Y., Hansen, R. S., Canfield, T. K., et al. (2014). Topologically associating domains are stable units of replication-timing regulation. *Nature* **515**, 402–405.
- Porcelli, D., Fischer, B., Russell, S. and White, R. (2019). Chromatin accessibility plays a key role in selective targeting of Hox proteins. *Genome Biol.* **20**, 115.
- Prendergast, G. and Ziff, E. B. (1989). DNA-binding motif [11]. *Nature* **341**, 392.
- Prévôt, D., Voeltzel, T., Birot, A. M., Morel, A. P., Rostan, M. C., Magaud, J. P. and Corbo, L. (2000). The leukemia-associated protein Btg1 and the p53-regulated protein Btg2 interact with the homeoprotein Hoxb9 and enhance its transcriptional activation. *J. Biol. Chem.* **275**, 147–153.

- Prin, F., Serpente, P., Itasaki, N. and Gould, A. P. (2014). Hox proteins drive cell segregation and non-autonomous apical remodelling during hindbrain segmentation. *Dev.* **141**, 1492–1502.
- Prince, F., Katsuyama, T., Oshima, Y., Plaza, S., Resendez-Perez, D., Berry, M., Kurata, S. and Gehring, W. J. (2008). The YPWM motif links Antennapedia to the basal transcriptional machinery. *Development* **135**, 1669–1679.
- Provost, A., Rousset, C., Bourdon, L., Mezhoud, S., Reungoat, E., Fourneaux, C., Bresson, T., Pauly, M., Béard, N., Possi-Tchouanlong, L., et al. (2019). Innovative particle standards and long-lived imaging for 2D and 3D dSTORM. *Sci. Rep.* **9**, 1–13.
- Ptashne, M. (1986). *A genetic switch: phage lambda revisited*.
- Pufall, M. A. and Graves, B. J. (2002). Autoinhibitory Domains: Modular Effectors of Cellular Regulation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **18**, 421–462.
- Putnam, N. H., Srivastava, M., Hellsten, U., Dirks, B., Chapman, J., Salamov, A., Terry, A., Shapiro, H., Lindquist, E., Kapitonov, V. V., et al. (2007). Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization. *Science* **317**, 86–94.
- Qian, J., Wang, Q., Dose, M., Pruett, N., Kieffer-Kwon, K. R., Resch, W., Liang, G., Tang, Z., Mathé, E., Benner, C., et al. (2014). B cell super-enhancers and regulatory clusters recruit AID tumorigenic activity. *Cell* **159**, 1524–1537.
- Radovick, S., Nations, M., Du, Y., Berg, L. V. A., Weintraub, B. D. and Wondisford, F. E. (1992). A mutation in the POU-homeodomain of Pit-1 responsible for combined pituitary hormone deficiency. *Science (80-)*. **257**, 1115–1118.
- Raj, A., van den Bogaard, P., Rifkin, S. A., van Oudenaarden, A. and Tyagi, S. (2008). Imaging individual mRNA molecules using multiple singly labeled probes. *Nat. Methods* **5**, 877–879.
- Rajewsky, N., Vergassola, M., Gaul, U. and Siggia, E. D. (2002). Computational detection of genomic cis-regulatory modules applied to body patterning in the early *Drosophila* embryo. *BMC Bioinformatics* **3**,
- Raman, V., Martenser, S. A., Reisman, D., Evron, E., Odenwald, W. F., Jaffee, E., Marks, J. and Sukumar, S. (2000). Compromised HOXA5 function can limit p53 expression in human breast tumours. *Nature* **405**, 974–978.
- Rao, S. S. P., Huntley, M. H., Durand, N. C., Stamenova, E. K., Bochkov, I. D., Robinson, J. T., Sanborn, A. L., Machol, I., Omer, A. D., Lander, E. S., et al. (2014). A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell* **159**, 1665–1680.
- Rayleigh (1896). XV. On the theory of optical images, with special reference to the microscope. *London, Edinburgh, Dublin Philos. Mag. J. Sci.* **42**, 167–195.
- Reboul, J., Vaglio, P., Rual, J. F., Lamesch, P., Martinez, M., Armstrong, C. M., Li,

- S., Jacotot, L., Bertin, N., Janky, R., et al. (2003). C. elegans ORFeome version 1.1: Experimental verification of the genome annotation and resource for proteomescale protein expression. *Nat. Genet.* **34**, 35–41.
- Redemann, N., Gaul, U. and Jäckle, H. (1988). Disruption of a putative Cys-zinc interaction eliminates the biological activity of the Krüppel finger protein. *Nature* **332**, 90–92.
- Rees, J. S., Li, X. W., Perrett, S., Lilley, K. S. and Jackson, A. P. (2015). Protein neighbors and proximity proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **14**, 2848–2856.
- Remy, I. and Michnick, S. W. (2004). Regulation of Apoptosis by the Ft1 Protein, a New Modulator of Protein Kinase B/Akt. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 1493–1504.
- Reuss, M., Engelhardt, J. and Hell, S. W. (2010). Birefringent device converts a standard scanning microscope into a STED microscope that also maps molecular orientation. *Opt. Express* **18**, 1049.
- Rezsohazy, R., Saurin, A. J., Maurel-Zaffran, C. and Graba, Y. (2015a). *Cellular and molecular insights into Hox protein action.*
- Rezsohazy, R., Saurin, A. J., Maurel-Zaffran, C. and Graba, Y. (2015b). Cellular and molecular insights into Hox protein action. *Development* **142**, 1212–1227.
- Rhee, H. W., Zou, P., Udeshi, N. D., Martell, J. D., Mootha, V. K., Carr, S. A. and Ting, A. Y. (2013). Proteomic mapping of mitochondria in living cells via spatially restricted enzymatic tagging. *Science (80-)*. **339**, 1328–1331.
- Ricci, M. A., Manzo, C., García-Parajo, M. F., Lakadamyali, M. and Cosma, M. P. (2015). Chromatin fibers are formed by heterogeneous groups of nucleosomes in vivo. *Cell* **160**, 1145–1158.
- Rieckhof, G. E., Casares, F., Ryoo, H. D., Abu-Shaar, M. and Mann, R. S. (1997). Nuclear translocation of extradenticle requires homothorax, which encodes an extradenticle-related homeodomain protein. *Cell* **91**, 171–183.
- Riedl, J., Crevenna, A. H., Kessenbrock, K., Yu, J. H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T. A., Werb, Z., et al. (2008). Lifeact: A versatile marker to visualize F-actin. *Nat. Methods* **5**, 605–607.
- Riemer, D., Stuurman, N., Berrios, M., Hunter, C., Fisher, P. A. and Weber, K. (1995). Expression of Drosophila lamin C is developmentally regulated: analogies with vertebrate A-type lamins. *J. Cell Sci.* **108**,
- Ries, J., Kaplan, C., Platonova, E., Eghlidi, H. and Ewers, H. (2012). A simple, versatile method for GFP-based super-resolution microscopy via nanobodies. *Nat. Methods*.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M. and Seraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat. Biotechnol.* **17**, 1030–1032.

- Rittweger, E., Han, K. Y., Irvine, S. E., Eggeling, C. and Hell, S. W. (2009). STED microscopy reveals crystal colour centres with nanometric resolution. *Nat. Photonics* **3**, 144–147.
- Rivas, M. L., Espinosa-Vázquez, J. M., Sambrani, N., Greig, S., Merabet, S., Graba, Y. and Castelli-Gair Hombría, J. (2013). Antagonism Versus Cooperativity with TALE Cofactors at the Base of the Functional Diversification of Hox Protein Function. *PLoS Genet.* **9**,.
- Robinett, C. C., Straight, A., Li, G., Willhelm, C., Sudlow, G., Murray, A. and Belmont, A. S. (1996). In vivo localization of DNA sequences and visualization of large-scale chromatin organization using lac operator/repressor recognition. *J. Cell Biol.* **135**, 1685–1700.
- Robinson, C. V., Sali, A. and Baumeister, W. (2007). The molecular sociology of the cell. *Nature* **450**, 973–982.
- Robson, M. I., De Las Heras, J. I., Czapiewski, R., Sivakumar, A., Kerr, A. R. W. and Schirmer, E. C. (2017). Constrained release of lamina-associated enhancers and genes from the nuclear envelope during T-cell activation facilitates their association in chromosome compartments. *Genome Res.* **27**, 1126–1138.
- Rock, K. L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D. and Goldberg, A. L. (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* **78**, 761–771.
- Rossier, O., Oceau, V., Sibarita, J. B., Leduc, C., Tessier, B., Nair, D., Gatterdam, V., Destaing, O., Albigès-Rizo, C., Tampé, R., et al. (2012). Integrins β 1 and β 3 exhibit distinct dynamic nanoscale organizations inside focal adhesions. *Nat. Cell Biol.* **14**, 1057–1067.
- Roux, K. J., Kim, D. I., Raida, M. and Burke, B. (2012). A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **196**, 801–810.
- Rowan, S., Siggers, T., Lachke, S. A., Yue, Y., Bulyk, M. L. and Maas, R. L. (2010). Precise temporal control of the eye regulatory gene Pax6 via enhancer-binding site affinity. *Genes Dev.* **24**, 980–985.
- Rowley, M. J. and Corces, V. G. (2018). Organizational principles of 3D genome architecture. *Nat. Rev. Genet.* **19**, 789–800.
- Rual, J. F., Venkatesan, K., Hao, T., Hirozane-Kishikawa, T., Dricot, A., Li, N., Berriz, G. F., Gibbons, F. D., Dreze, M., Ayivi-Guedehoussou, N., et al. (2005). Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature* **437**, 1173–1178.
- Rust, M. J., Bates, M. and Zhuang, X. (2006). Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM).

- Ryoo, H. D. and Mann, R. S. (1999). The control of trunk Hox specificity and activity by extradenticle. *Genes Dev.* **13**, 1704–1716.
- Saad, H., Gallardo, F., Dalvai, M., Tanguy-le-Gac, N., Lane, D. and Bystricky, K. (2014). DNA Dynamics during Early Double-Strand Break Processing Revealed by Non-Intrusive Imaging of Living Cells. *PLoS Genet.* **10**,.
- Sabari, B. R., Dall’Agnese, A., Boija, A., Klein, I. A., Coffey, E. L., Shrinivas, K., Abraham, B. J., Hannett, N. M., Zamudio, A. V., Manteiga, J. C., et al. (2018). Coactivator condensation at super-enhancers links phase separation and gene control. *Science (80-)*. **361**, eaar3958.
- Sage, D., Kirshner, H., Pengo, T., Stuurman, N., Min, J., Manley, S. and Unser, M. (2015). Quantitative evaluation of software packages for single-molecule localization microscopy. *Nat. Methods* **12**, 717–724.
- Sakonju, S. and Brown, D. D. (1982). Contact points between a positive transcription factor and the Xenopus 5S RNA gene. *Cell* **31**, 395–405.
- Sakthivel, K. M. and Sehgal, P. (2016). A Novel Role of Lamins from Genetic Disease to Cancer Biomarkers. *Oncol. Rev.* **10**, 309.
- Sanamrad, A., Persson, F., Lundius, E. G., Fange, D., Gynnå, A. H. and Elf, J. (2014). Single-particle tracking reveals that free ribosomal subunits are not excluded from the Escherichia coli nucleoid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 11413–11418.
- Sanborn, A. L., Rao, S. S. P., Huang, S. C., Durand, N. C., Huntley, M. H., Jewett, A. I., Bochkov, I. D., Chinnappan, D., Cutkosky, A., Li, J., et al. (2015). Chromatin extrusion explains key features of loop and domain formation in wild-type and engineered genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E6456–E6465.
- Sánchez-Herrero, E. (2013). Hox Targets and Cellular Functions. *Artic. ID* **2013**,.
- Sánchez-Herrero, E., Vernós, I., Marco, R. and Morata, G. (1985). Genetic organization of Drosophila bithorax complex. *Nature* **313**, 108–113.
- Sánchez-Higueras, C., Rastogi, C., Voutev, R., Bussemaker, H. J., Mann, R. S. and Hombría, J. C. G. (2019). In vivo Hox binding specificity revealed by systematic changes to a single cis regulatory module. *Nat. Commun.* **10**,.
- Sanulli, S., Trnka, M. J., Dharmarajan, V., Tibble, R. W., Pascal, B. D., Burlingame, A. L., Griffin, P. R., Gross, J. D. and Narlikar, G. J. (2019). HP1 reshapes nucleosome core to promote phase separation of heterochromatin. *Nature* **575**, 390–394.
- Sanyal, A., Lajoie, B. R., Jain, G. and Dekker, J. (2012). The long-range interaction landscape of gene promoters. *Nature* **489**, 109–113.
- Sarkar, D. and Saha, S. (2019). Machine-learning techniques for the prediction of protein-protein interactions. *J Biosci.*

- Sawadogo, M. and Roeder, R. G.** (1985). Interaction of a gene-specific transcription factor with the adenovirus major late promoter upstream of the TATA box region. *Cell* **43**, 165–175.
- Schaefer, L. H., Schuster, D. and Schaffer, J.** (2004). *Structured illumination microscopy: artefact analysis and reduction utilizing a parameter optimization approach*.
- Scheidereit, C., Heguy, A. and Roeder, R. G.** (1987). Identification and purification of a human lymphoid-specific octamer-binding protein (OTF-2) that activates transcription of an immunoglobulin promoter in vitro. *Cell* **51**, 783–793.
- Schermelleh, L., Carlton, P. M., Haase, S., Shao, L., Winoto, L., Kner, P., Burke, B., Cardoso, M. C., Agard, D. A., Gustafsson, M. G. L., et al.** (2008). Subdiffraction multicolor imaging of the nuclear periphery with 3D structured illumination microscopy. *Science (80-)*. **320**, 1332–1336.
- Schmitt, E., Wagner, J. and Hausmann, M.** (2012). Combinatorial selection of short triplex forming oligonucleotides for fluorescence in situ hybridisation COMBO-FISH. *J. Comput. Sci.* **3**, 328–334.
- Schmitt, A. D., Hu, M. and Ren, B.** (2016). Genome-wide mapping and analysis of chromosome architecture. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 743–755.
- Schnapp, A. and Grummt, I.** (1991). *Transcription Complex Formation at the Mouse rDNA Promoter Involves the Stepwise Association of Four Transcription Factors and RNA Polymerase I**.
- Schnell, U., Dijk, F., Sjollem, K. A. and Giepmans, B. N. G.** (2012). Immunolabeling artifacts and the need for live-cell imaging. *Nat. Methods* **9**, 152–158.
- Schoen, I., Aires, L., Ries, J. and Vogel, V.** (2017). Nanoscale invaginations of the nuclear envelope: Shedding new light on wormholes with elusive function. *Nucleus* **8**, 506–514.
- Schoenfelder, S., Clay, I., Fraser, P., Paro, R. and Lee, J. T.** (2010). The transcriptional interactome: gene expression in 3D This review comes from a themed issue on Chromosomes and expression mechanisms Edited by.
- Schopp, I. M., Amaya Ramirez, C. C., Debeljak, J., Kreibich, E., Skribbe, M., Wild, K. and Béthune, J.** (2017). Split-BioID a conditional proteomics approach to monitor the composition of spatiotemporally defined protein complexes. *Nat. Commun.* **8**, 1–14.
- Schubert, V. and Weisshart, K.** (2015). Abundance and distribution of RNA polymerase II in Arabidopsis interphase nuclei. *J. Exp. Bot.* **66**, 1687–1698.
- Schuettengruber, B., Chourrout, D., Vervoort, M., Leblanc, B. and Cavalli, G.** (2007). Genome Regulation by Polycomb and Trithorax Proteins. *Cell* **128**, 735–745.

- Schulze, S. R., Curio-Penny, B., Li, Y., Imani, R. A., Rydberg, L., Geyer, P. K. and Wallrath, L. L. (2005). Molecular genetic analysis of the nested *Drosophila melanogaster* lamin C gene. *Genetics* **171**, 185–196.
- Scott, M. P., Tamkun, J. W. and Hartzell, G. W. (1989). *The structure and function of the homeodoma/n*.
- Selleri, L., Depew, M. J., Jacobs, Y., Chanda, K., Tsang, K. Y., Cheah, K. S. E., Rubenstein, J. L. R., O’Gorman, S. and Cleary, M. L. (2001). Requirement for Pbx1 in skeletal patterning and programming chondrocyte proliferation and differentiation. *Development* **128**, 3543–3557.
- Senavirathne, G., Liu, J., Lopez, M. A., Hanne, J., Martin-Lopez, J., Lee, J. B., Yoder, K. E. and Fishel, R. (2015). Widespread nuclease contamination in commonly used oxygen-scavenging systems. *Nat. Methods* **12**, 901–902.
- Sexton, T., Umlauf, D., Kurukuti, S. and Fraser, P. (2007). The role of transcription factories in large-scale structure and dynamics of interphase chromatin. *Semin. Cell Dev. Biol.* **18**, 691–697.
- Sexton, T., Yaffe, E., Kenigsberg, E., Bantignies, F., Leblanc, B., Hoichman, M., Parrinello, H., Tanay, A. and Cavalli, G. (2012). Three-dimensional folding and functional organization principles of the *Drosophila* genome. *Cell* **148**, 458–472.
- Shachar, S. and Misteli, T. (2017). Causes and consequences of nuclear gene positioning. *J. Cell Sci.* **130**, 1501–1508.
- Shah, N. and Sukumar, S. (2010). The Hox genes and their roles in oncogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 361–371.
- Shaner, N. C., Steinbach, P. A. and Tsien, R. Y. (2005). A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat. Methods*.
- Sharonov, A. and Hochstrasser, R. M. (2006). Wide-field subdiffraction imaging by accumulated binding of diffusing probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 18911–18916.
- Shaw, M., Zajiczek, L. and O’Holleran, K. (2015). High speed structured illumination microscopy in optically thick samples. *Methods* **88**, 11–19.
- Shcherbakova, D. M., Sengupta, P., Lippincott-Schwartz, J. and Verkhusha, V. V. (2014). Photocontrollable Fluorescent Proteins for Superresolution Imaging. *Annu. Rev. Biophys.* **43**, 303–329.
- Shcherbakova, D. M., Baloban, M., Emelyanov, A. V., Brenowitz, M., Guo, P. and Verkhusha, V. V. (2016). Bright monomeric near-infrared fluorescent proteins as tags and biosensors for multiscale imaging. *Nat. Commun.*
- Shcherbo, D., Murphy, C. S., Ermakova, G. V., Solovieva, E. A., Chepurnykh, T. V., Shcheglov, A. S., Verkhusha, V. V., Pletnev, V. Z., Hazelwood, K. L., Roche, P. M., et al. (2009). Far-red fluorescent tags for protein imaging in living

- tissues. *Biochem. J.* **418**, 567–574.
- Shepherd, J. C. W., McGinnis, W., Carrasco, A. E., De Robertis, E. M. and Gehring, W. J. (1984). Fly and frog homoeo domains show homologies with yeast mating type regulatory proteins. *Nature* **310**, 70–71.
- Shimi, T., Pflieger, K., Kojima, S. I., Pack, C. G., Solovei, I., Goldman, A. E., Adam, S. A., Shumaker, D. K., Kinjo, M., Cremer, T., et al. (2008). The A- and B-type nuclear lamin networks: Microdomains involved in chromatin organization and transcription. *Genes Dev.* **22**, 3409–3421.
- Shimia, T., Kittisopikul, M., Tran, J., Goldman, A. E., Adam, S. A., Zheng, Y., Jaqaman, K. and Goldman, R. D. (2015). Structural organization of nuclear lamins A, C, B1, and B2 revealed by superresolution microscopy. *Mol. Biol. Cell* **26**, 4075–4086.
- Shrinivas, K., Sabari, B. R., Coffey, E. L., Klein, I. A., Boija, A., Zamudio, A. V., Schuijers, J., Hannett, N. M., Sharp, P. A., Young, R. A., et al. (2019). Enhancer Features that Drive Formation of Transcriptional Condensates. *Mol. Cell* **75**, 549-561.e7.
- Shroff, H., Galbraith, C. G., Galbraith, J. A., White, H., Gillette, J., Olenych, S., Davidson, M. W. and Betzig, E. (2007). Dual-color superresolution imaging of genetically expressed probes within individual adhesion complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 20308–20313.
- Shroff, H., Galbraith, C. G., Galbraith, J. A. and Betzig, E. (2008). Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics. *Nat. Methods* **5**, 417–423.
- Siersbæk, R., Rabiee, A., Nielsen, R., Sidoli, S., Traynor, S., Loft, A., Poulsen, L. L. C., Rogowska-Wrzesinska, A., Jensen, O. N. and Mandrup, S. (2014). Transcription factor cooperativity in early adipogenic hotspots and super-enhancers. *Cell Rep.* **7**, 1443–1455.
- Sigler, P. B. (1988). Acid blobs and negative noodles. *Nature* **333**, 210–212.
- Sigma-Aldrich** How Proximity Ligation Assay (PLA) Works | Sigma-Aldrich.
- Simon, D., Wriston, A., Fan, Q., Shabanowitz, J., Florwick, A., Dharmaraj, T., Peterson, S., Gruenbaum, Y., Carlson, C., Grønning-Wang, L., et al. (2018). OGT (O-GlcNAc Transferase) Selectively Modifies Multiple Residues Unique to Lamin A. *Cells* **7**, 44.
- Simpson, P. and Ayyar, S. (2008). Evolution of Cis-Regulatory Sequences in *Drosophila*.
- Slattery, M., Riley, T., Liu, P., Abe, N., Gomez-Alcala, P., Dror, I., Zhou, T., Rohs, R., Honig, B., Bussemaker, H. J., et al. (2011). Cofactor binding evokes latent differences in DNA binding specificity between hox proteins. *Cell* **147**, 1270–1282.

- Smale, S. T. and Kadonaga, J. T. (2003). THE RNA POLYMERASE II CORE PROMOTER.
- Small, S., Blair, A. and Levine, M. (1992). *Regulation of even-skipped stripe 2 in the Drosophila embryo.*
- Söderberg, O., Gullberg, M., Jarvius, M., Ridderstråle, K., Leuchowius, K. J., Jarvius, J., Wester, K., Hydbring, P., Bahram, F., Larsson, L. G., et al. (2006). Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat. Methods* **3**, 995–1000.
- Sofueva, S., Yaffe, E., Chan, W.-C., Georgopoulou, D., Vietri Rudan, M., Mira-Bontenbal, H., Pollard, S. M., Schroth, G. P., Tanay, A. and Hadjur, S. (2013). Cohesin-mediated interactions organize chromosomal domain architecture. *EMBO J.* **32**, 3119–3129.
- Solovei, I., Wang, A. S., Thanisch, K., Schmidt, C. S., Krebs, S., Zwerger, M., Cohen, T. V., Devys, D., Foisner, R., Peichl, L., et al. (2013). LBR and lamin A/C sequentially tether peripheral heterochromatin and inversely regulate differentiation. *Cell* **152**, 584–598.
- Somech, R., Shaklai, S., Geller, O., Amariglio, N., Simon, A. J., Rechavi, G. and Gal-Yam, E. N. (2005). The nuclear-envelope protein and transcriptional repressor LAP2 β interacts with HDAC3 at the nuclear periphery, and induces histone H4 deacetylation. *J. Cell Sci.* **118**, 4017–4025.
- Sommer, H., Beltrán, J. P., Huijser, P., Pape, H., Lönnig, W. E., Saedler, H. and Schwarz-Sommer, Z. (1990). Deficiens, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*: the protein shows homology to transcription factors. *EMBO J.* **9**, 605–613.
- Spector, D. L. (2001). Nuclear domains. *J. Cell Sci.* **114**, 2891–2893.
- Spector, D. L. and Lamond, A. I. (2011). Nuclear speckles. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, 1–12.
- Spitz, F. (2016). Gene regulation at a distance: From remote enhancers to 3D regulatory ensembles. *Semin. Cell Dev. Biol.* **57**, 57–67.
- Stasinopoulos, I. A., Mironchik, Y., Raman, A., Wildes, F., Winnard, P. and Raman, V. (2005). HOXA5-twist interaction alters p53 homeostasis in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 2294–2299.
- Stefan, E., Aquin, S., Berger, N., Landry, C. R., Nyfeler, B., Bouvier, M. and Michnick, S. W. (2007). Quantification of dynamic protein complexes using Renilla luciferase fragment complementation applied to protein kinase A activities in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 16916–16921.
- Stevens, K. E. and Mann, R. S. (2007). A balance between two nuclear localization sequences and a nuclear export sequence governs extradenticle subcellular localization. *Genetics* **175**, 1625–1636.

- Stevens, T. J., Lando, D., Basu, S., Atkinson, L. P., Cao, Y., Lee, S. F., Leeb, M., Wohlfahrt, K. J., Boucher, W., O'Shaughnessy-Kirwan, A., et al. (2017). 3D structures of individual mammalian genomes studied by single-cell Hi-C. *Nature* **544**, 59–64.
- Stierlé, V., Couprie, J., Östlund, C., Krimm, I., Zinn-Justin, S., Hossenlopp, P., Worman, H. J., Courvalin, J. C. and Duband-Goulet, I. (2003). The carboxyl-terminal region common to lamins A and C contains a DNA binding domain. *Biochemistry* **42**, 4819–4828.
- Stoll, S. J. and Kroll, J. (2012). HOXC9: A key regulator of endothelial cell quiescence and vascular morphogenesis. *Trends Cardiovasc. Med.* **22**, 7–11.
- Strom, A. R., Emelyanov, A. V., Mir, M., Fyodorov, D. V., Darzacq, X. and Karpen, G. H. (2017). Phase separation drives heterochromatin domain formation. *Nature* **547**, 241–245.
- Stuhlmüller, M., Schwarz-Finsterle, J., Fey, E., Lux, J., Bach, M., Cremer, C., Hinderhofer, K., Hausmann, M. and Hildenbrand, G. (2015). In situ optical sequencing and structure analysis of a trinucleotide repeat genome region by localization microscopy after specific COMBO-FISH nano-probing. *Nanoscale* **7**, 17938–17946.
- Subach, F. V, Malashkevich, V. N., Zencheck, W. D., Xiao, H., Filonov, G. S., Almo, S. C. and Verkhusha, V. V (2009a). Photoactivation mechanism of PAmCherry based on crystal structures of the protein in the dark and fluorescent states. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 21097–21102.
- Subach, F. V, Patterson, G. H., Manley, S., Gillette, J. M., Lippincott-Schwartz, J. and Verkhusha, V. V (2009b). Photoactivatable mCherry for high-resolution two-color fluorescence microscopy. *Nat. Methods* **6**, 153–159.
- Subach, F. V., Patterson, G. H., Renz, M., Lippincott-Schwartz, J. and Verkhusha, V. V. (2010). Bright monomeric photoactivatable red fluorescent protein for two-color super-resolution sptPALM of live cells. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 6481–6491.
- Sullivan, T., Escalante-Alcalde, D., Bhatt, H., Anver, M., Bhat, N., Nagashima, K., Stewart, C. L. and Burke, B. (1999). Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *J. Cell Biol.* **147**, 913–919.
- Szabo, Q., Jost, D., Chang, J. M., Cattoni, D. I., Papadopoulos, G. L., Bonev, B., Sexton, T., Gurgo, J., Jacquier, C., Nollmann, M., et al. (2018). TADs are 3D structural units of higher-order chromosome organization in *Drosophila*. *Sci. Adv.* **4**, eaar8082.
- Tamayo, J. V., Gujar, M., Macdonald, S. J. and Lundquist, E. A. (2013). Functional transcriptomic analysis of the role of MAB-5/Hox in Q neuroblast migration in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Genomics* **14**, 304.

- Tanay, A.** (2006). Extensive low-affinity transcriptional interactions in the yeast genome. *Genome Res.* **16**, 962–972.
- Taniguchi, Y.** (2014). Hox transcription factors: Modulators of cell-cell and cell-extracellular matrix adhesion. *Biomed Res. Int.* **2014**,.
- Tantale, K., Mueller, F., Kozulic-Pirher, A., Lesne, A., Victor, J. M., Robert, M. C., Capozzi, S., Chouaib, R., Bäcker, V., Mateos-Langerak, J., et al.** (2016). A single-molecule view of transcription reveals convoys of RNA polymerases and multi-scale bursting. *Nat. Commun.* **7**, 1–14.
- Tao, G., Kahr, P. C., Morikawa, Y., Zhang, M., Rahmani, M., Heallen, T. R., Li, L., Sun, Z., Olson, E. N., Amendt, B. A., et al.** (2016). Pitx2 promotes heart repair by activating the antioxidant response after cardiac injury. *Nature* **534**, 119–123.
- Tapscott, S. J., Davis, R. L., Thayer, M. J., Cheng, P. F., Weintraub, H. and Lassar, A. B.** (1988). MyoD1: A nuclear phosphoprotein requiring a Myc homology region to convert fibroblasts to myoblasts. *Science (80-)*. **242**, 405–411.
- Tatavosian, R., Duc, H. N., Huynh, T. N., Fang, D., Schmitt, B., Shi, X., Deng, Y., Phiel, C., Yao, T., Zhang, Z., et al.** (2018). Live-cell single-molecule dynamics of PcG proteins imposed by the DIPG H3.3K27M mutation. *Nat. Commun.* **9**, 1–16.
- Testa, I., Urban, N. T., Jakobs, S., Eggeling, C., Willig, K. I. and Hell, S. W.** (2012). Nanoscopy of Living Brain Slices with Low Light Levels. *Neuron* **75**, 992–1000.
- Thomas-Chollier, M., Ledent, V., Leyns, L. and Vervoort, M.** (2010). A non-tree-based comprehensive study of metazoan Hox and ParaHox genes prompts new insights into their origin and evolution. *BMC Evol. Biol.* **10**, 73.
- Thomas, M. C. and Chiang, M.** (2006). The General Transcription Machinery and General Cofactors INTRODUCTION Discovery of Eukaryotic RNA Polymerase I,II,III, and IV. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **41**, 105–178.
- Tian, T., Harding, A., Inder, K., Plowman, S., Parton, R. G. and Hancock, J. F.** (2007). Plasma membrane nanoswitches generate high-fidelity Ras signal transduction. *Nat. Cell Biol.* **9**, 905–914.
- Tokunaga, M., Imamoto, N. and Sakata-Sogawa, K.** (2007). Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells. *Nat. Methods* **5**,.
- Tomoyasu, Y., Wheeler, S. R. and Denell, R. E.** (2005). Ultrabithorax is required for membranous wing identity in the beetle *Tribolium castaneum*. *Nature* **433**, 643–647.
- Tønnesen, J., Nadrigny, F., Willig, K. I., Wedlich-Söldner, R. and Nägerl, U. V.** (2011). Two-color STED microscopy of living synapses using a single laser-beam pair. *Biophys. J.* **101**, 2545–2552.

- Towbin, B. D., González-Aguilera, C., Sack, R., Gaidatzis, D., Kalck, V., Meister, P., Askjaer, P. and Gasser, S. M. (2012). Step-wise methylation of histone H3K9 positions heterochromatin at the nuclear periphery. *Cell* **150**, 934–47.
- Trcek, T., Grosch, M., York, A., Shroff, H., Lionnet, T. and Lehmann, R. (2015). Drosophila germ granules are structured and contain homotypic mRNA clusters. *Nat. Commun.* **6**, 1–12.
- Trinkle-Mulcahy, L. (2019). Recent advances in proximity-based labeling methods for interactome mapping [version 1; referees: 2 approved]. *F1000Research* **8**,.
- Truckenbrodt, S., Sommer, C., Rizzoli, S. O. and Danzl, J. G. (2019). A practical guide to optimization in X10 expansion microscopy. *Nat. Protoc.* **14**, 832–863.
- Trudeau, T., Nassar, R., Cumberworth, A., Wong, E. T. C., Woollard, G. and Gsponer, J. (2013). Structure and intrinsic disorder in protein autoinhibition. *Structure* **21**, 332–341.
- Truong Quang, B. A. and Lenne, P. F. (2015). Superresolution measurements in vivo: Imaging Drosophila embryo by photoactivated localization microscopy. *Methods Cell Biol.*
- Tsai, A., Muthusamy, A. K., Alves, M. R., Lavis, L. D., Singer, R. H., Stern, D. L. and Crocker, J. (2017). Nuclear microenvironments modulate transcription from low-affinity enhancers. *Elife* **6**,.
- Tsai, A., Alves, M. R. P. P. R. and Crocker, J. (2019). Multi-enhancer transcriptional hubs confer phenotypic robustness. *Elife* **8**, 575175.
- Tsanov, N., Samacoits, A., Chouaib, R., Traboulsi, A. M., Gostan, T., Weber, C., Zimmer, C., Zibara, K., Walter, T., Peter, M., et al. (2016). SmiFISH and FISH-quant - A flexible single RNA detection approach with super-resolution capability. *Nucleic Acids Res.* **44**, 165.
- Turgay, Y., Eibauer, M., Goldman, A. E., Shimi, T., Khayat, M., Ben-Harush, K., Dubrovsky-Gaupp, A., Sapra, K. T., Goldman, R. D. and Medalia, O. (2017). The molecular architecture of lamins in somatic cells. *Nature* **543**, 261–264.
- Turkowyd, B., Virant, D. and Endesfelder, U. (2016). From single molecules to life: microscopy at the nanoscale. *Anal. Bioanal. Chem.*
- Uetz, P., Glot, L., Cagney, G., Mansfield, T. A., Judson, R. S., Knight, J. R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., et al. (2000). A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **403**, 623–627.
- Urban, N. T., Willig, K. I., Hell, S. W. and Nägerl, U. V. (2011). STED nanoscopy of actin dynamics in synapses deep inside living brain slices. *Biophys. J.* **101**, 1277–1284.
- Vahedi, G., Kanno, Y., Furumoto, Y., Jiang, K., Parker, S. C. J., Erdos, M. R., Davis, S. R., Roychoudhuri, R., Restifo, N. P., Gadina, M., et al. (2015). Super-

- enhancers delineate disease-associated regulatory nodes in T cells. *Nature* **520**, 558–562.
- Vakoc, C. R., Letting, D. L., Gheldof, N., Sawado, T., Bender, M. A., Groudine, M., Weiss, M. J., Dekker, J. and Blobel, G. A. (2005). Proximity among distant regulatory elements at the β -globin locus requires GATA-1 and FOG-1. *Mol. Cell* **17**, 453–462.
- Van De Linde, S. and Sauer, M. (2014). How to switch a fluorophore: From undesired blinking to controlled photoswitching. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 1076–1087.
- Van De Linde, S., Endesfelder, U., Mukherjee, A., Schüttpelz, M., Wiebusch, G., Wolter, S., Heilemann, M. and Sauer, M. (2009). Multicolor photoswitching microscopy for subdiffraction-resolution fluorescence imaging. *Photochem. Photobiol. Sci.* **8**, 465–469.
- Van De Linde, S., Löschberger, A., Klein, T., Heidbreder, M., Wolter, S., Heilemann, M. and Sauer, M. (2011). Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes. *Nat. Protoc.* **6**, 991–1009.
- Van Den Dries, K., Schwartz, S. L., Byars, J., Meddens, M. B. M., Bolomini-Vittori, M., Lidke, D. S., Figdor, C. G., Lidke, K. A. and Cambi, A. (2013). Dual-color superresolution microscopy reveals nanoscale organization of mechanosensory podosomes. *Mol. Biol. Cell* **24**, 2112–2123.
- van Steensel, B., Brink, M., van der Meulen, K., van Binnendijk, E. P., Wansink, D. G., de Jong, L., de Kloet, E. R. and van Driel, R. (1995). Localization of the glucocorticoid receptor in discrete clusters in the cell nucleus. *J. Cell Sci.* **108**,.
- Vandenberg, W., Leutenegger, M., Lasser, T., Hofkens, J. and Dedecker, P. (2015). Diffraction-unlimited imaging: from pretty pictures to hard numbers. *Cell Tissue Res.* **360**, 151–178.
- Vangindertael, J., Camacho, R., Sempels, W., Mizuno, H., Dedecker, P. and Janssen, K. P. F. F. (2018). *An introduction to optical super-resolution microscopy for the adventurous biologist.*
- Vanheusden, M., Vitale, R., Camacho, R., Janssen, K. P. F., Acke, A., Rocha, S. and Hofkens, J. (2020). Fluorescence photobleaching as an intrinsic tool to quantify the 3D expansion factor of biological samples in expansion microscopy. *ACS Omega* **5**, 6792.
- Vazquez, J., Müller, M., Pirrotta, V. and Sedat, J. W. (2006). The Mcp element mediates stable long-range chromosome-chromosome interactions in *Drosophila*. *Mol. Biol. Cell* **17**, 2158–2165.
- Venkatesan, K., Rual, J. F., Vazquez, A., Stelzl, U., Lemmens, I., Hirozane-Kishikawa, T., Hao, T., Zenkner, M., Xin, X., Goh, K. II, et al. (2009). An empirical framework for binary interactome mapping. *Nat. Methods* **6**, 83–90.
- Vergnes, L., Péterfy, M., Bergo, M. O., Young, S. G. and Reue, K. (2004). Lamin B1

- is required for mouse development and nuclear integrity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 10428–10433.
- Vicidomini, G., Moneron, G., Han, K. Y., Westphal, V., Ta, H., Reuss, M., Engelhardt, J., Eggeling, C. and Hell, S. W. (2011). Sharper low-power STED nanoscopy by time gating. *Nat. Methods* **8**, 571–575.
- Vidal, M., Cusick, M. E. and Barabási, A.-L. (2011). Interactome Networks and Human Disease.
- Vietri Rudan, M., Barrington, C., Henderson, S., Ernst, C., Odom, D. T., Tanay, A. and Hadjur, S. (2015). Comparative Hi-C Reveals that CTCF Underlies Evolution of Chromosomal Domain Architecture. *Cell Rep.* **10**, 1297–1309.
- Vigouroux, C., Auclair, M., Dubosclard, E., Pouchelet, M., Capeau, J., Courvalin, J.-C. and Buendia, B. (2001). Nuclear envelope disorganization in fibroblasts from lipodystrophic patients with heterozygous R482Q/W mutations in the lamin A/C gene. *J. Cell Sci.* **114**,.
- Villalobos, V., Naik, S. and Piwnica-Worms, D. (2007). Current State of Imaging Protein-Protein Interactions In Vivo with Genetically Encoded Reporters. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **9**, 321–349.
- von Mering, C., Krause, R., Snel, B., Cornell, M., Oliver, S. G., Fields, S. and Bork, P. (2002). Comparative assessment of large-scale data sets of protein-protein interactions. *Nature* **417**, 399–403.
- Wagner, N. and Krohne, G. (2007). LEM-Domain Proteins: New Insights into Lamin-Interacting Proteins. *Int. Rev. Cytol.* **261**, 1–46.
- Waldchen, S., Lehmann, J., Klein, T., Van De Linde, S. and Sauer, M. (2015). Light-induced cell damage in live-cell super-resolution microscopy. *Sci. Rep.* **5**, 1–12.
- Walter, J., Schermelleh, L., Cremer, M., Tashiro, S. and Cremer, T. (2003). Chromosome order in HeLa cells changes during mitosis and early G1, but is stably maintained during subsequent interphase stages. *J. Cell Biol.* **160**, 685–697.
- Wang, Q., Carroll, J. S. and Brown, M. (2005). Spatial and temporal recruitment of androgen receptor and its coactivators involves chromosomal looping and polymerase tracking. *Mol. Cell* **19**, 631–642.
- Wang, F., Flanagan, J., Su, N., Wang, L. C., Bui, S., Nielson, A., Wu, X., Vo, H. T., Ma, X. J. and Luo, Y. (2012). RNAscope: A novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J. Mol. Diagnostics* **14**, 22–29.
- Wang, H., Yang, H., Shivalila, C. S., Dawlaty, M. M., Cheng, A. W., Zhang, F. and Jaenisch, R. (2013). One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/cas-mediated genome engineering. *Cell* **153**, 910–918.

- Wang, S., Ding, M., Chen, X., Chang, L. and Sun, Y. (2017). Development of bimolecular fluorescence complementation using rsEGFP2 for detection and super-resolution imaging of protein-protein interactions in live cells. *Biomed. Opt. Express* **8**, 3119.
- Wang, S., Hao, Y., Zhang, L., Wang, F., Li, J., Wang, L. and Fan, C. (2019). Multiplexed Superresolution CRISPR Imaging of Chromatin in Living Cells.
- Warren, R. W., Nagy, L., Selegue, J., Gates, J. and Carroll, S. (1994). Evolution of homeotic gene regulation and function in flies and butterflies. *Nature* **372**, 458–461.
- Wehr, M. C., Reinecke, L., Botvinnik, A. and Rossner, M. J. (2008). Analysis of transient phosphorylation-dependent protein-protein interactions in living mammalian cells using split-TEV. *BMC Biotechnol.* **8**,.
- Weighardt, F., Cobianchi, F., Cartegni, L., Chiodi, I., Villa, A., Riva, S. and Biamonti, G. (1999). A novel hnRNP protein (HAP/SAF-B) enters a subset of hnRNP complexes and relocates in nuclear granules in response to heat shock. *J. Cell Sci.* **112**,.
- Whyte, W. A., Orlando, D. A., Hnisz, D., Abraham, B. J., Lin, C. Y., Kagey, M. H., Rahl, P. B., Lee, T. I. and Young, R. A. (2013). Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell* **153**, 307–319.
- Wildanger, D., Bückers, J., Westphal, V., Hell, S. W. and Kastrup, L. (2009a). A STED microscope aligned by design. *Opt. Express* **17**, 16100.
- Wildanger, D., Medda, R., Kastrup, L. and Hell, S. W. (2009b). A compact STED microscope providing 3D nanoscale resolution. *J. Microsc.* **236**, 35–43.
- Willig, K. I., Kellner, R. R., Medda, R., Hein, B., Jakobs, S. and Hell, S. W. (2006a). Nanoscale resolution in GFP-based microscopy. *Nat. Methods* **3**, 721–723.
- Willig, K. I., Rizzoli, S. O., Westphal, V., Jahn, R. and Hell, S. W. (2006b). STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis. *Nature* **440**, 935–939.
- Winnik, S., Klinkert, M., Kurz, H., Zoeller, C., Heinke, J., Wu, Y., Bode, C., Patterson, C. and Moser, M. (2009). HoxB5 induces endothelial sprouting in vitro and modifies intussusceptive angiogenesis in vivo involving angiopoietin-2. *Cardiovasc. Res.* **83**, 558–565.
- Winter, F. R., Loidolt, M., Westphal, V., Butkevich, A. N., Gregor, C., Sahl, S. J. and Hell, S. W. (2017). Multicolour nanoscopy of fixed and living cells with a single STED beam and hyperspectral detection. *Sci. Rep.* **7**, 1–11.
- Wu, F. and Yao, J. (2017). Identifying novel transcriptional and epigenetic features of nuclear lamina-associated genes. *Sci. Rep.* **7**,.
- Wu, T., Pi, E. X., Tsai, S. N., Lam, H. M., Sun, S. M., Kwan, Y. W. and Ngai, S. M.

- (2011). GmPHD5 acts as an important regulator for crosstalk between histone H3K4 di-methylation and H3K14 acetylation in response to salinity stress in soybean. *BMC Plant Biol.* **11**,.
- Wu, X., Mao, S., Yang, Y., Rushdi, M. N., Krueger, C. J. and Chen, A. K. (2018). A CRISPR/molecular beacon hybrid system for live-cell genomic imaging. *Nucleic Acids Res.*
- Wu, X., Mao, S., Ying, Y., Krueger, C. J. and Chen, A. K. (2019). Progress and Challenges for Live-cell Imaging of Genomic Loci Using CRISPR-based Platforms. *Genomics. Proteomics Bioinformatics* **17**, 119–128.
- Xie, Q., Soutto, M., Xu, X., Zhang, Y. and Johnson, C. H. (2011). Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) imaging in plant seedlings and mammalian cells. *Methods Mol. Biol.* **680**, 3–28.
- Xu, N., Pirraglia, C., Patel, U. and Monn, M. (2012). Mechanisms of Lumen Development in Drosophila Tubular Organs. In *Embryogenesis*, p. InTech.
- Xu, K., Zhong, G. and Zhuang, X. (2013). Actin, spectrin, and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons. *Science (80-)*. **339**, 452–456.
- Xu, J., Ma, H., Jin, J., Uttam, S., Fu, R., Huang, Y. and Liu, Y. (2018). Super-Resolution Imaging of Higher-Order Chromatin Structures at Different Epigenomic States in Single Mammalian Cells. *Cell Rep.* **24**, 873–882.
- Xue, M., Hou, J., Wang, L., Cheng, D., Lu, J., Zheng, L. and Xu, T. (2017). Optimizing the fragment complementation of APEX2 for detection of specific protein-protein interactions in live cells. *Sci. Rep.* **7**, 1–8.
- Yamazaki, T., Souquere, S., Chujo, T., Kobelke, S., Chong, Y. S., Fox, A. H., Bond, C. S., Nakagawa, S., Pierron, G. and Hirose, T. (2018). Functional Domains of NEAT1 Architectural lncRNA Induce Paraspeckle Assembly through Phase Separation. *Mol. Cell* **70**, 1038-1053.e7.
- Yáñez-Cuna, J. O. and van Steensel, B. (2017). Genome–nuclear lamina interactions: from cell populations to single cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **43**, 67–72.
- Yao, J., Fetter, R. D., Hu, P., Betzig, E. and Tjian, R. (2011). Subnuclear segregation of genes and core promoter factors in myogenesis. *Genes Dev.* **25**, 569–580.
- Ye, Q. and Worman, H. J. (1996). Interaction between an integral protein of the nuclear envelope inner membrane and human chromodomain proteins homologous to Drosophila HP1. *J. Biol. Chem.* **271**, 14653–14656.
- York, A. G., Parekh, S. H., Dalle Nogare, D., Fischer, R. S., Temprine, K., Mione, M., Chitnis, A. B., Combs, C. A. and Shroff, H. (2012). Resolution doubling in live, multicellular organisms via multifocal structured illumination microscopy. *Artic. Nat. methods* / **9**, 749.

- Youn, J. Y., Dunham, W. H., Hong, S. J., Knight, J. D. R., Bashkurov, M., Chen, G. I., Bagci, H., Rathod, B., MacLeod, G., Eng, S. W. M., et al. (2018). High-Density Proximity Mapping Reveals the Subcellular Organization of mRNA-Associated Granules and Bodies. *Mol. Cell* **69**, 517-532.e11.
- Zandvakili, A. and Gebelein, B. (2016). Mechanisms of specificity for hox factor activity. *J. Dev. Biol.* **4**.
- Zeiske, T., Baburajendran, N., Kaczynska, A., Brasch, J., Palmer, A. G., Shapiro, L., Honig, B. and Mann, R. S. (2018). Intrinsic DNA Shape Accounts for Affinity Differences between Hox-Cofactor Binding Sites. *Cell Rep.* **24**, 2221–2230.
- Zhang, Y. and Raymo, F. M. (2020). Photoactivatable fluorophores for single-molecule localization microscopy of live cells. *Methods Appl. Fluoresc.*
- Zhang, M., Chang, H., Zhang, Y., Yu, J., Wu, L., Ji, W., Chen, J., Liu, B., Lu, J., Liu, Y., et al. (2012). Rational design of true monomeric and bright photoactivatable fluorescent proteins. *Nat. Methods* **9**, 727–729.
- Zhang, Y., Zhang, X. O., Chen, T., Xiang, J. F., Yin, Q. F., Xing, Y. H., Zhu, S., Yang, L. and Chen, L. L. (2013). Circular Intronic Long Noncoding RNAs. *Mol. Cell* **51**, 792–806.
- Zhang, J., Dewar, J. M., Budzowska, M., Motnenko, A., Cohn, M. A. and Walter, J. C. (2015). DNA interstrand cross-link repair requires replication-fork convergence. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 242–247.
- Zhang, X. E., Cui, Z. and Wang, D. (2016). Sensing of biomolecular interactions using fluorescence complementing systems in living cells. *Biosens. Bioelectron.* **76**, 243–250.
- Zhao, Y. and Potter, S. S. (2001). *The Hoxa13 homeobox*.
- Zhao, Y. and Potter, S. S. (2002). Functional comparison of the Hoxa 4, Hoxa 10, and Hoxa 11 homeoboxes. *Dev. Biol.* **244**, 21–36.
- Zhao, D., Yang, Y., Qu, N., Chen, M., Ma, Z., Krueger, C. J., Behlke, M. A. and Chen, A. K. (2016). Single-molecule detection and tracking of RNA transcripts in living cells using phosphorothioate-optimized 2'-O-methyl RNA molecular beacons. *Biomaterials* **100**, 172–183.
- Zheng, X., Hu, J., Yue, S., Kristiani, L., Kim, M., Sauria, M., Taylor, J., Kim, Y. and Zheng, Y. (2018). Lamins Organize the Global Three-Dimensional Genome from the Nuclear Periphery. *Mol. Cell* **71**, 802-815.e7.
- Zhou, B., Bagri, A. and Beckendorf, S. K. (2001). Salivary Gland Determination in *Drosophila*: A Salivary-Specific, fork head Enhancer Integrates Spatial Pattern and Allows fork head Autoregulation. *Dev. Biol.* **237**, 54–67.
- Zhu, X., Ling, J., Zhang, L., Pi, W., Wu, M. and Tuan, D. (2007). A facilitated tracking and transcription mechanism of long-range enhancer function.

Nucleic Acids Res. **35**, 5532–5544.

- Žigman, M., Laumann-Lipp, N., Titus, T., Postlethwait, J. and Moens, C. B. (2014). Hoxb1b controls oriented cell division, cell shape and microtubule dynamics in neural tube morphogenesis. *Dev.* **141**, 639–649.
- Zouaz, A., Auradkar, A., Delfini, M. C., Macchi, M., Barthez, M., Akoa, S. E., Bastianelli, L., Xie, G., Deng, W.-M., Levine, S. S., et al. (2017). The Hox proteins Ubx and AbdA collaborate with the transcription pausing factor M1BP to regulate gene transcription. *EMBO J.*
- Zuin, J., Dixon, J. R., Van Der Reijden, M. I. J. A., Ye, Z., Kolovos, P., Brouwer, R. W. W., Van De Corput, M. P. C., Van De Werken, H. J. G., Knoch, T. A., Van Ijcken, W. F. J., et al. (2014). Cohesin and CTCF differentially affect chromatin architecture and gene expression in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 996–1001.
- Zykova, T. Y., Levitsky, V. G., Belyaeva, E. S. and Zhimulev, I. F. (2017). Polytene Chromosomes – A Portrait of Functional Organization of the Drosophila Genome. *Curr. Genomics* **19**, 179–191.