



HAL
open science

Dose et cofacteurs des protéines Hox lors du développement des organes de vol chez les insectes

Guillaume Giraud

► **To cite this version:**

Guillaume Giraud. Dose et cofacteurs des protéines Hox lors du développement des organes de vol chez les insectes. Embryologie et organogenèse. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LY-SEN089 . tel-03905218

HAL Id: tel-03905218

<https://theses.hal.science/tel-03905218v1>

Submitted on 18 Dec 2022

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 : 2020LYSEN089

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

Ecole Doctorale N° 340
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire (BMIC)
Discipline : Sciences de la vie et de la santé

Soutenue publiquement le 17/12/2020, par :
Guillaume Giraud

**Dose et cofacteurs des protéines Hox
lors du développement des organes de
vol chez les insectes**

Devant le jury composé de :

Dr. Boube Muriel, Chargée de recherche	CBI (Toulouse)	Rapporteuse
Pr. Casanova Jordi, Professeur	IRB (Barcelone)	Rapporteur
Pr. Durand Bénédicte, Professeure	INMG (Lyon)	Examinatrice
Dr. Prud'homme Benjamin, Directeur de Recherche	IBDM (Marseille)	Examineur
Dr. Merabet Samir, Directeur de Recherche	IGFL (Lyon)	Directeur de thèse

Résumé

Au cours de l'évolution, les êtres vivants ont développé une étonnante diversité morphologique leur permettant de s'adapter à des environnements très variés. L'un des exemples les plus frappants est la radiation des appendices de vol chez les insectes à partir d'ancêtres possédant deux paires d'ailes très similaires. Plusieurs travaux montrent l'importance d'un gène Hox particulier, *Ultrabithorax (Ubx)*, pour la formation des organes de vol postérieurs. Ceux-ci correspondent à des organes balanciers appelés « haltères » chez les diptères. A l'inverse, la formation des organes de vol antérieurs est considérée comme indépendante des gènes Hox.

Au cours de mes travaux de thèse, nous avons remis en question ce modèle, et montré que la protéine Hox Antennapedia (*Antp*) est non seulement produite dans le primordium de l'aile mais également nécessaire à la formation des ailes antérieures chez la mouche des fruits *Drosophila melanogaster*. De manière surprenante, la dose de *Antp* est bien en deçà de celle observée pour *Ubx* dans le primordium d'haltère, et l'augmentation artificielle de cette dose suffit à transformer l'aile en haltère. À l'inverse, la diminution contrôlée de la dose de *Ubx* induit une transformation de l'haltère en aile. Ces résultats montrent ainsi que ce n'est pas le type de protéine Hox, ici *Antp* ou *Ubx*, mais leur dose, qui contrôle le programme développemental de type aile ou haltère chez la drosophile. L'analyse du rôle du facteur de transcription Homothorax (*Hth*) montre également que celui-ci est nécessaire respectivement à l'activation de *Antp* et à la répression de *Ubx* dans les primordia d'aile et d'haltère, permettant de mettre en place un profil d'expression spécifique. L'observation d'une corrélation entre variation de dose Hox et formation d'ailes identiques ou différentes dans d'autres lignages d'insectes permet de proposer un nouveau modèle dans lequel les modifications du niveau d'expression des gènes *Antp* et *Ubx* pourraient être plus largement responsables de la diversification morphologique des organes de vol au cours de l'évolution des insectes.

Comment la protéine *Ubx* parvient à spécifier le programme développemental des haltères chez la drosophile reste encore mal compris au niveau moléculaire. En particulier, il est attendu que son activité dose-dépendante puisse reposer sur l'interaction avec d'autres partenaires transcriptionnels. J'ai donc initié deux approches complémentaires originales pour identifier de nouveaux cofacteurs de *Ubx*. Si l'une des approches n'a pu aboutir à son terme, l'autre a permis d'identifier un certain nombre de nouveaux partenaires et de révéler une stabilité surprenante du programme développemental de l'haltère.

Summary

During evolution, animals have developed an astonishing morphological diversity, allowing them to adapt to a wide variety of environments. One of the most striking examples is the radiation of flight appendages in insects, starting from ancestors with two similar pairs of wings. Several studies showed the implication of a particular Hox gene, *Ultrabithorax (Ubx)*, in the formation of posterior flight organs. These organs correspond to the "halteres" in Diptera. Conversely, the formation of anterior flight organs is considered to be Hox independent.

During my Ph.D work, we have questioned this model. We showed that the Hox protein Antennapedia (*Antp*) is produced in the wing primordium of the fruit fly *Drosophila melanogaster* and is required for the formation of forewings. Surprisingly, the expression level of *Antp* is much lower than the level of *Ubx* in the haltere primordium, and the artificial increase of *Antp* level can transform the wing into a haltere. Conversely, the artificial decrease of the *Ubx* level can induce a haltere to wing transformation. These results show that this is not the type of the Hox protein, here *Antp* or *Ubx*, but the specific dose, which is important for the formation of a wing or a haltere in *Drosophila*. We also identified the transcription factor Homothorax (*Hth*) as an upstream regulator of *Antp* and *Ubx* in the wing and haltere primordia respectively. The observation of a correlation between Hox dose variation and wing morphology in other insect lineages supports a new model in which morphological diversification of flight organs during insect evolution could arise from changes in the *Antp* and *Ubx* expression level.

How the *Ubx* protein could specify the haltere developmental program at the molecular level remains elusive. It is expected that the dose-specific activity of *Ubx* in the haltere could rely on the interaction with other transcriptional partners. I present two complementary approaches that I developed to capture such cofactors. While one approach is still ongoing, the other led to the identification of interesting putative *Ubx*-partners. This work also revealed a surprising robustness in the *Ubx* transcriptional program that may explain why halteres diverged very little during insect evolution.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Samir, je pense que j'aurais difficilement pu espérer un meilleur directeur de thèse. Pédagogue, et toujours accessible pour tous les membres de l'équipe, mais aussi très bon dans l'exercice difficile d'encadrer des doctorants, particulièrement quand il s'agit de gérer les inévitables périodes de doutes et de stress. Grâce à tout ça, il règne une excellente ambiance dans l'équipe malgré les aléas de la recherche. J'espère que cette épidémie n'aura pas définitivement raison de nos séances de boxe au parc de Gerland !

Un grand Merci à tous les membres de l'équipe, passés et présents, pour leur soutien et leur bonne humeur toutes ces années : Merci Agnès, Amélie, Françoise, Juliette, Leiore, Marilyne, Nawal, Solène, Sylvie, Rachel, Frédérique, Jonathan et Yunlong.

Thank you, Rachel, for having been my senior during my M2 internship, and it was a great pleasure to work with you all these years, even if you'll probably never stop to believe me when I pretend I'm going to do something stupid like « optimizing » the cooldown of the confocal using dry ice! It was a lot of fun being around you, and I really enjoyed discovering your beautiful country with Mylène and Theo. I can't wait to fly back to Mumbai and see again all our new Indian friends (especially Bruno and Jimmy) and taste all the different chapati! Maybe Theo will do it soon as his visa is still valid when I am writing these lines ^^

Merci aussi à Solène pour ta positivité permanente, même si tu pourrais faire un effort pour choisir des musiques plus originales... Peut-être début 2021 ? Ce serait prendre une super résolution !

La « salle mouches » aurait été bien triste sans Marilyne, Rachel, Solène et Fred. Merci pour ces discussions à propos de tout et de rien pendant les longues séances de dissections. Et merci pour votre ouverture d'esprit quand je choisisais la musique !

Un merci particulier à Marilyne, toujours aussi bienveillante depuis mon arrivée en stage de M1, et qui a toujours un bon conseil quand on bloque sur une technique.

Merci aussi, Françoise, pour ton aide avec les EMSA, et Jonathan pour avoir mis au point le protocole de BioID avec moi, on aura bien ramé !

Un grand Merci à Julie Carnesecchi, pour ton soutien, ton enthousiasme toujours au beau fixe, tes conseils concernant la BioID et ta relecture critique de mon manuscrit.

Thank you Soumen Khan for the interesting discussions we had, and your bioinformatic analysis.

Je tiens aussi à adresser un grand Merci aux membres de mon comité de thèse, Dali Ma, Stéphane Vincent, Abderrahman Khila et Benjamin Prud'homme pour vos conseils et vos encouragements.

Merci aux autres personnes qui ont pris le temps de relire mon manuscrit, ma tante Annie, mon père, et Pierre-Luc. Merci aussi à Mélanie pour son soutien moral pendant qu'elle partageait avec moi la « cave à thésards » (et ses muffins au chocolat !) pendant notre période de rédaction.

Je remercie aussi les membres du PLATIM pour leur accueil lors de mes sessions de microscopie électronique.

Remerciement spécial au groupe SM/FL, pour les repas partagés et les soirées jeux : Claire, Jessika, Pauline, Rachel, Solène, Filipe, Jonathan, Théo et Vincent. C'était super de vous croiser au labo et en dehors pendant toutes ces années, même si vous faites un peu trop de jeux de mots pourri à mon goût... ;-)

Plus largement, Merci à toutes les personnes formidables que j'ai pu croiser à l'IGFL pendant ces quelques années, que ce soit parmi les autres équipes de recherche, à l'administration, à la laverie, au magasin, ou à la sécurité.

Bien sûr un grand Merci à mes parents Corinne et Alain, pour m'avoir toujours soutenu et encouragé, pour leur confiance inconditionnelle.

Enfin, un immense merci à mon amour Mylène (cohabiter avec un thésard devrait aussi donner droit à un diplôme !), et ma fille Tamara, ma plus belle source de fatigue et de motivation ! Ma ding wa !



Sommaire

Résumé	1
Summary	2
Remerciements	3
Sommaire	5
Chapitre I : Introduction	7
1. Fonctions des gènes Hox et spécification des axes longitudinaux chez les animaux	7
1.1 Une fonction ancestrale de spécification des axes ?	7
1.2 Fonction des gènes Hox le long de l'axe antéro-postérieur des animaux à symétrie bilatérale	9
1.3 Complexes génomiques et colinéarité.....	13
1.4 Modification du profil d'expression des gènes Hox et changements morphologiques au cours de l'évolution.....	18
1.5 Fonctions génériques et spécifiques des gènes Hox	26
1.6 Régulation de l'expression des gènes Hox.....	32
2. Caractéristiques moléculaires des protéines Hox	43
2.1 Caractéristiques intra-moléculaires des protéines Hox.....	43
2.2 Spécificité de liaison à l'ADN et rôle des cofacteur PBC.....	50
2.3 Versatilité moléculaire : les interactions entre protéines Hox et leurs cofacteurs	55
3. Approches expérimentales pour l'analyse des interactions protéine-protéine (IPP) à large échelle ou individuelles	65
3.1 Approches expérimentales pour l'analyse des interactions protéine-protéine (IPP) à large échelle	66
3.2 Approches expérimentales pour l'analyse des interactions protéine-protéine (IPP) individuelles	72
4. Le développement des appendices de vol chez les insectes.....	80
4.1 L'origine et l'évolution des appendices de vol chez les insectes.....	80
4.2 Le développement des ailes chez la drosophile	85
4.3 Rôle du gène Ubx au cours du développement de l'haltère	90
Chapitre II : Résultats	99
Partie 1 : Hox dosage and the control of flight appendage morphology in insects.....	99

Partie 2 : Identification de cofacteurs de Ubx nécessaires lors du développement des haltères à l'aide d'un crible par interférence ARN	135
Introduction	135
L'utilisation d'un contexte génétique sensibilisé facilite l'analyse des phénotypes provoqués lors du crible fonctionnel par ARNi	136
Le crible fonctionnel en contexte sensibilisé révèle différentes catégories de cofacteurs candidats	144
Homothorax présente un rôle ambivalent de régulateur et de cofacteurs de Ubx.....	146
Un nouveau cofacteur candidat de Ubx : Grain (Grn)	149
Figures supplémentaires	151
Chapitre III : Discussion et perspectives.....	154
1. Identification de cofacteurs candidats de Ubx pour le développement correct de l'haltère	154
2. Rôle de sites à faible affinité pour Ubx lors du développement de l'haltère	166
3. Fonction des gènes Hox dans le développement des ailes chez la drosophile	173
4. Dose des protéines Hox et spécification des appendices de vol chez la drosophile ..	175
5. Vers une fonction plus générale et encore peu étudiée de la dose des protéines Hox pour leurs fonctions de spécification.....	177
6. Le rôle de Homothorax lors du développement des appendices de vol chez la drosophile	179
7. Rôle de Antp et Ubx lors de la formation des appendices de vol chez les insectes...	181
Chapitre IV : Annexes	186
Identification de cofacteurs interagissant avec Ubx lors du développement des haltères par une approche basée sur la technique de BiOD	186
Generation of a versatile BiFC ORFeome library for analyzing protein–protein interactions in live <i>Drosophila</i>	191
Abstract	192
Introduction	192
Results	194
Discussion.....	207
Materials and methods	209
References	213
Chapitre V : matériels et méthodes	216
References.....	219

Chapitre I : Introduction

1. Fonctions des gènes Hox et spécification des axes longitudinaux chez les animaux

1.1 Une fonction ancestrale de spécification des axes ?

Au cours du développement des embryons, chaque cellule acquiert une information spatiale et temporelle fournie par des molécules régulatrices afin que les structures correctes se forment aux positions désignées le long des différents axes longitudinaux. Les protéines Hox sont les facteurs de transcription (FT) maîtres pour l'établissement de l'axe antéro-postérieur (AP) chez les animaux à symétrie bilatérale. (Pearson, Lemons, et McGinnis 2005 ; Castelli-Gair Hombría, Sánchez-Higuera, et Sánchez-Herrero 2016). Les gènes Hox, codant pour ces facteurs de transcriptions, sont le plus souvent organisés en complexes chromosomiques, et l'ordre des gènes au sein du complexe reflète leur ordre d'expression le long de l'axe (AP). (**Figure 1A**) Les gènes Hox présentent également une hiérarchie fonctionnelle liée à cela : les gènes Hox les plus postérieurs dominent les gènes plus antérieurs. Lorsque plusieurs gènes Hox sont actifs, c'est le plus postérieur qui détermine l'identité du tissu. Ce phénomène porte le nom de prévalence postérieure (Duboule et Morata 1994). Au sein des embranchements plus précoces, les gènes Hox sont uniquement retrouvés chez les cnidaires, ce qui indique une origine évolutive antérieure à la séparation cnidaires-bilatériens, soit il y a environ 600 millions d'années (Ferrier et Holland 2001 et Putnam et al. 2007) (**Figure 1B**). Des gènes homologues des Hox sont responsables de l'établissement de l'axe oral-aboral (OA) chez certains cnidaires lors de stades très précis de leur développement, ce qui suggère que la symétrie bilatérale contrôlée par des gènes Hox exprimés de manière échelonnée le long d'un axe corporel aurait pu apparaître avant la séparation cnidaires-bilatériens (Finnerty et al. 2004).

Différentes tentatives d'explication de cette homologie de mise en place de ces axes corporels entre les bilatériens et les cnidaires ont récemment émergées. En effet, chez l'anémone de mer *Nematostella vectensis*, les gènes Hox *NvAx6* et *NvAx1* agissent de manière antagoniste en spécifiant les territoires oraux et aboraux, permettant ainsi en interagissant avec la signalisation Wnt de mettre en place l'axe oral-aboral (OA) (DuBuc et al. 2018). (**Figure 1C**) Le gène *NvAx1* spécifiant le pôle aboral de cette anémone de mer semble en effet homologue aux Hox 9 à 13 "postérieurs" des deutérostomes, suggérant une homologie entre le pôle aboral des cnidaires et le pôle postérieur des bilatériens. Cependant, l'activité des gènes canoniques de la voie de signalisation Wnt au niveau du pôle oral est également similaire à celle ayant lieu au pôle postérieur des bilatériens, ce qui suggère également une homologie du pôle oral des cnidaires avec le pôle postérieur des bilatériens. Enfin, les gènes Hox d'autres cnidaires, comme certains hydrozoaires (Chiori et al. 2009), ou certaines hydres (Gauchat et al. 2000) ne présentent pas systématiquement un profil d'expression le long de l'axe OA, ce qui montre que l'homologie entre l'axe OA des cnidaires et l'axe AP des bilatériens n'est pas systématique. En revanche, d'autres observations montrent que les gènes Hox contrôlent la

segmentation radiaire en formant l'axe directeur autour duquel se développe l'endoderme larvaire de *Nematostella vectensis*, spécifiant la formation de structures secondaires telles que les tentacules et les mésentères (He et al. 2018) (**Figure 1 D**).

Cela indique que l'axe directeur des cnidaires pourrait être l'axe sur lequel les gènes Hox pourraient agir pour donner une information de position, comme observé le long de l'axe AP chez les bilatériens. L'analyse des séquences génomiques et protéiques des gènes Hox au cours de l'évolution suggère que les gènes Hox des cnidaires et des bilatériens ont évolué indépendamment à partir d'un complexe commun ancestral hypothétiquement constitué de 4 gènes Hox ; deux gènes Hox Antérieurs des Groupes Paralogue (PG) 1 et 3, un gène Hox Central, et un gène Hox Postérieur (Thomas-Chollier et al. 2010 et DuBuc et al. 2012) (**Figure 1E**).

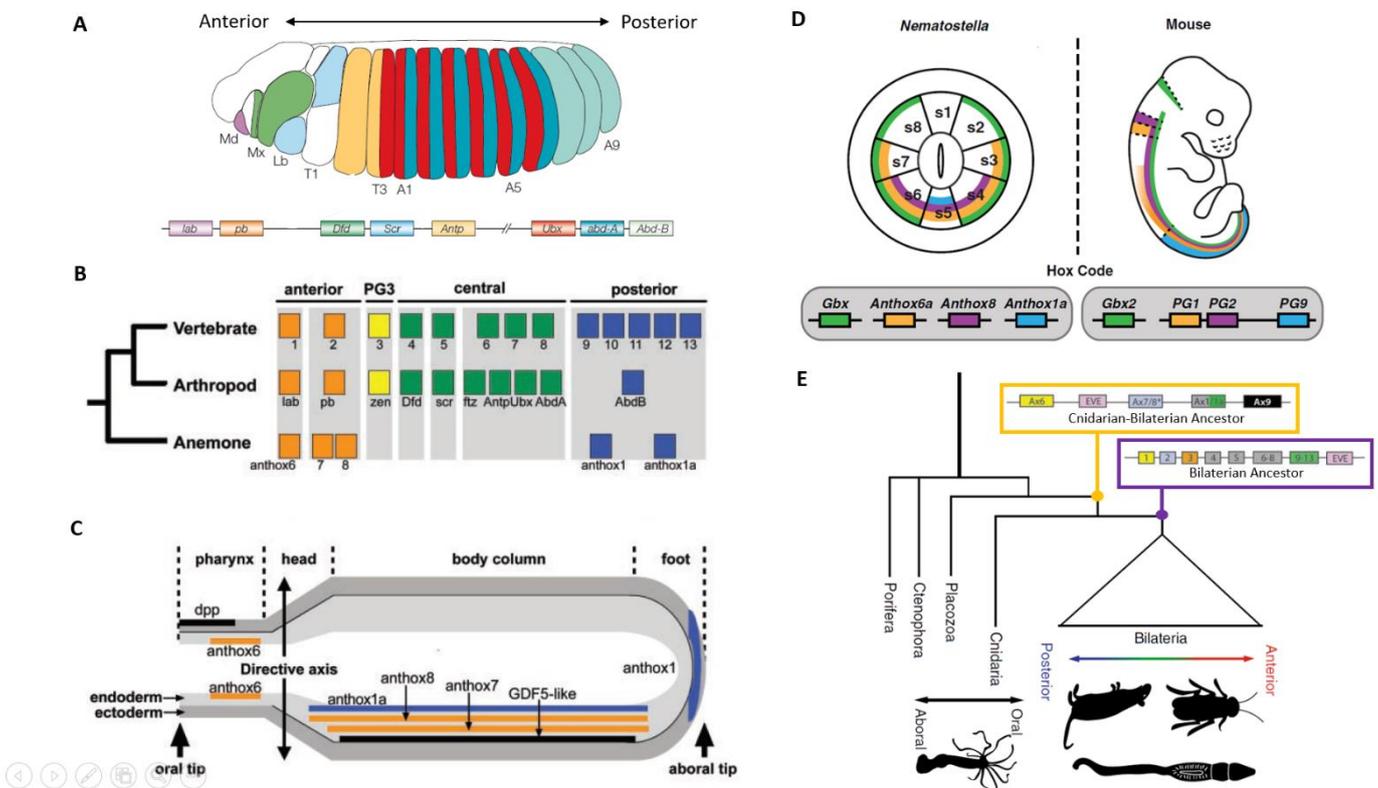


Figure 1 : Rôle et origine évolutive des complexes homéotiques. **A** : Schéma de l'expression des gènes Hox le long de l'axe AP d'un embryon de drosophile au stade 13, et du complexe Hox de la drosophile. Les segments sont annotés (Md : Mandibulaire ; Mx : Maxillaire ; Lb : labial ; T1-T3 : Thoraciques ; A1-A9 : Abdominaux). Les gènes Hox de la drosophile sont annotés (*lab* : labial ; *pb* : proboscipedia ; *Dfd* : Deformed ; *Scr* : Sex comb reduced ; *Antp* : Antennapedia ; *Ubx* : Ultrabithorax ; *abd-A* : abdominal-A ; *Abd-B* : Abdominal-B). Les couleurs indiquent les domaines d'expression approximatifs des gènes Hox à l'exception de *proboscipedia* (*pb*). On observe une colinéarité de l'ordre des gènes au sein du complexe génomique avec leur profil d'expression le long de l'axe AP (adapté à partir de Pearson et al. 2005). **B** : Homologie entre les gènes Hox de *Nematostella vectensis*, des arthropodes et des vertébrés, basée sur l'analyse phylogénétique des homéodomaines. Les gènes Hox des vertébrés sont annotés de 1 à 13. Les gènes Hox des arthropodes incluent aussi les gènes *zen* (*zerknüllt*) et *ftz* (*fushi tarazu*) (Finnerty et al. 2004). **C** : Expression des gènes le long des axes directeur et oral-aboral. Les feuilletts embryonnaires sont présentés selon une coupe longitudinale. Pour simplifier la visualisation de l'axe primaire, le pharynx est représenté retourné. Les mésentères ne sont pas représentés. Les domaines d'expression de cinq gènes Hox recouvrent collectivement la quasi-intégralité de l'axe oral-aboral. *anthox1a*, *anthox7*, et *anthox8* sont restreints à un coté de l'axe directeur. (Finnerty et al. 2004). **D** : Comparaison du code Hox fonctionnel chez un représentant des cnidaires (*Nematostella vectensis*, à gauche) et un

représentant des vertébrés (la souris, à droite). Les gènes Hox chez *Nematostella* contrôlent la segmentation radiale, formant l'axe directeur de l'endoderme larvaire, ce qui montre une homologie avec le développement de l'axe AP des bilatériens (He et al. 2018). E : Arbre phylogénétique montrant que les cnidaires et les bilatériens sont les seuls sous-embranchements des animaux à posséder des complexes de gènes Hox. On propose que l'ancêtre hypothétique des bilatériens possédaient un complexe de gènes Hox constitué de deux paralogues antérieurs (1 et 2) d'un gène du groupe paralogue 3, de trois gènes Hox centraux (*Hox4*, *Hox5* et *Hox6-8*), d'un gène Hox postérieur (*Hox9-14*) et d'un gène à Homéobox (*Eve*). L'ancêtre hypothétique des cnidaires et des bilatériens aurait quant à lui possédé un complexe composé d'au moins deux gènes Hox antérieurs (*Anthox6* et *Anthox7-8*), un gène Hox central/postérieur (*Anthox1/1a*), un gène à homéobox (*Eve*) et potentiellement un gène similaire à *Anthox9* (DuBuc et al. 2018 et DuBuc et al. 2012).

1.2 Fonction des gènes Hox le long de l'axe antéro-postérieur des animaux à symétrie bilatérale

Quelle que soit l'espèce considérée, les gènes Hox ont pour rôle de conférer une identité spécifique aux cellules au cours du développement embryonnaire. Cette information est primordiale pour la différenciation coordonnée des futures structures adultes le long de l'axe antéro-postérieur (AP) des animaux à symétrie bilatérale, que ce soit chez les insectes (Lewis 1978 et Sánchez-Herrero et al. 1985), les mammifères (Krumlauf 1994), les nématodes (Costa et al. 1988), ou encore les crustacés (Deutsch et Mouchel-Vielh 2003). Ils sélectionnent l'identité des cellules dans lesquels ils sont actifs en contrôlant l'expression de nombreux gènes cibles en aval, ce sont donc des gènes dits "sélecteurs". Le nom des gènes Hox dérive du nom du motif utilisé pour lier l'ADN, la boîte homéotique, ou homéobox. Le terme « homeo » dérive lui-même des effets spectaculaires provoqués par certaines mutations affectant des gènes Hox, les homéoses, qui correspondent aux fameuses transformations homéotiques où une partie du corps est remplacée par une autre. Un des exemples les plus classiques d'homéose est le phénotype *Antennapedia* chez la mouche du vinaigre *Drosophila melanogaster* (Schneuwly, Klemenz, et Gehring 1987), consistant en la transformation des antennes en pattes lorsque le gène Hox *Antennapedia* (*Antp*) est activé de manière ectopique dans les primordia d'antennes au cours du développement (**Figure 2**). Une homéose peut aussi avoir pour cause la perte de fonction d'un gène Hox. C'est notamment le cas lorsque la perte de fonction du gène *Ultrabithorax* (*Ubx*) au cours du développement du troisième segment thoracique (T3, ou métathorax) de la mouche drosophile. Cela transforme ce segment en second segment thoracique (T2, ou mésothorax), portant une paire d'ailes. Il s'agit du fameux phénotype bithorax découvert par Calvin Bridges en 1915 : la mouche possède alors deux segments T2, avec deux paires d'ailes au lieu d'une seule (Duncan et Montgomery 2002) (Morata et Garcia-Bellido 1976) (Maeda et Karch 2010).

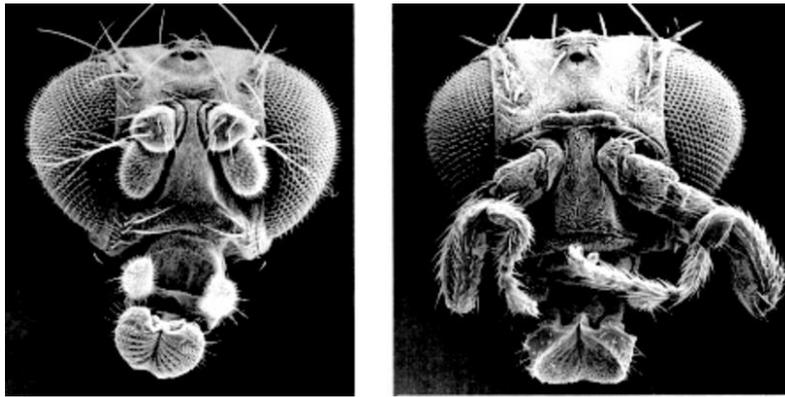


Figure 2 : Le phénotype Antennapedia chez la drosophile, un exemple classique d'homéose. À gauche, un cliché de la tête d'une drosophile sauvage. À droite, un cliché de la tête d'une drosophile présentant un phénotype *Antennapedia*, dont les antennes sont transformées en pattes. (Images par FR Turner, Université de l'Indiana).

Le nombre de gènes Hox est très variable selon les espèces. La mouche drosophile possède 8 gènes Hox, tandis que les mammifères en possèdent 39, réparti en 4 complexes situés sur différents chromosomes. Ces 4 complexes sont issus d'évènements de duplication d'un unique complexe Hox ancestral au cours de l'évolution (Carroll 1995) (**Figure 3**). Le nombre de segments varie énormément selon les espèces, et la combinaison des différents gènes Hox exprimés dans chaque segment permet la mise en place de plans corporels très divers. Le schéma corporel de la mouche drosophile et de la souris sont ainsi très différents et ne comportent pas le même nombre de segments. Cependant, les arthropodes (comme les insectes, les crustacés et les onychophores) partagent une panoplie très similaire de huit gènes Hox et présentent tout de même des schémas corporels extrêmement diversifiés, avec des nombres variables de segments, portant des structures aux morphologies très diverses. Cela suggère que le nombre et le type de gènes Hox (antérieurs, centraux, postérieurs) présent chez une espèce n'est pas corrélé avec la diversité des segments observés dans leurs corps (Averof 1997).

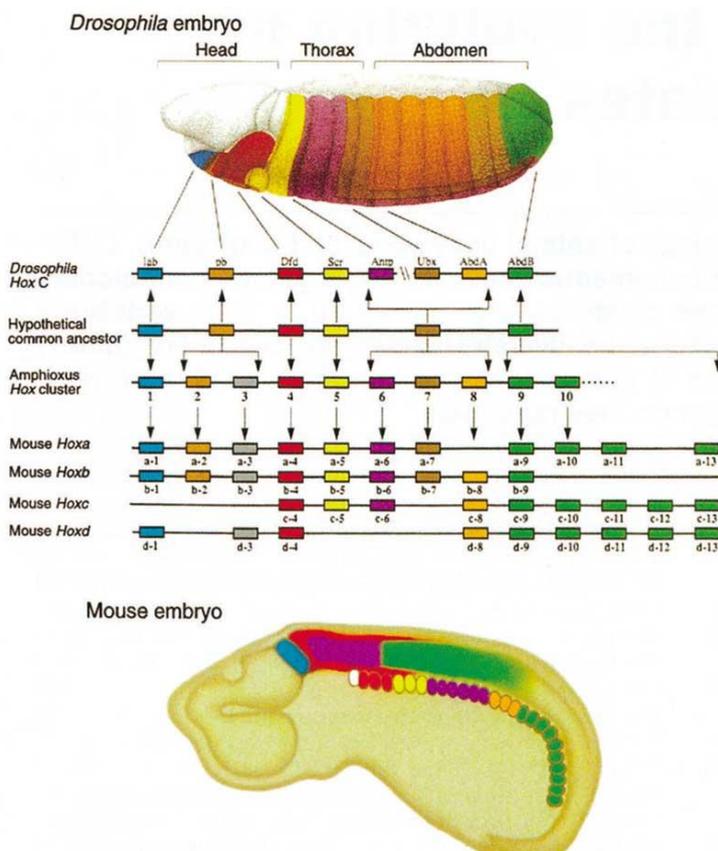


Figure 3 : Conservation de l'organisation des complexes de gènes Hox et de leur expression chez différents organismes. Au sein de l'embryon de drosophile (en haut) ou de l'embryon de souris (en bas), les gènes Hox s'expriment le long de l'axe antéro-postérieur de façon colinéaire à leur position respective au sein du complexe génomique. La partie centrale illustre les relations évolutives entre les complexes de gènes Hox des drosophiles, des amphioxus et des souris, ainsi que l'organisation hypothétique du complexe homéotique de l'ancêtre commun de ces différents organismes. Tandis que la drosophile ne possède qu'un complexe de gènes Hox, deux évènements de duplication chromosomiques ont doté les vertébrés de quatre complexes. (Carroll 1995)

Au sein d'un tagme comme le thorax ou l'abdomen, les segments ne présentent pas tous les mêmes morphologies. Chez la souris, le tronc est composé de trois types de vertèbres : les vertèbres cervicales, thoraciques, et lombaires. L'identité de chacun de ces types de vertèbres est spécifiée par une combinaison précise de gènes Hox. Les mutations affectant l'expression des gènes Hox peuvent ainsi modifier l'identité des vertèbres, l'activation ectopique de *HoxC6* transformant par exemple une vertèbre cervicale en vertèbre thoracique pourvue de côtes (Vinagre et al. 2010). Les serpents possèdent des complexes Hox similaires à ceux des souris (Liang et al. 2011 et Feiner et Wood 2019), cependant leurs schémas corporels sont drastiquement différents de celui des souris, leur tronc ne présentant que des vertèbres thoraciques. Cela est possible par le développement d'une longue série de segments identiques, exprimant tous la même combinaison de gènes Hox (Cohn et Tickle 1999). Le même mécanisme est également observable au niveau de segments homologues en série répétés chez les onychophores (Janssen et al. 2014), ou encore chez les arthropodes, comme les myriapodes (Hughes et Kaufman 2002) ou les crustacés tels que la crevette *Parhyale hawaiensis* chez qui des séries de segments successifs portant les mêmes types d'appendices (pattes de marche, pléopodes, uropodes...) sont spécifiés respectivement par des combinaisons de gènes Hox précises (Serano et al. 2016) (**Figure 4**). Des études récentes montrent également l'implication des gènes Hox dans la diversification du schéma corporel des mollusques en contrôlant le développement de leurs structures dorsales (comme la coquille) et ventrales (comme le système nerveux et le pied), mais aussi dans des processus nouveaux et spécifiques à différents lignages sans lien avec la colinéarité d'expression le long d'un axe, comme le développement des trochophores ou du manteau chez les scaphopodes comme *Antalis entalis* (Wollesen et al. 2018). Cela suggère que la co-option des gènes Hox au cours de l'évolution, à partir d'un ancêtre chez qui ils étaient exprimés de manière colinéaire, a probablement été un moteur de la radiation évolutive des mollusques, favorisant l'émergence de schémas corporels extrêmement divers (Huan et al. 2020).

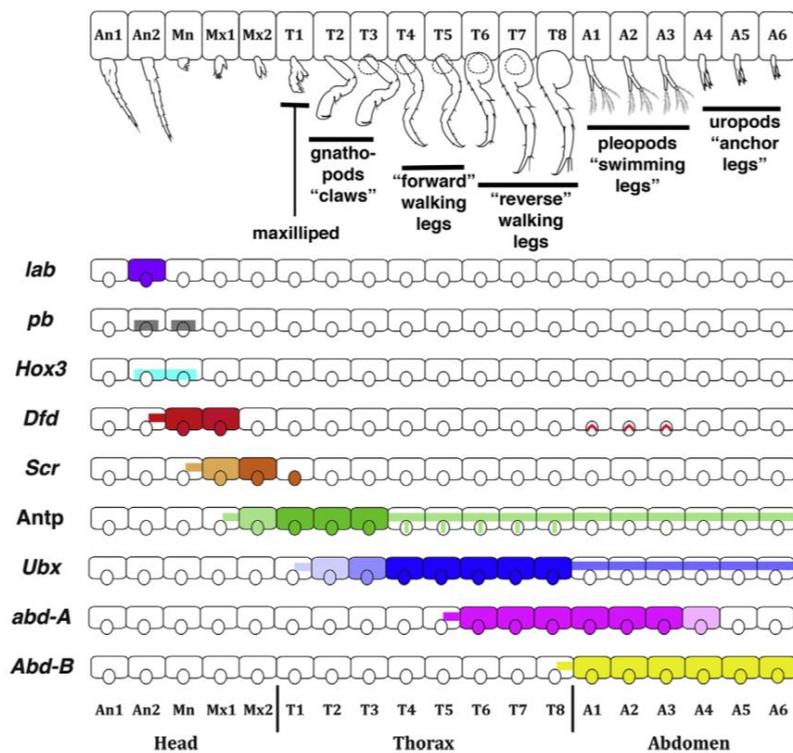


Figure 4 : Schéma corporel et domaines d'expression des gènes Hox chez *Parhyale hawaiensis*. Le schéma corporel de *P. hawaiensis* est illustré en haut, par l'illustration de la morphologie des différents membres retrouvés sur chaque segment. Les segments sont annotés (An1-2 : Antenne ; Mn : Mandibulaire ; Mx1-2 : Maxillaire ; T1-8 : Thoraciques ; A1-6 : Abdominaux). En dessous est représentés les domaines d'expression des différents gènes Hox. On constate qu'à chaque morphologie différente des membres correspond une combinaison spécifique de gènes Hox (adapté à partir de Serano et al. 2016).

Il est intéressant de noter que quels que soient les schémas corporels des animaux considérés, ils possèdent les mêmes catégories de gènes Hox, à savoir antérieurs, centraux et postérieurs. Plutôt que spécifier des structures particulières, les gènes Hox signaleraient des positions relatives le long de l'axe AP (Carroll 1995). Les orthologues d'un même gène Hox pourraient réguler le développement d'un segment spécifique de manières différentes selon les espèces. Le gène Hox *Ubx* illustre bien ce concept car il est décrit pour spécifier l'identité du métathorax de nombreux insectes. Chez la mouche drosophile, il réprime le développement des ailes et spécifie le développement de l'haltère, un organe balancier utilisé par les diptères pour se stabiliser pendant le vol (Weatherbee et al. 1998). En revanche chez le papillon *Precis coenia*, *Ubx* régule la morphologie et la pigmentation des ailes (Warren et al. 1994 ; Weatherbee et al. 1999), tandis que chez le coléoptère *Tribolium castaneum*, *Ubx* promeut le développement des ailes et réprime celui des élytres (Tomoyasu, Wheeler, et Denell 2005). Au sein d'un même animal en revanche, différents gènes Hox ou combinaisons de gènes Hox contrôlent la morphologie de différents segments. Chez la mouche drosophile, *Sex Combs Reduced* (*Scr*), *Antennapedia* (*Antp*) et *Ubx* spécifient respectivement les segments prothoraciques, mésothoraciques et métathoraciques (Struhl 1982).

1.3 Complexes génomiques et colinéarité

Bien que les gènes Hox soient très conservés chez les animaux, on observe une diversité quant à leur organisation génomique. L'observation du fait que les mouches et les souris présentent des complexes de gènes Hox conservés évolutivement et fonctionnellement (Duboule et Dollé 1989 ; Graham, Papalopulu, et Krumlauf 1989) a induit la supposition que les autres espèces présenteraient également une telle organisation des gènes Hox en complexes. L'étude génomique d'autres organismes a montré qu'il n'y avait pas systématiquement une organisation en complexe, bien au contraire. Chez les cnidaires, les gènes Hox sont souvent isolés, bien qu'ils se retrouvent parfois par paires (Chourrout et al. 2006 ; Kamm et Schierwater 2006). Chez la mouche drosophile, les gènes Hox sont répartis dans deux complexes, le complexe Antennapedia (ANT-C) portant les gènes Hox antérieurs et centraux, et le complexe Bithorax (BX-C) portant les gènes Hox postérieurs. Le point de rupture chromosomique entre ces deux complexes sépare les gènes Hox thoraciques et les gènes Hox abdominaux, entre les gènes *Antp* et *Ubx*. Une séparation similaire des complexes Hox est retrouvée par exemple chez les lépidoptères comme le papillon *Bombyx mori*, avec un point de rupture bien plus antérieur cependant, entre les gènes *labial* et *proboscipedia*, isolant le gène *labial* des autres gènes Hox (Yasukochi et al. 2004 ; Chai et al. 2008). Chez le coléoptère *Tribolium castaneum* en revanche, on trouve un vaste et unique complexe désorganisé (Beeman 1987 ; Denell, Brown, et Beeman 1996 ; Brown et al. 2002). L'oursin *Strongylocentrotus purpuratus* présente également un vaste complexe désorganisé, contenant des gènes Hox parfois orientés dans des sens opposés, et positionnés de manière incohérente au regard de leurs groupes paralogues, ce qui suggère d'importants réarrangements chromosomiques au cours de l'évolution (Cameron et al. 2006). On observe également des complexes Hox atomisés chez les tuniciers, comme chez *Oikopleura dioica* ou encore *Ciona intestinalis*, chez qui l'on observe également la perte de gènes Hox centraux (Seo et al. 2004 ; Ikuta et Saiga 2005). Chez les mollusques, on trouve des complexes bien organisés comme chez *Lottia gigantea*, mais aussi des complexes Hox complètement atomisés comme chez *Octopus bimaculoides* (Albertin et al. 2015). Ce sont les vertébrés qui présentent les clusters de gènes Hox les mieux organisés. Les complexes Hox des vertébrés ne contiennent que des gènes Hox présentant tous la même orientation transcriptionnelle et des introns très courts, ainsi que des régions non-codantes conservées contenant peu ou aucunes séquences répétitives (Duboule 2007) (**Figure 5**).

Les complexes Hox des vertébrés présentent donc une architecture génétique compacte et organisée. Ce degré d'organisation plus stricte que celui retrouvé chez les autres bilatériens est d'autant plus contre-intuitif que, chez les vertébrés, deux événements de duplication génomique ont abouti à la présence de 4 complexes Hox, ce qui aurait pu avoir pour conséquence de relâcher la contrainte de l'organisation de ces complexes. Or le niveau d'organisation et de compaction des complexes Hox semble avoir au contraire augmenté avec le nombre de complexes, ce qui suggère que ces deux caractéristiques aient pu co-évoluer (Darbellay et al. 2019). Une explication possible se trouve dans la néo-fonctionnalisation

d'éléments régulateurs à proximité des complexes Hox, favorisée par leur duplication qui auraient pu permettre l'émergence de régulations par de multiples enhancers hors des complexes.

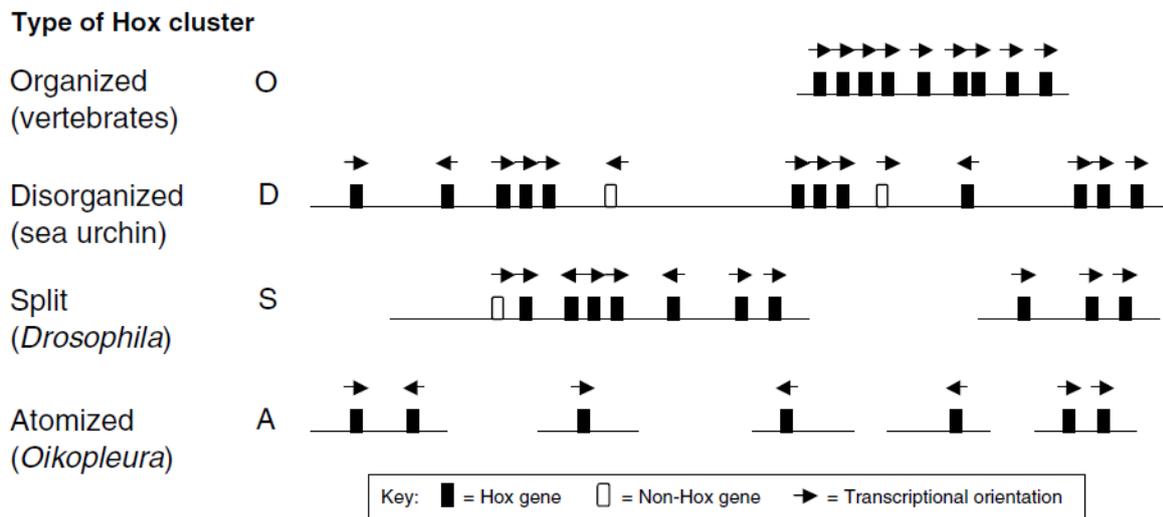


Figure 5 : Classification structurale des complexes de gènes Hox. Les complexes de type O (organisés) retrouvés chez les vertébrés contiennent des gènes Hox étroitement arrangés, tous codés par le même brin d'ADN, et sont dépourvu de gènes étrangers ou de séquences répétées. Ils peuvent cependant contenir des ARN et microARN non-codants. Les complexes de type D (désorganisés), comme ceux observés chez les oursins ou les amphioxus, sont bien plus vastes et peuvent contenir un mélange de gènes Hox (en noir) parfois orientés de manière opposée, de gènes non-Hox (en blanc) et de séquences répétées. Les complexes de type S (« splitted », ou scindés), comme ceux trouvés chez les diptères, peuvent présenter des caractéristiques de complexes O ou D au niveau des différents sous-complexes. L'organisation dite « atomisée » (A) représente l'absence d'organisation en complexe, lorsque les gènes Hox sont retrouvés éparpillés à travers le génome, et se retrouvent au mieux par paires, comme chez les *Oikopleura* ou encore les *Octopus*. (Duboule 2007)

En effet, chez les vertébrés les gènes Hox ne sont pas seulement impliqués dans la mise en place de l'axe AP, mais aussi de l'axe proximo-distal (PD) au niveau des membres (Zakany et Duboule 2007 ; Durston 2020). Pour acquérir ces nouvelles fonctions, les complexes Hox ont pu accumuler progressivement des régulations à longue distance par des enhancers de leurs différents environnements génomiques, contraignant donc les complexes à rester organisés. Au cours du développement des doigts et du système nerveux central (CNS) chez la souris, l'expression des gènes postérieurs du complexe *HoxD* (*HoxD10* à *HoxD13*) est coordonnée par des enhancers localisés au sein d'une Région de Contrôle Globale (GCR) localisée à 200 Kb du complexe. Ce type de régulation à partir d'éléments localisés à distance du complexe permet d'accommoder une nouvelle fonction de ces gènes (le développement des parties distales des doigts) avec la conservation du rôle initial des gènes Hox dans le développement de l'axe antéro-postérieur. L'orthologue de ce GCR chez le tétrodon reproduit bien la régulation des gènes *HoxD10* à *HoxD13* dans le CNS, mais pas dans la partie distale des membres, ce qui

suggère que ce GCR aurait déjà été présent avant l'émergence des doigts. De plus, on trouve un GCR contrôlant les gènes du cluster *HoxA* de manière similaire dans le CNS, mais pas dans les doigts. Cela suggère que les complexes *HoxA* et *HoxD* (ainsi que les GCRs contrôlant leur expression dans le CNS) sont issus du même événement de duplication (Lehoczky, Williams, et Innis 2004). Cependant seul le GCR contrôlant *HoxD* possède une fonction dans les zones distales des pattes, ce qui suggère sa co-option dans le développement des membres après duplication, indépendamment ou enclenchée par la présence du GCR ancestral. Dans ce dernier cas, les propriétés intrinsèques du GCR, telles que l'accessibilité par les FT ou l'interaction avec diverses voies de signalisation au niveau d'enhancers déjà fonctionnels, pourraient faciliter une évolution de la régulation après un événement de duplication. Ce processus facilitant la co-option d'éléments régulateurs est appelé « amorçage régulateur » (« regulatory priming »), et chaque évolution des séquences régulatrices va alors resserrer la contrainte sur l'architecture des complexes homéotiques (Gonzalez, Duboule, et Spitz 2007) (Figure 6).

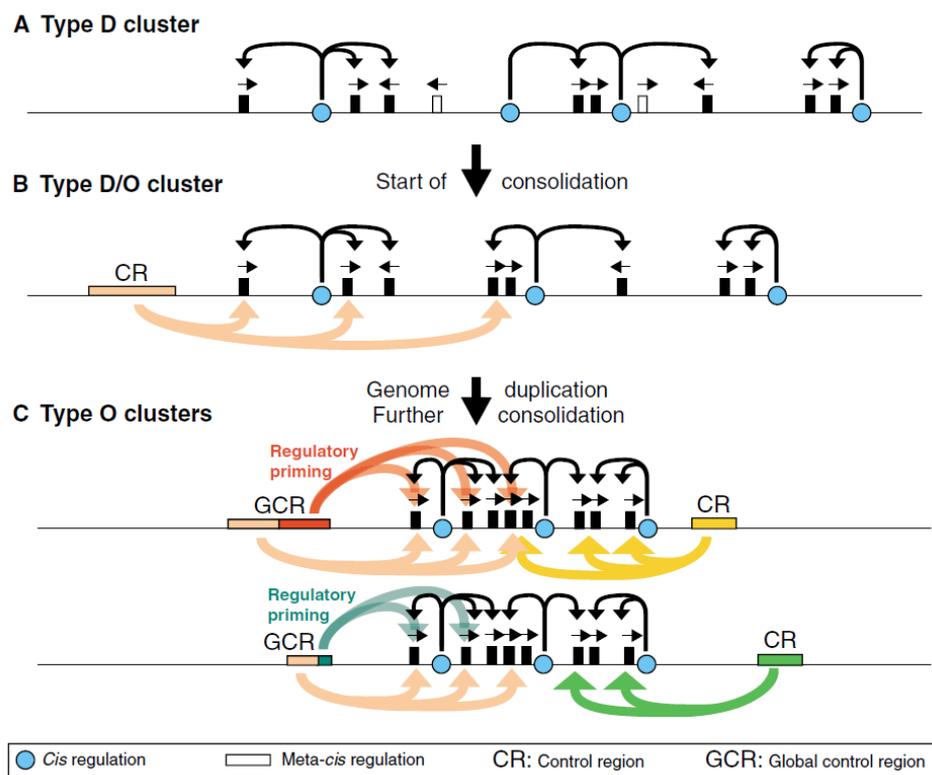


Figure 6 : L'accumulation de cis-régulation comme mécanisme à l'origine de la contrainte organisationnelle des complexes de gènes Hox chez les vertébrés. A : Représentation schématique d'un complexe de gènes Hox de type D présent chez un ancêtre des bilatériens. Les gènes Hox (en noir) sont orientés différemment les uns des autres et dispersés sur une vaste région génomique incluant également des gènes non-Hox (en blanc). Les gènes sont cependant maintenus relativement proches par la présence de séquences cis-régulatrices (en bleu) partagées par plusieurs gènes. **B :** Représentation schématique du complexe de gènes Hox de type D/O d'un ancêtre hypothétique des chordés. L'émergence d'une séquence méta-cis régulatrice au sein d'une région de contrôle (CR, en brun), contrôlant l'expression de nombreux gènes Hox, fait tendre l'évolution du complexe de gènes vers d'avantage d'organisation par sélection positive. Les gènes non-Hox sont progressivement perdus ainsi que les grandes régions intergéniques, ce qui optimise le méta-cis contrôle des gènes Hox. **C :** Après un événement de duplication génomique, la consolidation de

l'organisation génomique est favorisée par la possibilité de recruter de nouvelles séquences méta-cis-régulatrices (boîtes et flèches rouges, jaunes ou vertes), en particulier à travers la capacité d'une région de contrôle pré-existante (CR en **B**) de générer des innovations régulatrices par « amorçage régulateur » (rouge et vert foncé). Cela aboutit à la concentration d'enhancers à longue distance formant des régions de contrôle global (GCR) pouvant continuer à recruter de nouveaux éléments régulateurs, et à produire des innovations régulatrices. Dans ce contexte, la duplication des complexes de gènes Hox renforce leur contrainte organisationnelle. (Duboule 2007)

Le mécanisme moléculaires contraignant les complexes homéotiques, par lequel les GCR contrôlent l'activité des gènes Hox, s'expliquent en s'intéressant à la topologie des chromosomes dans le noyau des cellules, à l'aide de techniques de capture de la conformation des chromosomes telles que le Hi-C (Dixon et al. 2012). De telles techniques mettent en évidence l'existence de domaines chromosomiques restreints au sein desquels des gènes et des séquences régulatrices pourront entrer en contact de manière privilégiée. Ces domaines génomiques sont délimités par des éléments insulateurs liés par des protéines telles que CTCF, créant des boucles de chromatine favorisant les contacts entre les gènes et leurs séquences régulatrices (Ong et Corces 2014). Ces domaines sont appelés « Topologically Associated Domains » (TADs). On observe par exemple de telles structures au niveau des complexes *HoxA* et *HoxD* lors du développement des doigts et des appareils reproducteurs, isolant les complexes Hox sous le contrôle d'enhancers pléiotropes utilisables par des facteurs tissu-spécifiques afin de réguler des gènes Hox dans différents contextes développementaux (Lonfat et al. 2014). La présence de TADs au niveau des complexes Hox est essentielle pour leur fonction, car les TADs sont impliqués dans l'expression colinéaire des gènes Hox.

En effet, lors du développement des membres chez la souris, une frontière entre deux TADs se situe au sein du complexe *HoxD*, isolant le gène *HoxD13* avec des séquences régulatrices localisées proches du centromère (C-DOM) des autres gènes Hox plus antérieurs isolés avec des séquences régulatrices « antérieures » localisées vers le télomère (T-DOM). Chacun de ces TADs contient des séquences régulatrices, ce qui permet l'expression échelonnée des gènes Hox antérieurs de façon colinéaire, la frontière de ces TADs étant très dynamique en fonction du contexte développemental du fait de la présence de nombreux insulateurs alternatifs permettant de mettre en contact différents gènes Hox avec des enhancers à longue distance (Rodríguez-Carballo et al. 2017 ; Amândio et al. 2020). La frontière isolant les gènes Hox postérieurs des gènes Hox plus antérieurs permet aussi d'éviter efficacement et de manière robuste que ces gènes ne se retrouvent au contact de séquences régulatrices du T-DOM régulant normalement les gènes Hox antérieurs (**Figure 7**), ce qui signifierait la terminaison précoce du développement des membres. Les gènes Hox du groupe paralogue 13 ont en effet pour rôle d'instruire les identités les plus distales, et donc terminales, du tronc et des membres (organes génitaux, extrémités/doigts...) (Andrey et al. 2013 ; Beccari et al. 2016). Ainsi, la structure de complexes homéotiques est intrinsèquement liée à la propriété des gènes Hox consistant à s'exprimer de manière séquentielle le long de l'axe AP et de manière tissu-spécifique. Cela explique les fortes contraintes ayant mené à l'architecture extrêmement organisée des complexes homéotiques chez les vertébrés. Ce mécanisme semble largement conservé chez les vertébrés (Woltering et al. 2014) mais également au-delà. Le même type de

mécanisme, basé sur des TADs délimités par des insulateurs liés par des protéines comme CTCF, est également retrouvé chez la drosophile afin de contrôler la régulation de *AbdB* par différents enhancers assurant un niveau d'expression spécifique selon le segment considéré. La mutation d'un élément insulateur provoque une activation ectopique de *AbdB* dans des segments plus antérieurs par des enhancers normalement inaccessibles, rappelant le rôle des TADs dans la délimitation des paralogues *Hox13* chez les vertébrés (Gambetta et Furlong 2018).

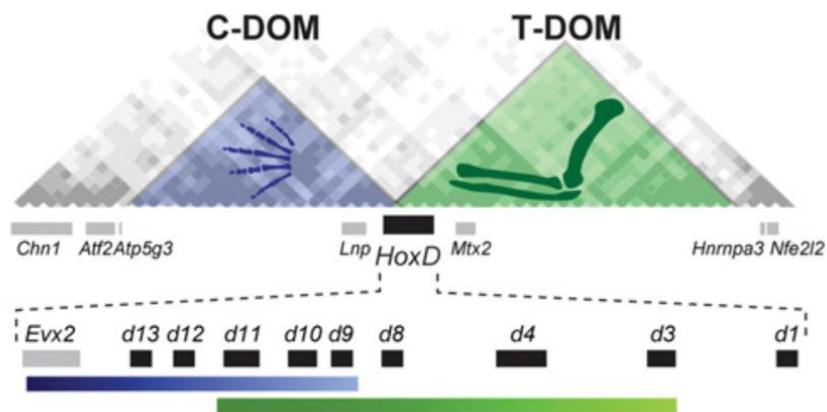


Figure 7 : Les deux TADs flanquant le complexe de *HoxD* permettent la régulation colinéaire des gènes Hox le long de l'axe proximo-distal des membres chez la souris. Des données de Hi-C (Dixon et al. 2012) montrent la position de deux TADs (C-DOM et T-Dom) flanquant le complexe *HoxD*. Les boîtes noires et grises représentent respectivement les gènes Hox et les gènes non-Hox. Les bandes bleue et verte représentent les deux ensembles de gènes Hox exprimés respectivement dans les régions distales et proximales des membres chez la souris. C-DOM et T-DOM sont représentés selon le même code couleur, et contiennent les enhancers permettant respectivement l'expression des gènes Hox dans les régions proximales et distales. La frontière entre ces deux TADs permet de restreindre de manière robuste l'expression des gènes Hox postérieurs aux régions distales, et des gènes Hox antérieurs aux régions proximales. (Beccari et al. 2016).

Le regroupement en complexes des gènes Hox a été suggéré comme étant indispensable à leur fonction le long de l'axe AP (Lewis 1978b). Quand un premier alignement entre les complexes homéotiques de drosophile et de vertébrés a été proposé (Akam 1989), l'observation de la correspondance colinéaire entre l'ordre des gènes et leur domaine d'expression dans l'embryon est devenue évidente. Pendant longtemps, la colinéarité d'expression fût une explication convenable pour l'architecture des complexes Hox. Cependant, certaines études montrèrent ensuite une coordination de l'expression des gènes Hox en l'absence de complexes, (Seo et al. 2004 ; Galliot 2005 ; Wollesen et al. 2018). Cela montre que l'expression différentielle des gènes Hox le long de l'axe AP ne dépend pas forcément d'une organisation génomique en complexes, suggérant l'existence de mécanismes de régulation variés entre espèces possédant différents types d'organisation des complexes Hox (Figure 8) (Duboule 2007).

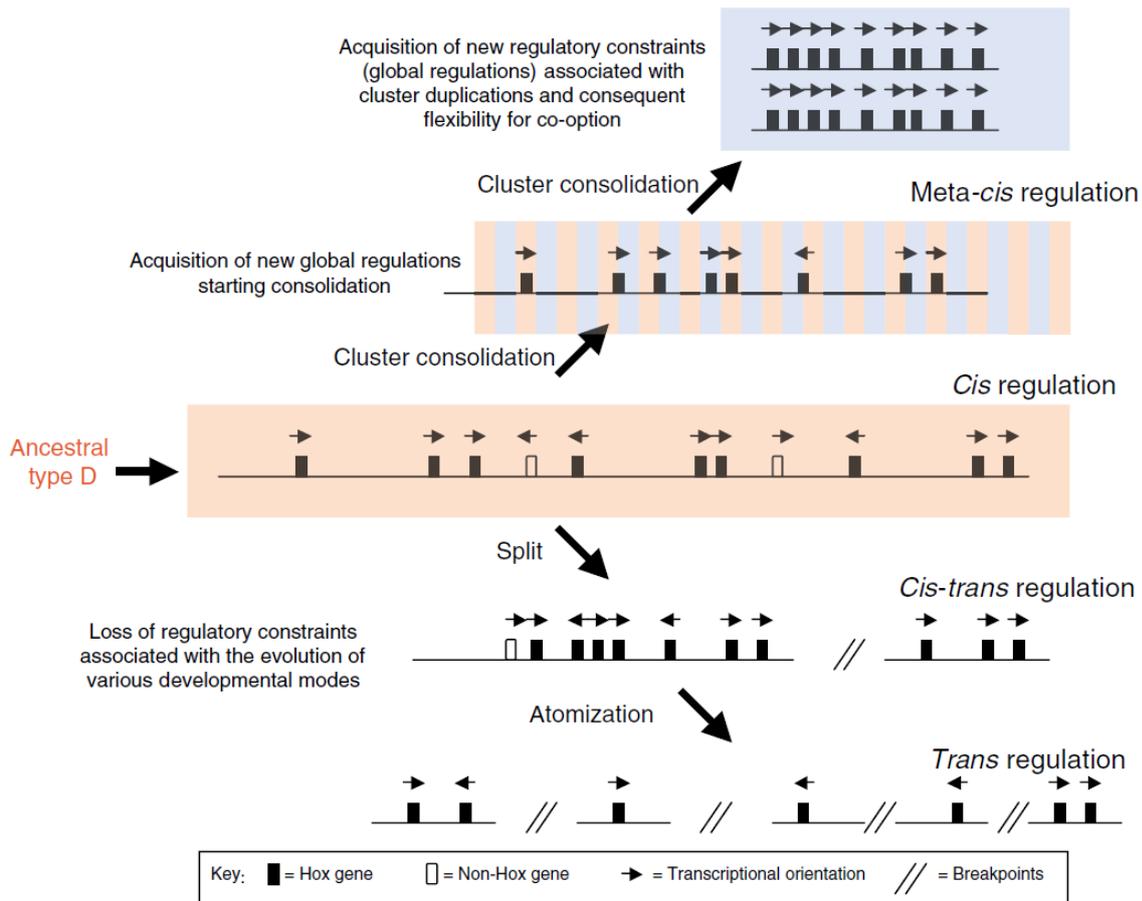


Figure 8 : L'évolution des types de complexes Hox repose sur divers mécanismes de régulation des gènes Hox. À partir d'un complexe de type D, l'évolution vers un complexe de type O repose sur le recrutement de davantage de séquences cis-régulatrices, formant progressivement des séquences méta-cis-régulatrices (voir figure 5). La transition d'un complexe D vers un complexe de type S, puis de type A se produit probablement simultanément à la perte des contraintes retenant les gènes ensemble, et au gain de régulations en trans (Duboule 2007).

1.4 Modification du profil d'expression des gènes Hox et changements morphologiques au cours de l'évolution.

Comment les morphologies peuvent-elles évoluer le long d'un axe antéro-postérieur tout en maintenant une conservation importante des gènes Hox ? Plusieurs mécanismes ont été décrits et illustrent comment des modulations subtiles en amont et en aval des gènes Hox permettent d'aboutir à des évolutions morphologiques.

1.4.1 Modification des éléments cis-régulateurs des gènes cibles.

L'étude des programmes génétiques spécifiant le développement des appendices des arthropodes a permis de décrypter efficacement les mécanismes d'action des protéines Hox au niveau des éléments cis-régulateurs de leurs gènes cibles. Le schéma corporel au sein des insectes est globalement conservé, composé de trois tagmes : la tête, le thorax composé de

trois segments portant généralement les appendices locomoteurs (prothorax, mésothorax et métathorax), et l'abdomen généralement composé de 11 à 12 segments. En revanche, on observe entre les espèces une grande diversité d'appendices pouvant se développer sur des segments homologues. En effet, au niveau du métathorax les diptères comme la drosophile possèdent une paire d'haltères, tandis que les coléoptères, les lépidoptères, ou encore les hyménoptères comme les abeilles, possèdent une paire d'ailes. Dans tous ces cas cependant, le profil d'expression des gènes Hox reste inchangé : c'est le gène Hox *Ubx* qui est exprimé dans les primordia du segment T3 et responsable du développement du métathorax (**Figure 9**). Les différences observées au niveau des appendices de vol se développant au niveau du métathorax des diptères (mouches, moustiques, taons...), des hyménoptères (abeilles, fourmis...), des coléoptères comme *Tribolium castaneum* (Tomoyasu et al. 2005), ou les lépidoptères comme *Precis coenia* (Weatherbee et al. 1999) sont dues à la manière dont *Ubx* sélectionne et régule ses gènes cibles dans les primordia des appendices de vol. Les orthologues de *Ubx* provenant de *Apis mellifera*, du papillon *Bombyx mori*, et de *Tribolium castaneum* sont tous impliqués dans le développement des ailes au sein de leurs espèces respectives. Cependant ils sont capables de sauver la perte de fonction de *Ubx* chez la drosophile en supprimant le développement des ailes et en promouvant le développement de l'haltère. Cela suggère que la différence de fonction de *Ubx* entre ces différentes espèces ne se situe pas au niveau de la protéine *Ubx*, mais provient de la manière dont cette protéine va pouvoir réguler ses gènes cibles dans les différents contextes développementaux où elle se trouve. Cela est dû à des différences dans les séquences cis-régulatrices des gènes cibles de *Ubx* selon les espèces. Chez la drosophile, l'enhancer du gène *vestigial (vg)*, essentiel au développement des ailes, permet la répression de *vg* par *Ubx*. En revanche, l'enhancer de *vg* retrouvé chez *Apis mellifera* est résistant à la répression par *Ubx*. Contrairement à son orthologue chez l'abeille, la séquence cis-régulatrice de *vg* a dû évoluer chez la drosophile en rendant possible la répression par *Ubx*. Ce type de modification de séquences cis-régulatrices permet donc la diversification morphologique malgré la conservation fonctionnelle des protéines Hox (Prasad et al. 2016).

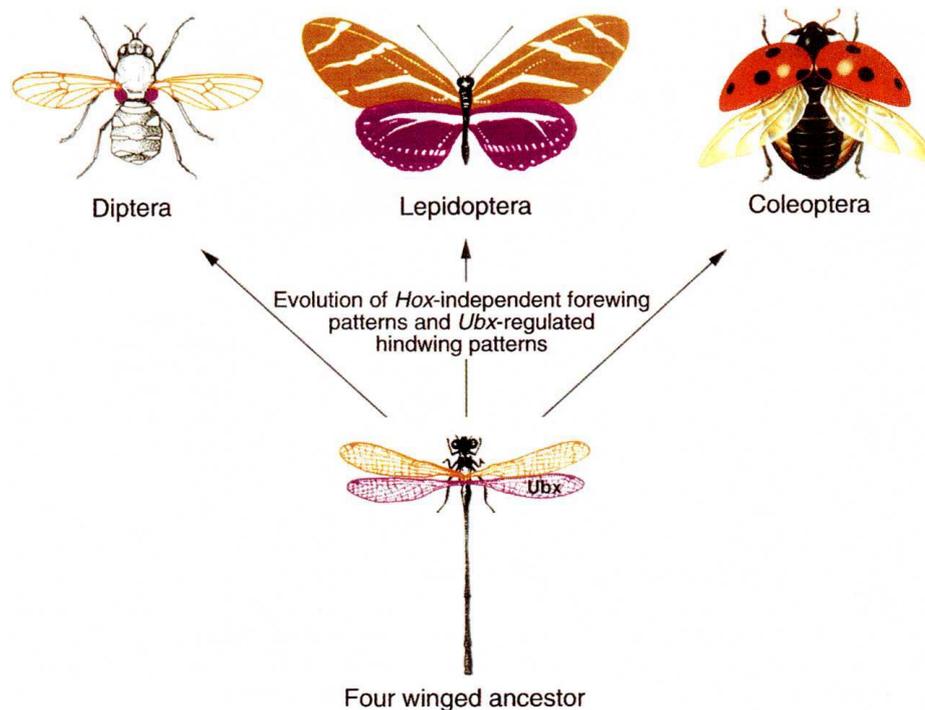


Figure 9 : Gènes Hox et diversification morphologique de structures homologues. *Ubx* régule le développement des appendices de vol postérieurs chez les insectes. Tandis que *Ubx* contrôle le développement d'ailes extrêmement modifiées formant un organe équilibrateur (l'haltère) chez les diptères, il régule la morphologie et la pigmentation des ailes postérieures chez les lépidoptères, et réprime le développement des élytres, ce qui permet le développement d'une paire d'ailes chez les coléoptères. Ces trois ordres dérivent d'un ancêtre commun possédant deux paires d'ailes. Ces différences découlent probablement de changements au niveau des cibles en aval, étant passé sous le contrôle de *Ubx* au cours de l'évolution, ou y ayant échappé (Carroll 1995).

Le schéma corporel des insectes diffère de celui de nombreux autres arthropodes par l'absence de pattes au niveau de l'abdomen. Chez la drosophile, les gènes *Hox Ubx* et *AbdA* répriment le gène *Distal-less (Dll)* nécessaire au développement des pattes (Vachon et al. 1992 ; Gebelein et al. 2002). C'est aussi le cas des orthologues de *Ubx* et *Antp* chez les araignées (Khadjeh et al. 2012). Chez les insectes comme les araignées, présentant des paires de pattes seulement au niveau du thorax, la répression de *Dll* est nécessaire dans les segments abdominaux. En revanche, les orthologues de *Ubx* et *AbdA* ne répriment pas *Dll* chez le centipède, ce qui permet alors le développement de paires de pattes au niveau de tous les segments abdominaux des centipèdes, et aboutit au schéma corporel si particulier de ces animaux (Grenier et al. 1997). Cela illustre bien que l'évolution de la régulation des gènes cibles de protéines Hox est un mécanisme permettant des innovations morphologiques (Figure 10).

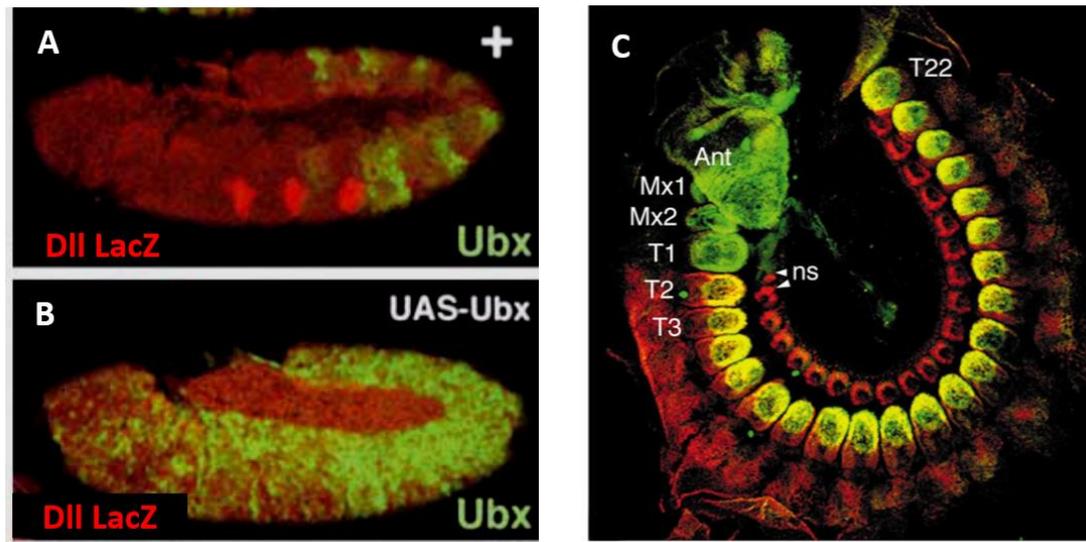


Figure 10 : Ubx réprime *Dll* chez la drosophile mais pas chez le centipède. A : Embryon de drosophile montrant le profil d'expression de *Dll* à l'aide d'un rapporteur LacZ (en rouge) ainsi qu'un marquage de Ubx. On observe que les points d'expression de *Dll*, déterminant les territoires présomptifs des primordia de pattes, ne sont pas colocalisés avec Ubx. B : L'expression ectopique de *Ubx* à l'aide du système UAS-Gal4 provoque la répression de *Dll* dans l'embryon de drosophile (adapté de Gebelein et al. 2002). C : Immunomarquage de Ubx (rouge) et *Dll* (vert) d'un embryon de centipède. Les différents segments sont annotés (Ant : antenne ; Mx1-2 : Maxillaires ; T1-22 : Thoraciques). *Dll* est exprimé au sein de tous ces segments, indépendamment de la présence de Ubx (à partir de Grenier et al. 1997).

1.4.2 Modifications du profil d'expression de gènes Hox au sein d'un segment.

Chez les insectes, une paire de pattes se développe au niveau de chacun des trois segments thoraciques. Chez la mouche drosophile, le gène *Distal-less* (*Dll*) s'exprime au niveau des primordia de pattes, et est essentiel pour la mise en place de l'axe proximo-distal (PD) de ces appendices. Ce gène est réprimé au niveau des segments abdominaux par les protéines Hox Ubx, Abdominal A (AbdA) et Abdominal-B afin d'empêcher le développement de pattes au niveau de l'abdomen (Sambrani et al. 2013). Chez les larves des lépidoptères en revanche, on observe le développement de pattes rudimentaires munies de crochets, au niveau de l'abdomen. Lors de la gastrulation tardive, on observe l'expression de l'homologue de *Dll* au niveau des troisième à sixième segments abdominaux (A3 – A6) chez le papillon *Precis coenia*. Cela suggère que *Dll* est régulé de manière différente chez les lépidoptères et les diptères. Pourtant, chez *Drosophila melanogaster* et *Precis coenia*, les gènes Hox Ubx et AbdA présentent initialement le même profil d'expression. Cependant, chez *Precis coenia* ces deux gènes Hox se retrouvent réprimés dans les segments A3 à A6 au niveau de territoires précis, ce qui permet l'activation de *Dll* en des points précis de ces segments, et donc d'induire le développement de pattes rudimentaires (**Figure 11**). Ici, la divergence morphologique entre deux espèces provient du fait que des gènes Hox sont fonctionnellement comparables

(capables de réprimer *Dll* dans les deux cas) mais ne suivent pas le même profil d'expression au sein de segments orthologues. Cette différence d'expression explique donc le fait que le développement des pattes rudimentaires ne soit pas réprimé au niveau de l'abdomen de *Precis coenia*.

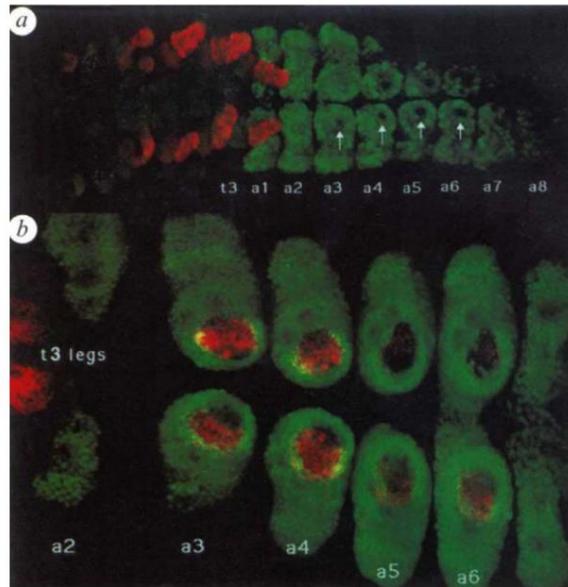


Figure 11 : La répression des gènes BX-C précède l'activation de *Dll* dans les segments abdominaux chez *Precis coenia*. **A :** Embryon de *P. coenia* à 20-25% de l'embryogenèse. *Dll* (en rouge) est produit au niveau des primordia de membres dans les segments thoraciques mais n'est pas encore activé dans les segments abdominaux au niveau des points où *Ubx/AbdA* (en vert) ont disparu (flèches). **B :** Embryon de *P. coenia* à 40% de l'embryogenèse. On observe l'activation de *Dll* au niveau des segments abdominaux au niveau des points où *Ubx/AbdA* ont disparu. (Warren et al. 1994)

1.4.3 Modifications du profil d'expression des gènes Hox entre différents segments du corps.

Les différences de profils d'expression des gènes Hox entre des espèces de vertébrés sont responsables de certaines divergences morphologiques. La régulation du gène *Hoxc8* entre le poulet, la souris, et le serpent illustre bien ce concept. Chez ces animaux *Hoxc8* est exprimé dans la région thoracique. Chez le poulet *Gallus gallus domesticus*, et la souris *Mus musculus*, ce gène est exprimé au niveau du thorax et spécifie l'identité mi-thoracique et brachiale (Burke et al. 1995). Cependant, l'expression de *Hoxc8* chez le poulet est retardée par rapport à celle observée chez la souris. Cela a pour conséquence de réduire le domaine d'expression de *Hoxc8* au niveau thoracique. Le poulet présente ainsi une région thoracique restreinte avec moins de segments que chez la souris (Belting, Shashikant, et Ruddle 1998). La divergence de schéma corporel est encore plus marquée entre ces deux espèces et les serpents. Chez le poulet, la combinaison des gènes *Hoxc6* et *Hoxc8* spécifie l'identité des vertèbres thoraciques et voient leurs domaines d'expression limités à un domaine précis du tronc, ce qui permet antérieurement le développement de vertèbres cervicales, et postérieurement le développement de vertèbres lombaires. Chez le python *Python molurus* en revanche, le

domaine d'expression de *Hoxc6* et *Hoxc8* s'étend sur la totalité du tronc, ce qui spécifie l'intégralité du tronc pour une identité thoracique, et réprime le développement de membres (Cohn et Tickle 1999) **Figure 12A**.

Ces variations d'expression avec conséquences morphologiques se retrouvent en dehors des vertébrés. On trouve notamment des exemples entre espèces de crustacés. Chez la plupart des crustacés, les appendices thoraciques sont spécialisés dans les fonctions locomotrices. Cependant chez certains crustacés, les appendices thoraciques antérieurs se sont spécialisés dans la manipulation de la nourriture, il s'agit des maxillipèdes. Les maxillipèdes sont devenus morphologiquement plus proches d'appendices nourriciers (maxillae), retrouvés au niveau des segments gnathaux, que des pattes trouvées au niveau thoracique. Chez les crustacés dépourvus de maxillipèdes comme l'artémie *Artemia franciscana*, les gènes *Hox Ubx* et *AbdA* sont exprimés dans la totalité du tronc, correspondant à une région où tous les segments développent des membres morphologiquement très similaires. Chez le mysidé *Mysidium colombiae* en revanche, le premier segment thoracique a acquis une morphologie gnathale, ce qui coïncide avec une répression des gènes *Ubx/AbdA*. Le second segment thoracique en revanche présente une morphologie plus proche des pattes, ce qui s'explique par le fait que *Ubx/AbdA* y sont exprimés au niveau des territoires proximaux présomptifs, mais pas des territoires les plus distaux. Chez les décapodes (présentant généralement trois paires de maxillipèdes suivies de 5 paires de pattes) telles que la crevette *Periclimenes yucatanicus*, cela est corrélé au recul postérieur de la frontière d'expression de *Ubx/AbdA* de 3 segments (Averof et Patel 1997) **Figure 12B**.

Ces exemples chez les vertébrés et les crustacés illustrent bien que la diversification morphologique puisse avoir lieu par une diversification des profils d'expression de gènes Hox orthologues entre différentes espèces.

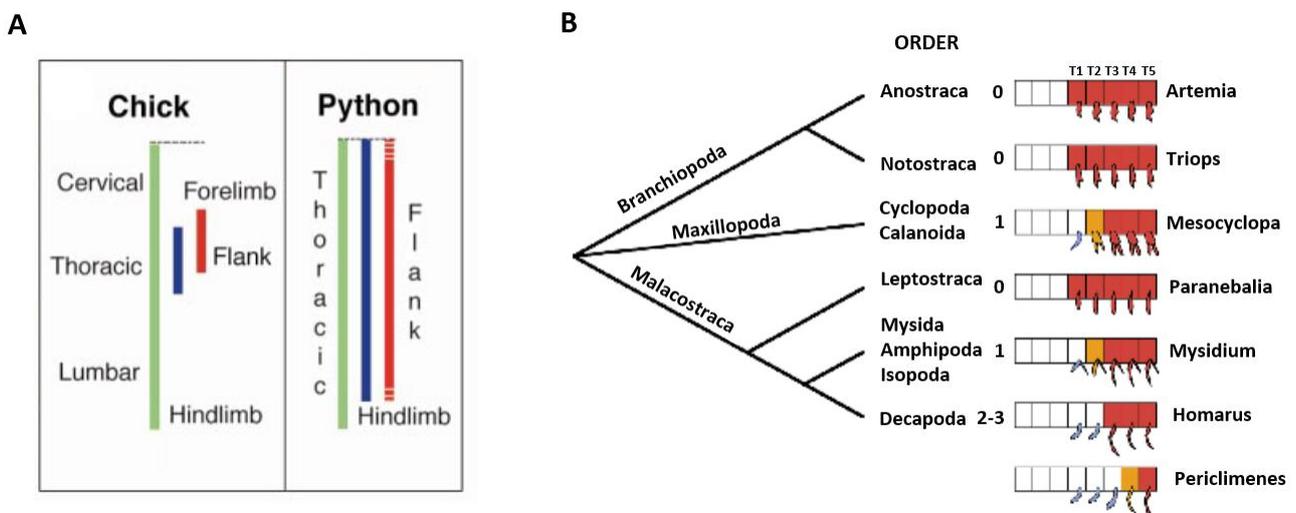


Figure 12 : Diversification morphologique par l'évolution du profil d'expression des gènes Hox entre différents segments. A : Diagramme schématisant les domaines d'expression des gènes *HOXB5* (vert), *HOXC8* (bleu) et *HOXC6* (rouge) dans les embryons de poulet (à gauche) et de python (à droite). L'expansion des domaines

d'expression des gènes *HOXC8* et *HOXC6* chez le python est corrélée à l'extension de l'identité thoracique des vertèbres le long de l'axe de squelette. A partir de Cohn et Tickle, 1999. **B** : Distribution phylogénétique de différents profils de spécialisation segmentaire et d'expression de *Ubx* et *AbdA* chez les crustacés. Les domaines d'expression des gènes Hox *Ubx/abdA* au sein des différents segments des neuf ordres de crustacés considérés est représenté par la coloration rouge (forte expression), orange (faible expression) ou blanche (expression indétectable) basé sur des marquages effectués lors du développement embryonnaire. Chaque schéma corporel représente trois segments gnathaux suivi de cinq segments thoraciques. Le nombre de paires de maxillipèdes présentes est indiqué (0,1,2 ou 3). L'expression des gènes *Ubx/abdA* est toujours corrélée à la morphologie des segments thoraciques : on observe le développement des maxillipèdes (en bleu) seulement au niveau des segments thoraciques où l'expression de *Ubx/abdA* est indétectable. Les relations phylogénétiques entre les trois classes décrites (*Branchiopoda*, *Maxillopoda* et *Malacostraca*) ne sont pas élucidées. A partir de Averof et Patel, 1997.

Enfin, tous ces mécanismes peuvent entrer en jeu ensemble, ce qui rend d'autant plus complexe l'étude des causes moléculaires des changements morphologiques au cours de l'évolution. Un bon exemple de cela est la différence de pigmentation des segments abdominaux chez les mâles de deux espèces de drosophiles : *Drosophila yakuba*, et *Drosophila santomea* (Liu et al. 2019). Les deux derniers segments abdominaux (A5 et A6) des mâles de *D. yakuba* présentent une pigmentation sombre, ce qui est un caractère ancestral (**Figure 13A**). Cette pigmentation a été perdue au cours de l'évolution chez *D. santomea* (**Figure 13B**). La pigmentation de la cuticule abdominale chez les drosophiles est contrôlée par le gène Hox *AbdB*, qui contrôle l'expression de gènes impliqués dans la pigmentation, tels que *yellow*, *ebony* ou encore *tan* (Jeong, Rokas, et Carroll 2006). Chez *D. yakuba*, *AbdB* s'exprime dans la cuticule des mâles adultes au niveau des segments A5 et A6, tandis que cette expression a été perdue chez *D. santomea* (**Figure 13C-D**). Cela corrèle avec l'expression des gènes impliqués dans la pigmentation, comme *yellow*, qui s'exprime au niveau des segments A5 et A6 chez *D. yakuba*, mais pas chez *D. santomea* (**Figure 13E-F**). Cela semble suggérer que la différence de pigmentation entre les deux espèces repose simplement sur la différence du profil d'expression du gène Hox *AbdB*. Cependant, si la perte de *AbdB* induit la perte de pigmentation chez *D. yakuba* (**Figure 13G**), restaurer l'expression de *AbdB* au niveau des segments A5 et A6 de *D. santomea* ne restaure pas la pigmentation (**Figure 13H**). Cela suggère que la différence de pigmentation entre ces deux espèces n'est pas uniquement due à une évolution différente du profil d'expression de *AbdB*, mais aussi à des modifications réparties sur l'ensemble du réseau génétique contrôlant la pigmentation, rendant les gènes tels que *yellow*, *ebony* ou *tan* insensibles à la régulation par *AbdB* chez *D. santomea*, ou sensibles à la répression par d'autres régulateurs comme *pdm3* (Liu et al. 2019) (**Figure 13I**). La disparition de la pigmentation peut donc avoir lieu par la simple perte de sensibilité à la régulation des gènes Hox, via des mutations au niveau de leurs gènes cibles. Cela suggère la possibilité que la perte d'expression de *AbdB* dans les segments abdominaux de *D. santomea* soit successive à la perte de pigmentation, l'expression de *AbdB* n'étant plus nécessaire (Prud'homme et Gompel 2019). Cette idée est en accord avec le modèle suggérant que l'expression des gènes Hox ne dirige pas, mais suit les multiples changements affectant leurs gènes cibles. Cela supporte l'idée de changement graduels et non soudains des morphologies au cours de l'évolution (Budd 1999).

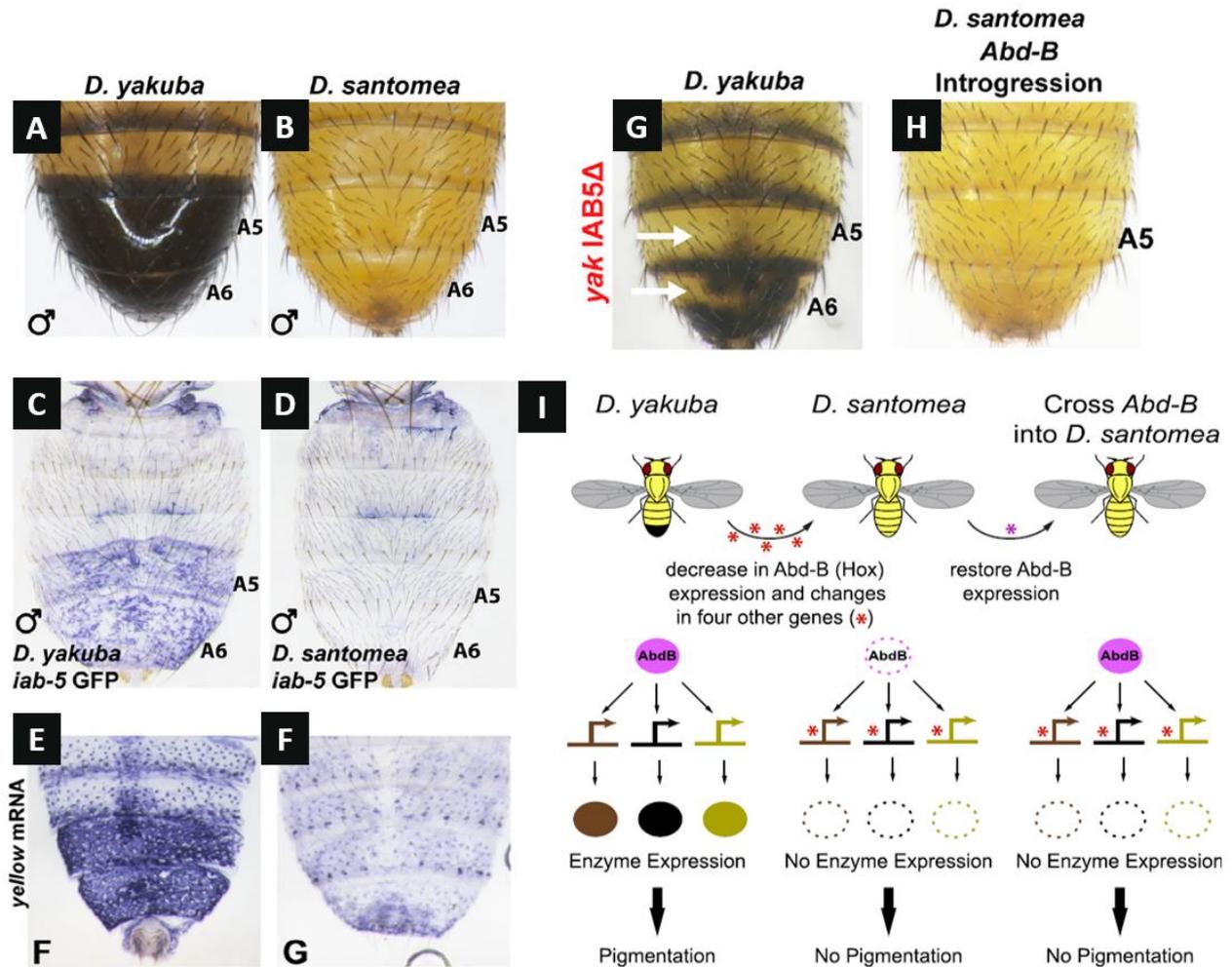


Figure 13 : Des modifications réparties sur l'ensemble du réseau génétique contrôlant la pigmentation expliquent les différences de coloration des segments abdominaux entre *D. yakuba* et *D. santomea*. A et B : Vue dorsale de l'extrémité postérieure de l'abdomen de mâles adultes de *D. yakuba* et *D. santomea*, respectivement. C et D : *iab-5* contrôle l'expression de *AbdB* dans la cuticule des drosophiles adultes au niveau des segments abdominaux. Un rapporteur GFP de *iab-5* montre l'activité de cet élément cis-régulateur de *AbdB* chez *D. yakuba* et *D. santomea*, respectivement. E et F : Marquage des ARN messagers de *yellow* au niveau des segments abdominaux chez *D. yakuba* et *D. santomea*, respectivement. L'activité de *AbdB* et de *yellow* est étroitement corrélée chez ces deux espèces de drosophiles. G : les mâles de *D. yakuba* homozygotes pour la délétion de *iab-5* présentent une perte de pigmentation au niveau des segments A5 et A6, ce qui suggère que *AbdB* contrôle la pigmentation. H : en revanche, l'expression de *AbdB* dans les segments A5 et A6 de *D. santomea* ne restaure pas la pigmentation, ce qui suggère que *AbdB* n'est pas suffisant pour induire la pigmentation dans ce contexte, et qu'il n'active pas des gènes cibles tels que *yellow*. I : Schématisation du modèle proposé pour expliquer l'évolution de la pigmentation chez *D. yakuba* et *D. santomea*. Chez *D. yakuba*, *AbdB* active l'expression de gènes impliqués dans la pigmentation, ce qui permet l'apparition de la teinte sombre des segments A5 et A6. Au cours de l'évolution de *D. santomea*, de nombreuses mutations ont touchés les gènes impliqués dans la pigmentation, ainsi que la perte d'expression de *AbdB* dans les segments A5 et A6 des mâles adultes. Tout cela a provoqué la perte de la teinte sombre de ces segments. Restaurer l'expression de *AbdB* chez *D. santomea* actuel n'est pas suffisant pour restaurer la teinte sombre des segments A5 et A6, dont la perte est due aux modifications qu'ont subies les gènes en aval impliqués dans la pigmentation. Adapté à partir de Liu et al. 2019.

1.5 Fonctions génériques et spécifiques des gènes Hox

Les facteurs de transcription Hox sont connus pour être les régulateurs maîtres de la morphogénèse différentielle au cours du développement et de l'évolution. Chaque protéine Hox a été étudiée pour ses fonctions uniques et spécifiques. Des études récentes soulignent cependant qu'au cours de certains processus biologiques, les protéines Hox peuvent être interchangeables, ce qui suggère l'existence de fonctions des Hox non-spécifiques, dites « génériques ». On retrouve des fonctions génériques des Hox dans de nombreux tissus, chez l'embryon comme chez l'adulte, des drosophiles aux vertébrés.

En effet, les gènes Hox impliqués dans le développement de segments différents, peuvent parfois présenter des similarités fonctionnelles. Chez la drosophile, c'est notamment le cas de *Ubx* et *abdA*. *abdA* est responsable du développement de segments abdominaux chez la drosophile, mais est dans une certaine mesure capable de sauver la perte de fonction de *Ubx* lors du développement de l'haltère, ce qui suggère que la protéine AbdA est capable d'orchestrer le développement de l'haltère en régulant des gènes cibles de façon similaire à *Ubx* dans ce contexte développemental (Casares, Calleja, et Sánchez-Herrero 1996) (**Figure 14**).

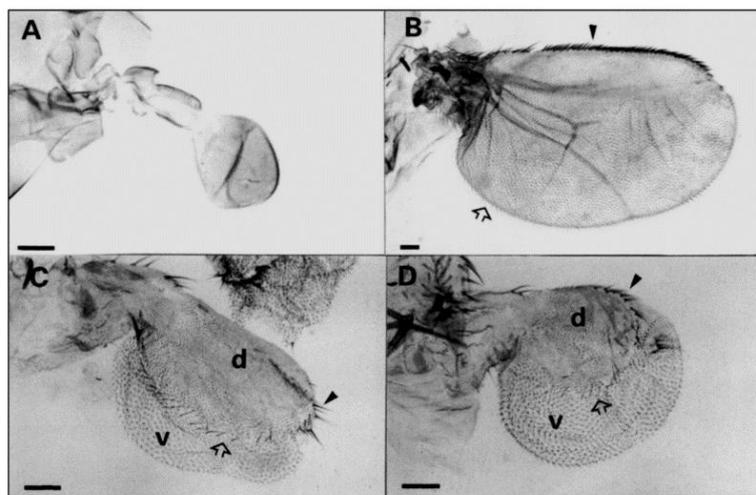


Figure 14 : Similarité fonctionnelle entre *Ubx* et *abdA* lors du développement de l'haltère chez la drosophile. A : Haltère sauvage. **B :** la combinaison d'allèles *abx bx³ pbx/Ubx^{lac1}* induit la transformation de l'haltère en aile, due à la perte d'activité de *Ubx*. La tête de flèche indique la triple rangée de poils sensitifs caractéristique de la marge de l'aile antérieure, et la flèche vide indique la rangée de longs poils caractéristiques de la marge de l'aile postérieure. **C :** Dans ce contexte, la protéine *Ubx* exogène produite à l'aide du système UAS-Gal4 (*MS1096-Gal4/+ ; UAS-Ubx abx bx³ pbx/Ubx^{lac1}*) induit un sauvetage partiel du développement de l'haltère. **D :** De manière très similaire, la production de la protéine *AbdA* (*MS1096-Gal4/+ ; UAS-abdA abx bx³ pbx/Ubx^{lac1}*) provoque un sauvetage de la perte de *Ubx* endogène au cours du développement de l'haltère.

Dans les corps gras des larves, plusieurs gènes Hox ont un profil d'expression se chevauchant, et contrôlent le déclenchement de l'autophagie développementale de manière redondante (Banreti et al. 2014). Les protéines Hox répriment les gènes impliqués dans l'autophagie, comme *Atg8b*, et leur disparition avant la formation du puparium permet l'activation de l'autophagie développementale. Ce phénomène d'autophagie permet la dégradation et le recyclage de composants cellulaires, permettant le remodelage des tissus larvaires, et la transformation en adulte au cours de la métamorphose (Tracy et Baehrecke 2013). Dans ce tissu, les protéines Hox jouent ainsi un rôle redondant et générique plutôt que paralogues-spécifique.

Le développement de la « ring gland », une glande endocrine contrôlant des processus comme la métamorphose en sécrétant des hormones telles que l'ecdysone, implique la fusion de plusieurs tissus comme le corps allate (CA) et la glande prothoracique (GP). Le CA, la GP et les trachées sont connus pour provenir de cellules progénitrices homologues dans leurs segments respectifs : le CA où *Dfd* est exprimé, la GP où *Scr* est exprimé, et les trachées où *Antp* et les gènes Hox du complexe *bithorax* sont exprimés. En cas de double mutation de *Dfd* et *Scr*, les primordia du CA et de la GP ne sont plus spécifiés. Cependant, il est possible de sauver leur spécification par l'expression de n'importe quel gène Hox de *Dfd* à *AbdB* (Sánchez-Higueras, Sotillos, et Castelli-Gair Hombría 2014).

Le contexte du processus générique de la myogenèse et du développement de la diversité des muscles chez la drosophile est aussi un bon exemple. *Antp*, *Ubx* et *AbdA* régulent de façon similaire les informations de position et mésoderme-spécifique des progéniteurs des muscles somatiques, afin de coordonner le développement des muscles. Ils agissent à différentes étapes du processus de spécification des muscles en régulant des cibles similaires, même si *Antp* et *Ubx/AbdA* utilisent pour cela des motifs cis-régulateurs parfois différents (Enriquez et al. 2010).

Les gènes Hox du complexe Bithorax (*Ubx*, *abdA* et *AbdB*) sont tous impliqués dans la répression des primordia de pattes lors du développement de l'abdomen, via la répression du sélecteur des pattes *Distal-less* (*Dll*) (Vachon et al. 1992). Les gènes Hox centraux et postérieurs partagent la fonction de répression de l'identité de la tête dans les segments du tronc, notamment via la répression du gène *Optix* (Coiffier et al. 2007). Le gène Hox *labial* (*lab*) est nécessaire pour la spécification des neuromères tritocérébraux durant le développement embryonnaire du système nerveux de la drosophile. Étonnamment, le phénotype du cerveau dans le mutant *labial* peut être sauvé par n'importe quel gène Hox de la drosophile, à l'exception de *AbdB* (Hirth et al. 2001).

On trouve également des exemples chez les vertébrés. Les gènes Hox sont exprimés dans le système nerveux des souris où ils jouent un rôle majeur en définissant l'identité et les motifs synaptiques des neurones dans les différentes régions. L'identité des neurones de la colonne motrice latérale (CML) est spécifiée par les gènes Hox du groupe paralogues 6 dans la région brachiale. Cependant les gènes Hox des groupes paralogues 5, 7 et 8 peuvent tous se

substituer aux Hox du groupe paralogue 6 pour spécifier les neurones de la CML brachiale (Lacombe et al. 2013).

Chez la souris et le poulet, des expériences de perte et gain de fonction des gènes *Hoxa2*, *Hoxa3* et *Hoxb4* montrent que ces différents gènes Hox partagent la capacité de réprimer l'ostéochondrogenèse, un processus impliqué dans les segments les plus antérieurs afin de permettre le développement des os et cartilages faciaux à partir de la crête neurale faciale (Schwarz et al. 2014) (Creuzet, Couly, et Douarin 2005).

Le contrôle de l'élongation de l'axe directeur chez l'embryon est également une fonction générique des gènes Hox, retrouvée chez la souris et le poulet (Young et al. 2009 ; Denans, Imura, et Pourquié 2015). Chez la souris, *Cdx* est essentiel pour l'expansion postérieure au cours de l'embryogenèse (van den Akker et al. 2002) et certaines mutations touchant ce gène causent des troncations de l'axe antéro-postérieur. Les gènes Hox des groupes paralogues centraux *Hoxa5* et *Hoxb8* sont capables de sauver le mutant *Cbx*, tandis que l'expression précoce des gènes Hox du groupe paralogue 13 (postérieur) arrête prématurément l'élongation de l'axe AP. Dans les deux cas, les gènes Hox modulent l'activité de la voie de signalisation Wnt (Young et al. 2009). Chez le poulet, les gènes Hox des groupes paralogues postérieurs (9 à 13) jouent un rôle de ralentissement de l'élongation de l'axe, en réprimant l'activité de la voie de signalisation Wnt d'autant plus fortement qu'ils sont postérieurs (Denans et al. 2015).

Bien que la plupart des études se focalisent sur le rôle des gènes Hox durant le développement embryonnaire, ils sont également actifs au stade adulte. Chez la souris, des gènes Hox des complexes A, B et C sont exprimés dans la moelle osseuse où ils contrôlent de manière redondante l'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques, et répriment leur différenciation (Ernst et al. 2004).

Dans l'appareil reproducteur féminin adulte, les gènes Hox postérieurs *HoxA9*, *HoxA10*, *HoxD10* et *HoxA11* sont nécessaires pour promouvoir la réceptivité endométriale (réceptivité de l'endomètre à l'implantation de l'embryon) (Xu et al. 2014).

Les gènes Hox des groupes paralogues postérieurs (9 à 13) jouent un rôle essentiel dans le développement des membres le long de l'axe proximo-distal. Les gènes Hox du groupe paralogue 11 sont essentiels pour la cicatrisation des fractures au niveau du zeugopode. En effet, ils sont nécessaires pour le renouvellement des cellules souches multipotentes mésenchymales de la moelle osseuse, capables de se différencier en ostéoblastes, chondroblastes et adipocytes, et permettant la régénération des os. Cela semble être une fonction générique des gènes Hox car les gènes d'autres groupes paralogues sont impliqués dans le même processus au niveau des segments des membres dans lesquels ils sont exprimés, comme le stylopode (plus proximal) pour les groupes paralogues 9 et 10, ainsi que dans le sternum (donc en dehors des membres) pour les gènes *Hoxa5*, *Hoxb6* et *Hoxc6* (Rux et al. 2016 ; Saurin et al. 2018).

Les gènes Hox orthologues issus d'animaux parfois très distants sont capables de se substituer dans certains contextes, soulignant la conservation robuste de fonctions générales au cours de l'évolution. C'est notamment le cas du gène *HoxB1* de poulet, capable de sauver la perte de fonction de *labial* chez la drosophile, restaurant la morphologie correcte de la tête et la viabilité de l'embryon (Lutz et al. 1996). Au sein de leurs espèces respectives, les orthologues de *Ubx* chez les abeilles, les coléoptères et les papillons ne répriment pas le développement des ailes. Cependant, lorsqu'ils sont exprimés chez la drosophile, ils provoquent une transformation des ailes en haltère, ce qui suggère une fonction conservée dépendante du contexte développemental dans lequel ces gènes s'expriment (Prasad et al. 2016). L'orthologue de *Ubx* présent chez les onychophores (*OUbx*) exprimé artificiellement chez la drosophile est capable de transformer les ailes en haltères, et les antennes en pattes de manière similaire à *Ubx* de drosophile malgré leur divergence datant d'environ 540 millions d'années. En revanche, *OUbx* est incapable de réprimer *Dll*. Cela montre que si certaines fonctions de *Ubx* sont conservées au cours de l'évolution, d'autres sont restreintes à certains lignages (Grenier et Carroll 2000).

Toute cette littérature supporte bien l'idée qu'il existe des fonctions génériques des gènes Hox dans différents tissus, que ce soit pendant le développement embryonnaire ou chez l'adulte, chez la drosophile ou les vertébrés. De la connaissance de ces fonctions génériques semble émerger le principe que ces fonctions génériques précèdent les fonctions plus spécifiques.

Chez la drosophile, le contexte du développement du lignage de muscles « Dorsal Acute » DA3 est une bonne illustration de ce principe. Lors du développement de ces muscles, deux contributions successives des gènes Hox *Antp*, *Ubx* et *abdA* sont nécessaires dans les segments où ils s'expriment respectivement. La première contribution consiste en une fonction générique de sélection de cellules progénitrices des muscles, les « founder myoblast », à partir de la division asymétrique au sein d'une population de cellules pro-musculaires. La seconde contribution des gènes Hox survient après cette division asymétrique et permet la diversification des muscles de manière segment-spécifique. Pour cela, *Antp* et *Ubx/AbdA* régulent l'expression du gène *collier (col)* à l'aide de motifs cis-régulateurs différents (Enriquez et al. 2010). Un cas de figure similaire est observable lors de la répression de *Distal-less (Dll)* afin d'empêcher le développement des membres dans les segments abdominaux de la drosophile par *Ubx*, *AbdA* et *AbdB*, qui repose sur des mécanismes moléculaires spécifiques. Alors que la répression de *Dll* par *Ubx* et *AbdA* nécessite la présence du cofacteur Extradenticle (*Exd*), *AbdB* n'en a pas besoin pour réprimer *Dll* (Sambrani et al. 2013). De plus, *Ubx* interagit avec *Sloppy paired*, tandis que *AbdA* interagit avec *Engrailed*, afin de réprimer *Dll* dans leurs compartiments respectifs (Gebelein, McKay, et Mann 2004). Cela souligne le fait que les fonctions génériques des gènes Hox ne reposent pas systématiquement sur des mécanismes moléculaires communs (**Figure 15**). Mieux comprendre cette diversité moléculaire nécessite davantage de connaissances quant aux réseaux d'interactions, aux interactomes des protéines

Hox, et donc de mieux connaître le rôle des différents domaines (conservés ou non) de ces protéines.

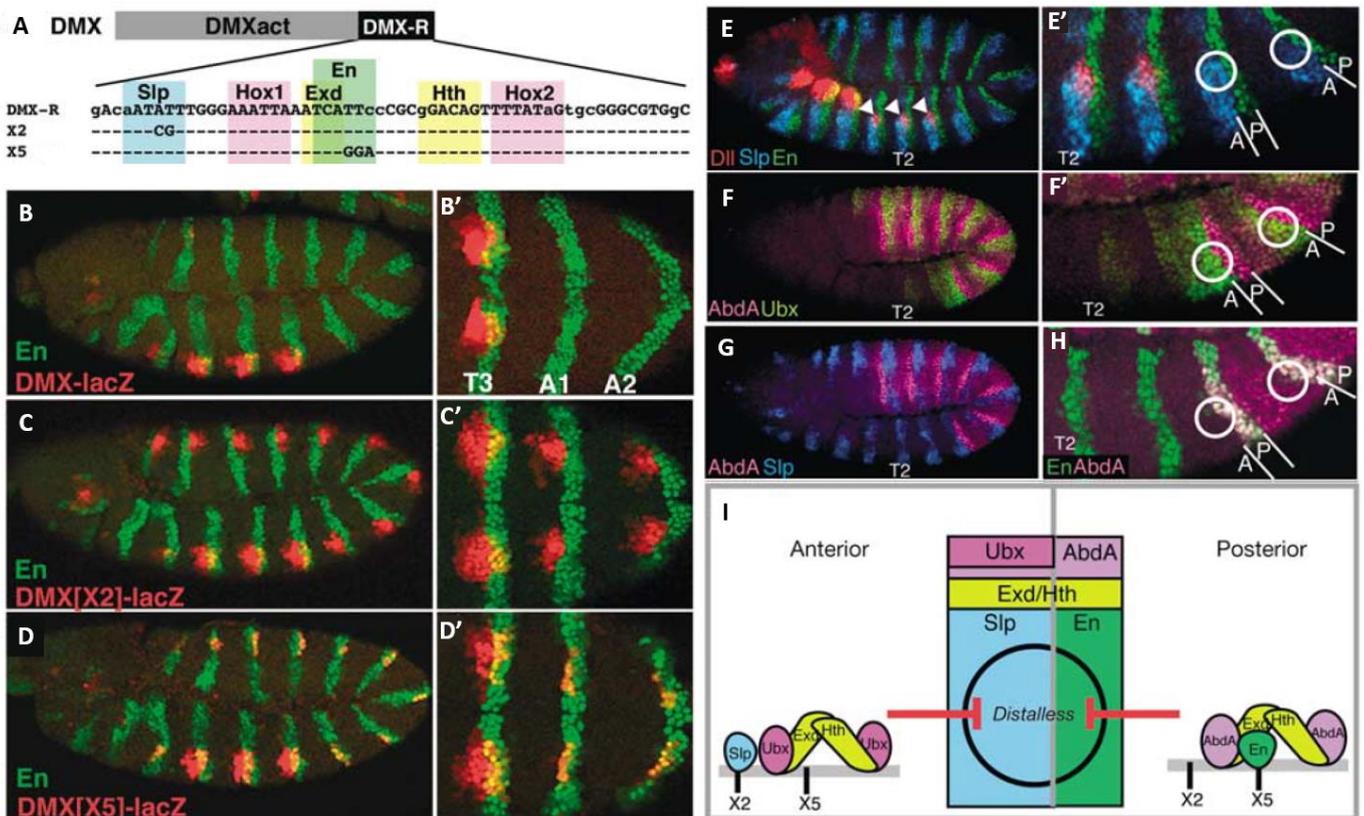


Figure 15 : Les protéines Ubx et AbdA utilisent des mécanismes moléculaires distincts pour réprimer le gène *Dll*. **A** : DMX est un élément cis-régulateur du gène *Dll*, constitué d'un élément activateur (DMXact) et d'un élément répresseur (DMX-R) sur lequel peuvent se fixer les protéines Sloppy-paired (Slp), Engrailed (En), Extradenticle (Exd), Homothorax (Hth) ainsi que des protéines Hox. Certaines mutations peuvent toucher les sites de liaisons pour ces protéines, comme les mutations X2 et X5 qui abolissent respectivement la capacité de Slp et de Engrailed à lier l'élément DMX-R. **B, C, D** : Vue latérales d'embryons de stade 11 contenant divers rapporteurs LacZ pour des variants de l'élément DMX (en rouge) ainsi qu'un marquage de En (en vert), dont **B', C' et D'** sont des agrandissements en vue ventrale. **B/B'** : l'expression de l'élément DMX sauvage est limitée au thorax, où il peut être actif indépendamment de la présence de En. **C, C'** : DMX-X2 est actif dans le thorax, mais également dans les compartiments antérieurs des segments abdominaux, où En est absent. **D, D'** : DMX-X5 est actif dans le thorax, mais aussi dans les compartiments postérieurs des segments abdominaux, là où En est présent. **E, F, et G** : Vues latérales d'embryons sauvages de stade 11, dont **E'** et **F'** sont des agrandissements. **E** : Marquages de Slp (bleu), En (vert) et de *Dll* (rouge). **E'** : Les cercles blancs indiquent approximativement les cellules ayant le potentiel d'exprimer *Dll* dans les segments abdominaux 1 et 2 (A1 et A2). Ces cellules chevauchent la limite entre les domaines où sont présents respectivement Slp et En. **F** : Marquages de AbdA (Violet) et Ubx (vert). **F'** : Les cercles blancs indiquent approximativement les cellules ayant le potentiel d'exprimer *Dll* dans les segments A1 et A2. Le niveau de Ubx est plus important du côté antérieur que du côté postérieur des différents compartiments. AbdA présente le profil inverse. **G** : Marquage de AbdA (violet) et Slp (bleu). Le plus haut niveau de marquage AbdA se localise dans les compartiments postérieurs des segments, adjacents aux domaines antérieurs où se trouvent les cellules présentant un marquage de Slp. **H** : Marquage de AbdA et En. On constate une colocalisation de En et AbdA dans le compartiment postérieur des segments abdominaux. **I** : Schématisation du modèle découlant de ces observations. Le mutant X2 provoque une expression ectopique de *Dll* uniquement dans les compartiments

antérieurs des segments abdominaux, où Ubx et Slp sont colocalisés. Le mutant X5 provoque une expression ectopique de *Dll* uniquement dans les compartiments postérieurs des segments abdominaux, où AbdA et En sont colocalisés. Cela suggère que Ubx forme un complexe avec Slp (qui nécessite le site X2 pour se lier à l'élément DMX) pour provoquer la répression de *Dll*, tandis que AbdA forme un complexe avec En (nécessitant le site X5 pour se lier à DMX). Ces deux mécanismes différents permettent aux deux protéines Hox Ubx et AbdA de réprimer *Dll* dans l'ensemble de l'abdomen. Adapté à partir de Gebelein, McKay, et Mann 2004.

Le fait que des fonctions génériques puissent reposer sur des mécanismes moléculaires spécifiques rend difficile d'estimer la proportion de fonctions génériques et spécifiques des gènes Hox. Par exemple, l'analyse transcriptomique après l'expression ectopique dans des embryons de 6 des 8 protéines Hox (Dfd, Scr, Antp, Ubx, AbdA et AbdB) de la drosophile révèle que la plupart (68,9%) des gènes cibles ne sont affectés que par une unique protéine Hox. Deux tiers des gènes cibles de AbdA lui sont spécifiques, tandis que chez les autres Hox la proportion de gènes cibles uniques varie généralement entre 18 et 36% (Hueber et al. 2007). À l'inverse, les protéines Hox n'ont pas à être extrêmement spécifiques lorsqu'elles sont présentes lors d'un processus développemental précis. Par exemple, il n'est pas nécessaire à Ubx et Lab de médier des fonctions distinctes pour spécifier respectivement les haltères ou le tritocerebrum puisque ce sont les seules protéines Hox produites dans les tissus correspondants (Casares et al. 1996 ; Hirth et al. 2001). La nécessité de fonction spécifique ou générale des Hox repose donc sur le contexte développemental, et plus particulièrement sur l'activité ou non d'autres gènes Hox pouvant jouer des rôles redondants ou différents au sein du même tissu. Une classification des gènes cibles des protéines Hox en trois catégories a donc été proposée : les gènes cibles paralogues-spécifiques, semi-paralogues-spécifiques, et généraux (revu par (Merabet et Mann 2016). Ces différentes catégories de gènes cibles illustrent la complexité des processus moléculaires que les protéines Hox doivent orchestrer *in vivo*. Les protéines Hox doivent présenter un équilibre subtil entre des interactions moléculaires spécifiques et non spécifiques, que ce soit en termes de liaison à l'ADN ou d'interactions protéine-protéine, ce qui rend leurs modes d'actions moléculaires très versatiles et difficiles à élucider.

1.6 Régulation de l'expression des gènes Hox

Le génome de la drosophile présente deux complexes de gènes Hox ; le complexe Antennapedia (ANT-C) et le complexe Bithorax (BX-C). Le complexe ANT-C contrôle l'identité des segments les plus antérieurs jusqu'au second segment thoracique (T2), tandis que le BX-C contrôle l'identité du troisième segment thoracique (T3) et des segments abdominaux. Les gènes Hox contenus dans le ANT-C sont *labial (lab)*, *proboscipedia (pb)*, *Deformed (Dfd)*, *Sex combs reduced (Scr)* et *Antennapedia (Antp)*. Le BX-C contient quant à lui les gènes *Ultrabithorax (Ubx)*, *abdominal A (abdA)* et *Abdominal B (AbdB)*. Le complexe ancestral des arthropodes aurait contenu 10 gènes Hox, ce qui comprend les homologues des 8 gènes Hox précédemment cités ainsi que ceux des gènes *zerknüllt (zen)* et *fushi tarazu (ftz)*. Ces deux gènes sont bien présents dans le ANT-C mais ont perdu leurs propriétés homéotiques au cours de l'évolution, par l'évolution de leurs séquences cis-régulatrices ainsi que de leurs séquences codantes (Mann et Carroll 2002). Ftz a notamment acquis une fonction de gène Pair-rule (Yu et Pick 1995). Le gène zen a quant à lui acquis une fonction dans le développement des tissus extra-embryonnaires (Falciani et al. 1996). Le profil d'expression des gènes Hox s'établit à partir de l'effet combiné des gènes de type Gap, Pair-rule et Segment polarity, impliqués dans la segmentation de l'embryon. Les gènes Gap (*knirps*, *Krüppel*, *hunchback*, *giant*, *huckebein*, *tailless*, *orthodenticle*, *buttonhead*...) sont les premiers gènes de segmentation à s'exprimer, divisant l'embryon en larges régions (Gilbert 2000). Les mutations les affectant provoquent la perte de larges portions de l'embryon (ou « gaps »). Ils contrôlent notamment l'expression des gènes pair-rule, qui constituent l'avant-dernier niveau de la cascade de régulation génétique permettant la segmentation de l'embryon. Les gènes Paire-rule définissent les limites des différents segments et parasegments. Ils sont les premiers à s'exprimer de manière périodique le long de l'axe AP de l'embryon. Il existe 7 gènes paire-rule canoniques (*hairy (h)*, *even-skipped (eve)*, *runt (run)*, *fushi tarazu (ftz)*, *odd-skipped (odd)*, *paired (prd)*, et *sloppy-paired (slp)*, qui sont impliqués dans la régulation des gènes de type segment polarity (Clark 2017). Les gènes de type segment polarity comme *wingless (wg)*, *hedgehog (hh)* et *engrailed (en)* définissent la polarité antéro-postérieure des différents parasegments (Perrimon et Mahowald 1987) (von Dassow et al. 2000) (**Figures 16**). Les gènes Hox sont exprimés en réponse aux contributions combinées des gènes gap, pair-rule et segment polarity, et agissent au niveau final de la segmentation en conférant leur identité aux différents segments. Une fois activés, le niveau d'activité précis des gènes Hox est notamment maintenu par la balance de l'activité des TrxG et PcG (Ringrose et Paro 2004).

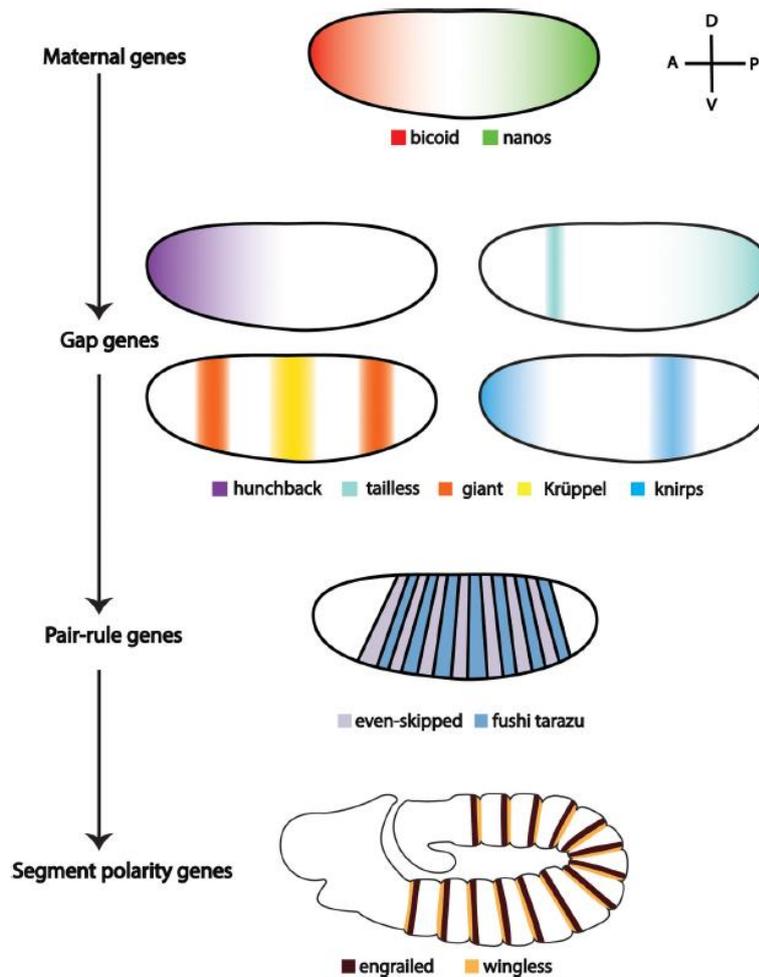


Figure 16 : Expression séquentielle de gènes lors du développement de l'axe antéro-postérieur dans l'embryon de drosophile. Le développement de l'axe antéro-postérieur commence avec les gènes maternels comme *bicoid*, *nanos*, qui vont réguler l'expression de gènes zygotiques en aval. Il s'agit des gènes gap tels que *hunchback*, *tailless*, *Krüppel*, *giant* ou encore *knirps*. Les produits des gènes gap, combinés avec l'action des morphogènes maternels, contrôlent l'expression des gènes pair rule au sein de sept bandes (par exemple *even-skipped* et *fushi tarazu*). Enfin, la polarité antéro-postérieure des parasegments est déterminée par l'expression des gènes segment polarity comme *wingless* ou *engrailed*. (Gheisari, Aakhte, et Müller 2020)

1.6.1 Les protéines groupes Polycomb et Trithorax

La régulation de l'expression de n'importe quels gènes a lieu au sein du noyau des cellules, et repose en partie sur des modifications épigénétiques modifiant l'état de la chromatine. Les protéines des groupes Polycomb (PcG) et Trithorax (TrxG) sont les régulateurs épigénétiques les plus importants et évolutivement conservés (Geisler et Paro 2015). Ces deux groupes fonctionnent de manière antagoniste, et permettent la régulation fine de l'expression de nombreux gènes cibles, incluant les gènes Hox.

Polycomb (Pc) fût le premier PcG découvert chez la mouche drosophile (Lewis P.H, 1947). Certaines mutations de *Pc* provoquent l'expression ectopique de gènes Hox, provoquant la transformation de segments antérieurs en segments plus postérieurs, due à la dé-répression de gènes Hox postérieurs (Lewis 1978b). Le gène *Trithorax* fût ensuite découvert comme un gène antagoniste des PcG (Ingham 1983 ; Ingham 1985 ; Struhl et Akam 1985). Des cribles génétiques ont ensuite permis d'identifier de nombreux autres gènes dont les mutations produisaient des phénotypes similaires à ceux des mutations touchant *Pc* ou *Trx*, permettant leur classification dans les groupes PcG ou TrxG. Les protéines PcG et TrxG sont évolutivement très conservées (Ringrose et Paro 2004), et identifient leurs gènes cibles en interagissant avec des éléments cis-régulateurs nommés respectivement Polycomb Response Elements (PREs) (Chan, Rastelli, et Pirrotta 1994 ; Christen et Bienz 1994) ou Trithorax Response Elements (TREs) (Ringrose et Paro 2007).

L'analyse du complexe Bithorax (BX-C) de la drosophile a montré sa sub-division en domaines parasegment-spécifiques délimités par des éléments insulateurs (Simon et al. 1990 ; Simon, Chiang, et Bender 1992 ; Barges et al. 2000). Ces domaines comprennent un ensemble d'éléments régulateurs tels que des enhanceurs spécifiques de types cellulaires, d'éléments initiateurs ou silenciers (Maeda et Karch 2006 ; Maeda et Karch 2009 ; Maeda et Karch 2010). Ainsi, au sein d'un parasegment les cellules vont activer l'expression d'un gène Hox approprié en utilisant des enhanceurs spécifiques de types cellulaires, qui pourront être sous le contrôle de *PRE* et donc réprimés dans les types cellulaires où ce gène Hox ne doit pas être activé (Busturia, Wightman, et Sakonju 1997). Une fois recrutés par un *PRE*, les PcG compactent les enhanceurs en structures semblables à de l'hétérochromatine au sein des parasegments où ces enhanceurs sont censé être maintenus dans un état inactif (Müller et Bienz 1991). C'est notamment le cas de *iab-7*, qui régule l'activité du gène Hox *AbdB* et est sous le contrôle des PcG et TrxG (Mishra et al. 2001). Le *PRE iab-7* contrôle l'expression de *AbdB* afin de spécifier l'identité du parasegment 12. L'altération de la limite entre les domaines du complexe BX-C contrôlant l'identité des parasegments 11 et 12 entraîne un gain de fonction ectopique de *iab-7* dans le parasegment 11, le transformant en une copie du parasegment 12. Dans ce contexte, l'expression de *AbdB* est alors contrôlée par le domaine cis-régulateur *iab-7* et non plus le domaine *iab-6* (Hagstrom, Muller, et Schedl 1997 ; Mihaly et al. 1997 ; Mishra et al. 2001). *Ubx* est également capable de réprimer sa propre transcription via un mécanisme dépendant de *PRE*. Une trop forte dose de *Ubx* provoque ainsi la répression permanente de *Ubx* endogène

dans le disque imaginal d'haltère (Garaulet et al. 2008). Le même type de boucle de régulation rétroactive est également observé pour le gène *engrailed*, suggérant que ce type de répression permanente induite pas une boucle rétro-active est un mécanisme général, et non spécifique des gènes Hox (Garaulet et al. 2008). Les PcG sont donc nécessaires pour la répression des gènes Hox afin de circonscrire leur expression aux segments où ils sont censés s'exprimer, et contrôler leurs niveaux d'expression.

Ce mécanisme est très conservé et se retrouve également chez les vertébrés. La perte de fonction des homologues des PcG chez les vertébrés induit des défauts de répression des gènes Hox, aboutissant à des transformations postérieures. C'est notamment le cas lors de la perte de fonction du PcG *Bmi-1* chez la souris. (van der Lugt et al. 1996). Les PcG utilisent des PRE très similaires à ceux retrouvés chez la drosophile pour réguler l'expression des gènes Hox chez les vertébrés comme l'homme (Woo et al. 2010). Cela souligne la conservation évolutive des PcG, impliqués dans la régulation des gènes Hox chez les animaux vertébrés comme chez les arthropodes, et plus globalement dans la répression épigénétique jusque chez les plantes (Whitcomb et al. 2007) (**Figure 17**).

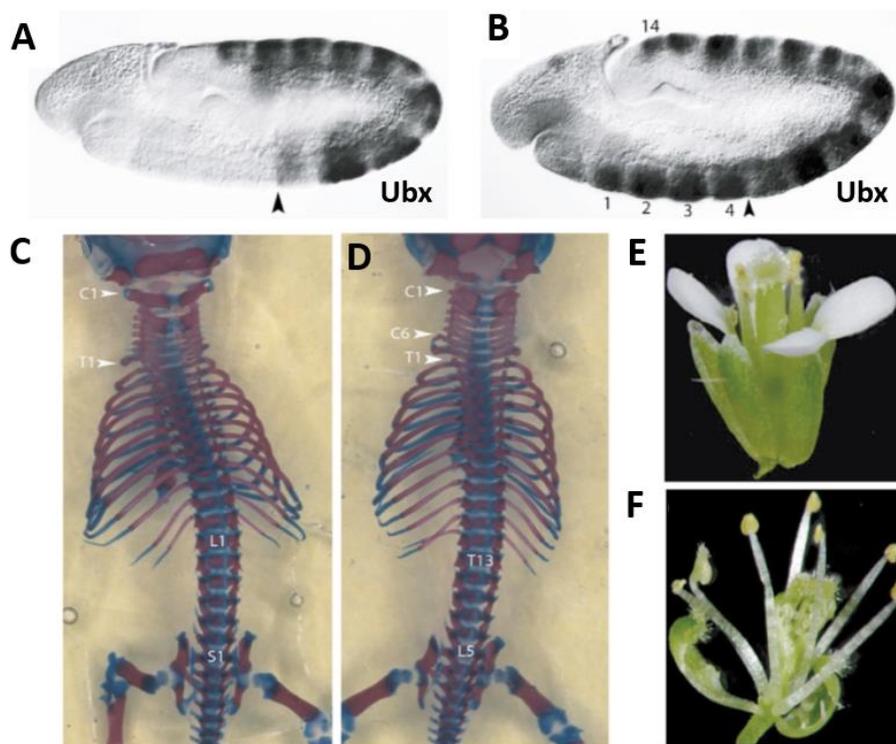


Figure 17 : Conservation évolutive de la fonction des PcG illustrée par des transformations homéotiques dues à des mutants chez divers espèces. A : Dans l'embryon de drosophile sauvage, la limite antérieure du domaine d'expression de Ubx se trouve au niveau du parasegment 5. **B :** chez la drosophile mutante pour *Su(z)12* (un PcG), on observe une dé-répression de Ubx au niveau des parasegments 1 à 4. **C :** Squelette de souris sauvage. **D :** chez la souris mutante pour le gène *Cbx2* (un orthologue de Polycomb), on observe la transformation postérieure de vertèbres : la dernière vertèbre cervicale (C6) transformée en première vertèbre thoracique (T1) ; la dernière vertèbre thoracique (T13) en

première vertèbre lombaire (L1) ; la cinquième vertèbre lombaire (L5) en première vertèbre sacrée (S1). Cela suggère une dé-répression des gènes Hox. **E** : Une fleur sauvage de *Arabidopsis thaliana*, présentant une organisation concentrique des quatre organes floraux (sépal, pétale, étamines et carpelles). **F** : chez le mutant de FIE (un homologue du PcG *extra sexcombs*) de *A. thaliana*, les pétales sont manquants, et les sépales sont transformés en organes capelloïdes. Cela suggère que malgré l'absence de gènes Hox chez les plantes, les PcG contrôlent l'expression de gènes clés du développement, soulignant une forte conservation fonctionnelle. Adapté de Whitcomb et al. 2007.

Les PREs ne sont pas restreints à la répression de promoteurs adjacents, mais peuvent aussi médier la répression transcriptionnelle à très grande distance. Cela est possible par le rapprochement dans l'espace de l'élément à réguler et du PRE, très éloignés en termes de séquence voire sur des chromosomes différents, via l'organisation tridimensionnelle des chromosomes. Ce phénomène est appelé « chromosome kissing » (Dernburg et al. 1996). C'est notamment le cas du PRE *iab-7* (Bantignies et Cavalli 2011 ; Bantignies et al. 2011) ou encore Mcp (Vazquez et al. 2006). On retrouve de nombreux PREs dans le génome de la drosophile (Schwartz et al. 2006) mais aussi au sein du génome des vertébrés (Sing et al. 2009 ; Kassis et Brown 2013). Bien que ces éléments aient été largement étudiés, la manière dont sont régulés les PREs reste mystérieuse.

Les différentes protéines du groupe Polycomb font partie du Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) ou bien du Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) et PhoRC, qui diffèrent par leur effet sur la chromatine. PRC1 est également subdivisé entre les membres canoniques (cPRC1) et non-canoniques (ncPRC1) (Blackledge, Rose, et Klose 2015). Le complexe PRC1 catalyse l'ajout d'une ubiquitine au niveau de la lysine 119 de l'histone H2A (H2AK119ub1), alors que le complexe PRC2 catalyse l'ajout de 1 à 3 groupements -méthyl au niveau de la lysine 27 des histones H3 (H3K27me1, H3K27me2 et H3K27me3) (Simon et Kingston 2013). Tous les complexes PRC1 présentent un noyau conservé constitué de la protéine RING1 et d'une des 6 protéines à domaines ring-finger (PCGF1 à PCGF6) du PcG. Le noyau fonctionnel des complexes PRC2 est composé de 4 protéines essentielles : une histone méthyltransférase à domaine SET « Enhancer of Zeste » (EZH1 ou EZH2, mutuellement exclusives), les protéines embryonic endoderm development (EED) et suppressor of zeste (SUZ12) régulant l'activité catalytique, ainsi que une protéine de liaison aux histones RBAP46 ou RBAP48 (Margueron et Reinberg 2011). De nombreuses autres protéines peuvent venir compléter ces complexes. La répression induite par les PcG est médiée par la modification de l'environnement chromatinien pouvant conduire à une compaction de la chromatine, la rendant inaccessible pour la machinerie transcriptionnelle. Différents modes de compaction sont observés, dépendant du variant de PRC qui l'a provoquée. CBX2, un composant de PRC1 des mammifères, a notamment une activité de pontage des nucléosomes adjacents (Lau et al. 2017). La protéine EED reconnaît quant à elle la triméthylation H3K27me3 induite par les complexes PRC2, et stimule ces complexes afin de propager cette marque épigénétique au niveau des nucléosomes adjacents, permettant donc la propagation de l'état réprimé de la chromatine (Margueron et al. 2009 ; Jiao et Liu 2015).

D'autres cribles chez la drosophile ont permis d'identifier des PcG n'entrant pas dans la composition de PRC1 ou PRC2. C'est le cas des protéines du Pho-Repressive Complex (PhoRC),

un complexe n'ayant pas d'activité enzymatique mais se liant aux histones méthylées et jouant un rôle dans la maintenance de la répression transcriptionnelle (Klymenko et al. 2006), ou encore le Polycomb Repressive Désubiquitinase Complex (PR-DUB) présentant une activité de dé-ubiquitinase spécifique de l'histone H2A (Scheuermann et al. 2010). Ces complexes ont également des homologues chez les mammifères (Hauri et al. 2016). Les complexes PRC1 et PR-DUB ont des activités d'ubiquitination et de désubiquitination semblant a priori antagonistes. Cependant la déplétion simultanée des composants des PRC1 et PR-DUB induit une perte plus rapide de la répression des gènes Hox ainsi que des phénotypes homéotiques plus sévères que lors de la déplétion de composant d'un seul complexe. Cela suggère la nécessité d'un équilibre entre ces deux modes d'actions pour une efficacité optimale de la répression (Scheuermann et al. 2010).

Après la fertilisation, la prolifération cellulaire est rapidement induite par la dérégulation de gènes cibles des PcG. L'inactivation transcriptionnelle de la chromatine médiée par les PcG est donc considérée comme son état par défaut. La sortie de cet état « réprimé » de la chromatine serait alors dû à l'activité antagoniste des TrxG, qui contrebalancerait la fonction des PcG (Klymenko et Müller 2004 ; Grossniklaus et Paro 2014 ; Geisler et Paro 2015). Cela est cohérent avec le fait que l'on peut observer par Chromatin Immunoprecipitation and sequencing (ChIP-seq) que les complexes de PcG (notamment PRC1) et TrxG se localisent au niveau des mêmes *loci* (Beisel et al. 2007 ; Enderle et al. 2011). Il reste à mieux connaître les mécanismes par lesquels ces complexes sélectionnent leurs cibles, et permettent une balance fine entre activation et répression transcriptionnelle.

En revanche, les protéines du TrxG présentent bel et bien une activité antagoniste au PcG par leur rôle essentiel d'activateurs transcriptionnels. Le TrxG est divisé en deux complexes, le complexe Switch/sucrose non-fermentable (SWI/SNF) et la famille COMPASS. Le complexe SWI/SNF présente une activité de remodelage de la chromatine ATP-dépendant. Il a d'abord été identifié chez la levure, puis retrouvé chez la drosophile (Laurent, Treitel, et Carlson 1991; Tamkun et al. 1992 ; Khavari et al. 1993 ; Dingwall et al. 1995). La famille COMPASS présente une activité de di- ou tri-méthylation des histones H3 au niveau de la lysine 4 (H3K4me_{2/3}). Le complexe SET1/COMPASS à activité histone-méthyltransférase a également été initialement identifié chez la levure, puis comme étant largement conservé (Piunti et Shilatifard 2016). MLL1 (connue aussi sous le nom de ALL1 ou HRX) fut le premier composant de la famille COMPASS-like identifié chez les mammifères. On trouve de nombreux homologues de MLL (MLL1, MLL2, MLL3 et MLL4) chez les animaux et les plantes, formant des complexes COMPASS-like impliqués dans des régulations génétiques (Gu et al. 1992 ; Shilatifard 2012). Chaque protéine MLL est nécessaire pour la triméthylation H3K4 au niveau de sous-populations spécifiques de gènes chez les mammifères, mais ne semblent pas avoir de fonctions redondantes, la délétion de l'un ou l'autre des paralogues de MLL1 provoquant notamment des défauts d'expression des gènes Hox et des défauts léthaux dès le développement embryonnaire (Yu et al. 1995 ; Wu et al. 2008). La protéine Utx, membre du complexe MLL2 H3K4 méthyltransférase, est également capable d'éliminer les méthylations

H3K27 déposées sur les histones par les PcG (Van der Meulen, Speleman, et Van Vlierberghe 2014).

La marque épigénétique H2K4me3 déposée par les TrxG est capable de recruter directement des composants de la machinerie transcriptionnelle comme Transcription factor II D (TFIID) afin d'initier la transcription de gènes (Vermeulen et al. 2007). Mais les TrxG sont aussi eux-même impliqués dans le recrutement de la machinerie d'élongation. C'est notamment le cas de TAC1, un homologue de MLL chez la drosophile, qui recrute la protéine Spt16, un composant du complexe FACT (FAcilitates Chromatin Transcription) impliqué dans la promotion de l'élongation transcriptionnelle (Van Lijsebettens et Grasser 2010),

Les TrxG comme Ash sont également impliqués dans la maintenance de l'état transcriptionnel et agissent comme des « anti-répresseurs » empêchant les PcG d'appliquer à nouveau des marques épigénétiques répressives (Poux et al. 2002 ; Klymenko et Müller 2004). Certaines modifications post-traductionnelles sont nécessaires à la fonction de TrxG, comme que le clivage des protéines MLL/Trithorax par la Taspase1, nécessaire à la régulation des gènes Hox (Hsieh, Cheng, et Korsmeyer 2003). Ainsi, le fragment N-terminal de Trx se lie avec Ash1 au niveau de promoteurs de nombreux gènes afin de maintenir leur activité, tandis que le fragment C-terminal de Trx se lie plus spécifiquement au niveau des cibles des PcG, suggérant un rôle plus spécifiquement dirigé contre la répression induite par les PcG (Schwartz et al. 2010 ; Schuettengruber et al. 2009). Les TrxG peuvent également promouvoir l'expression génétique à l'aide d'autres marques épigénétiques permettant de contrebalancer l'action des PcG. Trx va par exemple s'associer avec l'histone-acétyltransférase CREB-Binding protein (CBP) afin de promouvoir l'acétylation H3K27, antagonisant avec l'action des PcG (Tie et al. 2014). Ash1 va également déposer des marques H3K36me2 antagonisant avec les méthylations H3K27 déposée par les PcG (Yuan et al. 2011). Il semble donc que le rôle global des TrxG soit de contrebalancer l'effet des PcG (Hanson et al. 1999 ; Schuettengruber et al. 2017) (**Figure 18**).

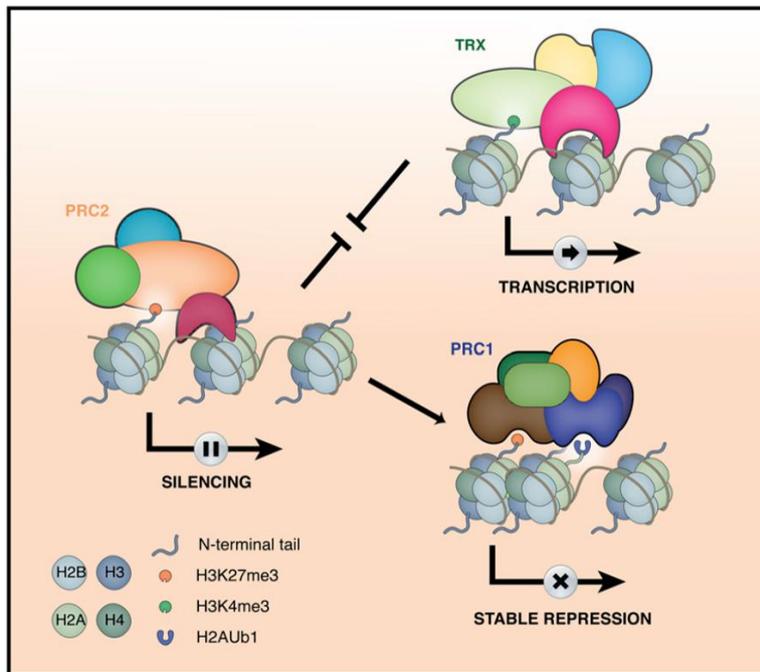


Figure 18 : Actions des complexes Trithorax et Polycomb. Les complexes PRC2 triméthylent la lysine 27 des histones H3, ce qui induit la répression (« silencing ») de la chromatine au niveau du locus cible. Cette marque peut être reconnue par les complexes PRC1. Cela induit la mono-ubiquitinylation des histones H2A ce qui déclenche la compaction de la chromatine en hétérochromatine, permettant une répression stable. L'action répressive des PRC2 est antagonisée par les TrxG. Les TrxG peuvent notamment tri-méthyle la lysine 4 des histones H3, rendant possible l'expression du locus cible (Holec et Berger 2012).

Les TrxG sont essentiels pour l'activation et la maintenance de l'expression des gènes Hox au cours du développement. Chez la drosophile, *Trithorax-like* est nécessaire pour l'activation de *Ubx* (Farkas et al. 1994). Au cours de l'embryogenèse chez la souris, *Mll* est nécessaire à l'activation de nombreux gènes Hox (*Hoxa7*, *Hoxc9*...) (Yu et al. 1998). Les TrxG du complexe TAC-1 permettent également de subtilement moduler le profil d'expression des gènes Hox. Ce complexe est impliqué dans l'activation de *Ubx* dans la partie postérieure des parasegments du tronc, mais également dans l'activation de l'ARN non-codant *bithoraxoid* (*bxd*) (qui réprime *Ubx*) dans la partie antérieure de ces parasegments. Cela rend possible l'expression mosaïque de *Ubx* nécessaire au bon développement de l'embryon (Petruk et al. 2006).

Cependant la frontière entre PcG et TrxG est parfois floue. Les mutations des PcG et des TrxG provoquent des effets opposés sur le développement de l'axe AP : les mutations affectant les PcG provoquent des transformations postérieures, tandis que celles touchant les TrxG provoquent des transformations antérieures (Kennison 1995), et les mutations PcG et TrxG ont des effets antagonistes qui peuvent s'avérer mutuellement suppresseurs. Cependant, des mutations de gènes originellement considérés comme faisant partie des PcG, à savoir *Asx*, *E(z)*, *E(Pc)*, *Psc*, *Scm* et *Su(z)*, ont été décrites comme pouvant également induire des phénotypes de type TrxG (Gildea, Lopez, et Shearn 2000). Certains gènes semblent donc avoir une fonction ambivalente, et être impliqués tant dans la répression transcriptionnelle au sein de complexes PRC que dans l'activation avec des TrxG. Ces gènes ont été classifiés dans un nouveau groupe, les Enhancers of Trithorax and Polycomb (ETP). L'activité de régulation transcriptionnelle ambivalente de *Additional Sex Comb* (*Asx*) observée chez la drosophile se retrouve avec son homologue la souris, *Asx12*, ce qui suggère la conservation fonctionnelle de ce groupe de gènes impliqué dans la répression comme l'activation des gènes Hox (Baskind et

al. 2009) (Fisher et al. 2010). Asx est notamment impliqué dans la régulation des modifications épigénétiques déposées par les PcG et les TrxG, interagissant avec diverses protéines de ces groupes et modulant leurs activités de méthylation des histones, jouant sur le ratio H3K4me3/H3K27me3 d'un même promoteur, et permettant donc une régulation fine du niveau d'activité du gène cible (Li et al. 2017).

1.6.2 La régulation des gènes Hox par les ARN non-codants

Au cours des dernières décennies, des études ont montré que les ARN non-codants (ncRNA) pouvaient interagir avec des facteurs de transcription ainsi que des régulateurs épigénétiques comme les PcG afin de moduler l'expression de gènes cibles (Zhao et al. 2008 ; Lee 2012). Les gènes Hox ne font pas exception à ce mécanisme, comme le montre le cas très étudié du long ARN non-codant (lncRNA) *Bithoraxoid* (*bxd*) contrôlant l'expression de *Ubx*. *bxd* est transcrit dans la même direction que *Ubx*, à partir d'une région en amont de celui-ci, et recrute des TrxG. afin de s'auto-activer, pour réprimer *Ubx* (Petruk et al. 2006).

HOTAIR est un lncRNA de 2,2 kb également connu pour réguler les gènes Hox dans les vertèbres. Chez l'homme, il serait transcrit depuis une région génomique située entre *HOXC11* et *HOXC12*. Cependant la perte de fonction de *HOTAIR* semble avoir peu d'effet sur l'activité des gènes du complexe *HOXC*, les gènes Hox les plus proches, mais provoque un effet drastique sur l'activité des gènes du complexe *HOXD*, pouvant induire des effets homéotiques telles que des transformations postérieures (lombo-sacrales), caractéristiques d'une perte de répression de gènes Hox postérieurs par les PcG (Li et al. 2013). Il semble donc que *HOTAIR* soit impliqué dans la répression du complexe HoxD. Pour cela, il interagit avec des PcG, notamment le complexe PRC2 (Rinn et al. 2007). Il est intéressant de noter que la séquence de *HOTAIR* est très peu conservée entre l'homme et la souris, et que l'effet de la délétion du complexe *HoxC* (comprenant *HOTAIR*) chez la souris a peu d'effet sur l'expression des gènes du complexe *HoxD* ainsi que sur sa méthylation H3K27. Cela suggère une évolution rapide de *HOTAIR* chez les vertébrés, et l'acquisition de propriétés particulières de répression du complexe *HoxD* chez l'homme, difficile à observer chez la souris (Schorderet et Duboule 2011). Cependant cette interprétation était issue de l'analyse d'une délétion plus importante que *HOTAIR*, mais d'une délétion de l'intégralité du complexe *HoxC* (8 gènes Hox, 2 microARN et *HOTAIR*) pouvant également affecter l'activité des gènes du complexe *HoxD*. Une délétion plus ciblée de *HOTAIR* (seulement 4kb) chez la souris montre également un effet de répression du complexe *HoxD*, comparable à ce qui était alors observé chez l'homme (Li et al. 2013). Ces observations contradictoires amorcèrent une controverse (Amândio et al. 2016 ; Li, Helms, et Chang 2016) basée sur les effets en cis et en trans des différentes mutations utilisées par les groupes étudiant cette problématique, illustrant la complexité et l'interdépendance des mécanismes de régulation des gènes Hox. Une explication apportée à cette controverse réside dans le fait que les phénotypes observés sont relativement variables et peu pénétrants, et dépendants de la consanguinité des souris employées. En effet Li et al. fournirent leurs souris

mutantes à l'équipe de Denis Duboule, qui arriva une nouvelle fois à la conclusion que HOTAIR ne réprime pas les gènes *HoxD* chez la souris. Cependant contrairement à Li et al., Denis Duboule et ses collaborateurs étudièrent les mutants dans un fond génétique croisé, et non consanguin, ce qui semblait avoir une importance déterminante dans l'analyse d'un phénotype relativement peu pénétrant. Cela rappelle l'importance de l'étude de phénotypes robustes, du mode d'utilisation des animaux modèles et en particulier de la question de l'impact de la consanguinité sur la reproductibilité des résultats (McLaren et Michie 1954), mais aussi du partage des outils et animaux modèles entre équipes de recherche (Selleri et al. 2016).

Les lncRNA jouent également un rôle dans la régulation des gènes Hox au sein des vertèbres. *HOTTIP* est un lncRNA transcrit à partir d'une région en amont de *HOXA13*, dans la direction opposée des gènes *HOXA*. *HOTTIP* a pour fonction de recruter les TrxG, notamment WDR5 et MLL, au niveau du complexe *HOXA*. Cela induit la méthylation H3K4me3 de cette région, et permet de la maintenir transcriptionnellement active (Wang et al. 2011). La perte de fonction de *HOTTIP* dans les bourgeons des membres induit la diminution de l'expression des gènes *HoxA13*, *HoxA11* et *HoxA10*, et ce de manière d'autant plus drastique dans les zones distales des bourgeons. Cela suggère un rôle dans la régulation des gènes Hox au cours du développement des membres, en particulier de leurs extrémités (Wang et al. 2011).

Les microARNs (miRNA) sont des petits ARN simple brin, non-codants, d'une taille d'environ 22 nucléotides, s'associant avec les protéines Argonaute afin de permettre la dégradation spécifique d'ARN messagers, permettant de réguler l'activité de gènes par une répression au niveau post-transcriptionnel (Bartel 2018). Les miRNA constituent également des régulateurs importants des gènes Hox. Des travaux portant sur le miRNA *iab-8* ont également montré son implication dans le contrôle des gènes Hox chez la drosophile. *iab-8* s'exprime dans le système nerveux central du parasegment 13 depuis une région génomique située entre *abdA* et *AbdB*. Il réprime l'expression de *abdA*. *AbdB* est quant à lui actif dans le parasegment 13. Cela suggère que les miRNA comme *iab-8* pourraient jouer un rôle dans la prévalence postérieure (Gummalla et al. 2012 ; Yekta, Tabin, et Bartel 2008).

Les gènes Hox sont aussi parfois impliqués dans l'homéostasie et la fonction des tissus aux stades post-embryonnaires, voire au stade adulte (Procino et Cillo 2013). Le miRNA *iab-4* joue également un rôle de répression de *Ubx* dans les motoneurones NB2-3/lin15. Cela est nécessaire pour le contrôle du comportement larvaire consistant à retrouver une orientation normale lorsque les larves se retrouvent à l'envers (Picao-Osorio et al. 2015), mais aussi du même type de comportement chez l'adulte. Cela est très surprenant au vue de la forte différence en termes de constitution nerveuse et physique, et qui suggère un rôle des gènes Hox au niveau de fonctions physiologiques très diverses même une fois le développement de l'organisme terminé (Issa et al. 2019). Les gènes Hox sont également impliqués dans la régulation de l'accumulation de graisse dans les tissus adipeux chez l'homme (Karastergiou et

al. 2013). *HOXC8* est notamment impliqué dans le développement du tissu adipeux brun. Dans ce contexte, le miRNA *miR196a* est impliqué dans la répression de *HOXC8* (Divoux et al. 2017).

La régulation des gènes Hox par les miRNA dépend de la sensibilité des ARN messagers (ARNm) aux différents miRNA susceptibles de conduire à leur dégradation. En effet les miRNA se lient aux ARNm à dégrader au niveau de sites spécifiques, dont la présence peut varier en fonction des différents transcrits produits à partir d'un même gène Hox. Durant le développement embryonnaire de la drosophile, le gène *Ubx* produit des transcrits avec des 3'UTR variables selon les régions de l'embryon. Ces différents 3'UTR présentent différents jeux de sites de liaisons aux miRNA *iab-4* et *iab-8*, ce qui fait de chaque variant d'ARNm des cibles très différentes pour la régulation par ces miRNA, et permet une modulation fine de la stabilité des ARNm de *Ubx* selon le contexte développemental. Ce type de régulation a également été observé pour d'autres gènes Hox tels que *Antp*, *abdA* et *AbdB* (Thomsen et al. 2010). Le même mécanisme est conservé chez les vertébrés. Chez la souris, le miRNA *miR27* permet la délimitation stricte du domaine d'expression de *HoxA5* dans la moelle épinière. Sans ce mode de régulation, le domaine d'expression de *HoxA5* est bien plus nébuleux (Li et al. 2017). Tout cela montre l'importance de la régulation des gènes Hox par les ARN non-codants, pendant et après le développement embryonnaire.

2. Caractéristiques moléculaires des protéines Hox

Les protéines Hox sont des facteurs de transcription (FT) à homéodomaine (HD) appartenant à la classe ANTENNAPEDIA (ANTP). Les autres classes de protéines à HD (NK, LIM, TALE, PRD, POU et SIX) et la classe ANTP dérivent probablement d'un ensemble de FTs à homéodomaine déjà présent chez l'ancêtre commun hypothétique des métazoaires (Degnan et al. 2009). L'origine des protéines Hox est controversée (Ramos, Barker, et Ferrier 2012). Il était considéré que les gènes Hox proviennent à l'origine d'un gène Proto-Hox jusqu'à la découverte de gènes ParaHox chez une espèce d'éponge calcaire (Srivastava et al. 2010 ; Fortunato et al. 2014). Des analyses récentes viennent cependant contredire cette conclusion par le fait que le ParaHox identifié chez l'éponge seraient en réalité un gène codant pour une protéine à HD de la classe NK (Pastrana, DeBiase, et Ryan 2019). Cela implique que les gènes Hox et ParaHox seraient apparus après la divergence entre les embranchement des Porifera (les éponges), et du reste des animaux incluant les ancêtres communs des bilatériens et des cnidaires (Garcia-Fernandez 2005 ; Merabet et Galliot 2015).

Les protéines Hox présentent des caractéristiques moléculaires qui les distinguent des autres membres de la famille des protéines à HD de la classe ANTP (Gehring, Affolter, et Bürglin 1994 ; Merabet et al. 2010). Les propriétés moléculaires des protéines Hox des différents groupes paralogues permettent également de les distinguer, et ce à travers les divers embranchements des animaux (Merabet et al. 2009). Ces caractéristiques sont retrouvées au niveau et en dehors de l'HD, influençant les propriétés de liaison à l'ADN ainsi que les propriétés d'interactions protéine-protéine. Cette partie propose de décrire les principales caractéristiques intra-moléculaires des protéines Hox.

2.1 Caractéristiques intra-moléculaires des protéines Hox.

2.1.1 L'homéodomaine (HD)

L'HD des protéines Hox est un domaine de 60 acides aminés (aas) responsable de la liaison à l'ADN, qui partage une forte homologie avec les HD des autres membres de la classe ANTP (Merabet et al. 2010). Les acides aminés conservés sont alors des aas hydrophobes qui participent au repliement correct, et des aas basiques impliqués dans la liaison à l'ADN, ce qui signifie que des protéines Hox et non-Hox partagent un mode de liaison à l'ADN générique. Tous les HD contiennent un bras N-terminal (N-ter) flexible suivi de trois hélices alpha. Les hélices 2 et 3 forment un motif hélice-boucle-hélice similaire à des motifs de liaison à l'ADN ancestraux tels que ceux retrouvés dans la gamma-transposase ou la recombinaison Hin chez les bactéries (Feng, Johnson, et Dickerson 1994). Les aas directement en contact avec l'ADN sont localisés dans l'hélice 3, nommée « hélice de reconnaissance », et dans le bras flexible N-ter. Ces deux parties de l'homéodomaine s'insèrent respectivement dans le sillon majeur et le sillon mineur de l'ADN (Merabet et al. 2009 ; Rezsö et al. 2015) (**Figure 19A et B**).

L'alignement des protéines Hox issues de protostomes et de deutérostomes montre que tous les groupes paralogues sauf deux présentent des aas paralogues-spécifiques dans leurs HD,

pour la plupart localisés dans le bras N-ter (Merabet et al. 2009 ; Thomas-Chollier et al. 2010) (**Figure 19C**) Ces positions sont directement en contact de l'ADN tout en restant accessibles pour des interactions protéine-protéine. Cela est cohérent avec le rôle du bras N-ter, décrit pour être impliqué dans la spécificité des protéines Hox, comme le montrent de nombreuses études basées sur des protéines chimères. Par exemple, modifier les quatre résidus du bras N-ter de Scr qui le différencie de celui de Antp est suffisant pour convertir fonctionnellement Scr en Antp (Zeng et al. 1993) et inversement (Furukubo-Tokunaga, Flister, et Gehring 1993). En effet, certains aas du bras N-ter de Scr peuvent reconnaître une structure spécifique du sillon mineur de l'ADN, ce qui confère à Scr un mode de reconnaissance de l'ADN spécifique (Joshi et al. 2007 ; Zeiske et al. 2018).

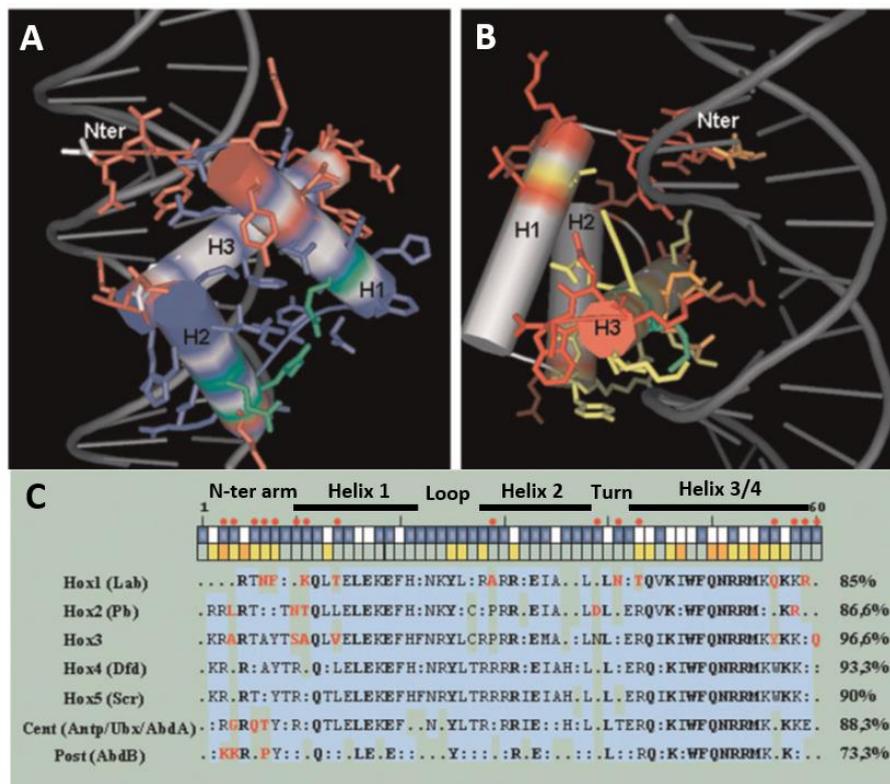


Figure 19 : Structure et signatures paralogues-spécifiques de l'homéodomaine des protéines Hox. A-B : Structure de l'homéodomaine (HD) de la protéine Hox Antp lié à l'ADN (en gris). L'homéodomaine de Antp commence à la position 5 du bras N-terminal. Les trois hélices sont indiquées (H1-3). Les radicaux des acides aminés (AA) spécifiques des HD de la sous-classe des Hox apparaissent en vert, ceux des AA paralogues-spécifiques apparaissent en rouge, ceux des AA accessibles pour les interactions protéine-protéine apparaissent en bleu, ceux des AA interagissant avec les bases de l'ADN apparaissent en orange, et ceux des AA interagissant avec le squelette sucre-phosphate de l'ADN apparaissent en jaune. C : comparaison des séquences consensus des HD de protéines Hox issues différentes espèces de deutérostomes (amphioxus et humain), d'ectysozoaires (tribolium, ou daphnie pour le groupe paralogues 3) pour chaque groupe paralogues. Les cnidaires sont exclus de l'analyse car ils ne possèdent pas des gènes Hox de chaque groupe paralogues. Le nombre à droite indiquent le taux de conservation au sein de chaque groupe paralogues. Pour chaque groupe paralogues, le gène correspondant chez la drosophile est indiqué entre parenthèses. Le groupe central correspond aux paralogues 6, 7 et 8. Le groupe postérieur correspond aux paralogues 9 et 10. L'absence de conservation est indiquée par un point. Deux points indiquent une position présentant des changements conservés. Les lettres indiquent des résidus invariants au sein du groupe paralogues. Les résidus invariants à travers tous les groupes paralogues sont indiqués en gras. Les résidus spécifiques d'un groupe paralogues sont indiqués en rouge, on observe qu'ils sont particulièrement fréquents au niveau du bras N-terminal. Adapté à partir de Merabet et al. 2009.

2.1.2 Le motif Hexapeptide (HX).

En dehors de l'homéodomaine, la principale caractéristique moléculaire des protéines Hox est la présence d'un petit motif nommé « Hexapeptide » (HX) ou encore PBC-Interaction Domain (PID) (Rieden et al. 2004) (**Figure 20A**). Ce motif est toujours en amont de l'homéodomaine, à une distance variable de l'HD, et contient un motif de quatre aas (YPWM) dans la plupart des groupes paralogues à l'exception des plus postérieurs qui n'en conservent qu'un résidu tryptophane. Chez les groupes paralogues 1 et 2, deux résidus différents sont spécifiquement conservés à la première position de l'HX (Merabet et al. 2009). La simple analyse de la séquence peptidique du motif HX permet donc la discrimination des paralogues 1 et 2, des paralogues plus centraux, et des paralogues postérieurs (**Figure 20B**).

Le motif HX a été largement étudié pour son rôle de plateforme de recrutement pour les cofacteurs de la famille PBC. Les protéines PBC sont des FT à HD appartenant à la famille « Three Amino-Acide Loop » (TALE) (Bürglin 1997 ; Mukherjee et Bürglin 2007). Le tryptophane du motif HX peut se glisser dans la poche hydrophobe au sein du motif TALE, stabilisant l'interaction entre les protéines Hox et TALE (Mann et Chan 1996 ; Passner et al. 1999 ; LaRonde-LeBlanc et Wolberger 2003 ; Joshi et al. 2007). Il s'agit d'un rôle conservé chez les cnidaires et les bilatériens. Cependant, ce rôle essentiel du motif HX est dispensable en présence d'un autre cofacteur des protéines Hox de la famille TALE, la protéine MEIS. MEIS permet l'interaction PBC/Hox par d'autres interfaces que le motif HX, que ce soit chez la drosophile (Hudry et al. 2012) ou l'homme (Dard et al. 2018), ce qui confère une certaine flexibilité aux complexes Hox/cofacteurs, et joue donc sur leur spécificité. MEIS est également essentiel pour la translocation nucléaire de PBC, sans quoi PBC n'est pas disponible dans le noyau pour interagir avec les protéines Hox. Cette fonction est conservée au point que la protéine MEIS1 murine peut sauver la translocation nucléaire de la protéine PBC Extradenticle chez la drosophile en l'absence de la protéine MEIS Homothorax endogène (Rieckhof et al. 1997).

Des travaux chez la drosophile montrent par ailleurs que le motif HX est utilisé différemment selon la protéine Hox considérée, permettant l'interaction avec des cofacteurs spécifiques, mais aussi inhibant l'interaction avec des partenaires de manière tout aussi spécifique. L'influence positive ou négative du motif HX sur une interaction donnée entre une protéine Hox et un cofacteur semble dépendante d'autres motifs dans l'environnement de l'HX au niveau de la protéine Hox. Le motif HX est donc très conservé entre les différentes protéines Hox, mais utilisé de manière spécifique pour promouvoir ou inhiber leur potentiel d'interaction avec différents partenaires (Baëza et al. 2015).

Des aas paralogues-spécifiques sont aussi retrouvés au sein de la région qui connecte l'Hexapeptide et l'HD, une région appelée « Linker Region » (Merabet et al. 2009). Bien que la région linker soit de taille très variable, on observe une tendance générale de raccourcissement graduel entre les groupes paralogues antérieurs et les groupes postérieurs (Rieden et al. 2004 ; Merabet et al. 2009) (**Figure 20B**). La taille de cette région influence

également le mode d'interaction entre les protéines Hox et le cofacteur PBC, ce qui induit des effets régulateurs distincts chez la drosophile (Saadaoui et al. 2011). Une région linker courte est un déterminant essentiel de la préférence de liaison à l'ADN des protéines Hox postérieures associées au cofacteur PBC (LaRonde-LeBlanc et Wolberger 2003). Cette région établit un contact avec l'ADN lorsque les protéines Hox de drosophile (Joshi et al. 2007) ou de souris (LaRonde-LeBlanc et Wolberger 2003) interagissent avec PBC.

En dehors de la partie C-terminale adjacente à l'HD principalement dans les groupes paralogues 1, 2 et 4, le reste des séquences des protéines Hox ne semble pas présenter de résidus spécifiques de groupes paralogues. Cela suggère que le motif HX, l'HD et la région linker, avec d'autres motifs comme UbdA, sont les sites principalement responsables des caractéristiques moléculaires paralogue-spécifiques.

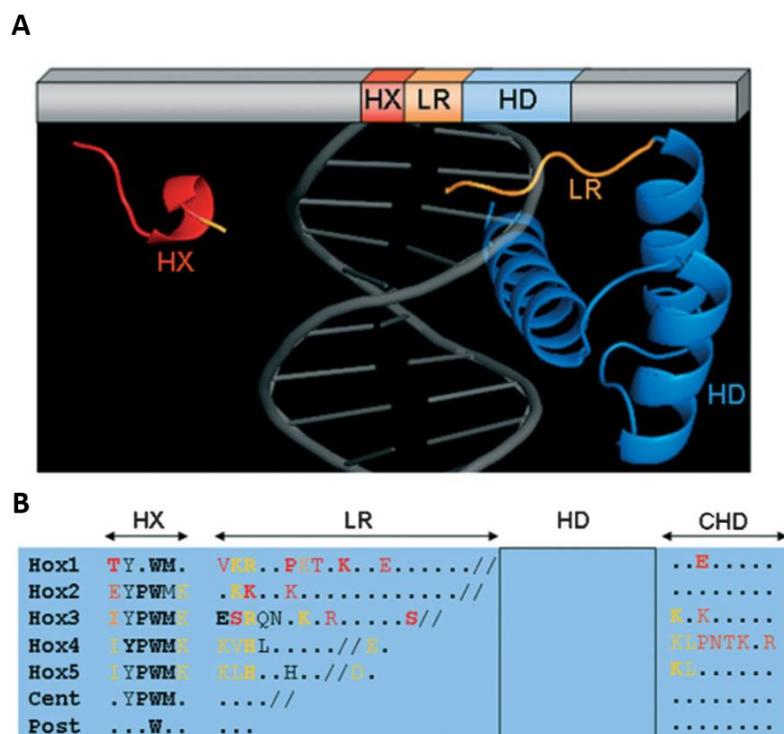


Figure 20 : Caractéristiques uniques des régions flanquant l'homéodomaine des protéines Hox. A : Représentation schématique d'une protéine Hox avec une représentation structurale du motif Hexapeptide (HX, en rouge), de la région linker (LR, incomplète, en orange) et de l'homéodomaine (HD, en bleu) à partir de la structure de HoxB1 de souris obtenue par cristallographie. **B :** Caractéristiques uniques des régions flanquant l'HD. CHD correspond aux séquences adjacentes et C-terminales bordant l'homéodomaine. Pour chaque groupe paralogue, les alignements ont été obtenus à partir des mêmes séquences que pour la figure 14. Les lettres indiquent les résidus conservés au sein d'un groupe paralogue, et ceux conservés à travers tous les groupes paralogues sont en gras. Les résidus uniques, ou communs à plusieurs paralogues sont indiqués respectivement en rouge et en orange. Les double barres obliques dans les régions linker indiquent des variations de longueur au sein d'un même groupe paralogue. Adapté à partir de Merabet et al. 2009.

2.1.3 Les « Short Linear Motifs » (SLiMs)

En dehors des motifs mentionnés précédemment, il est possible de prédire la présence chez les protéines Hox d'autres motifs peptidiques courts, appelés « Short Linear Motifs » (SLiMs) ou Eucaryotic Linear Motifs (ELMs), constitués de généralement 3 à 11 aas (Mooney et al. 2011 ; Davey et al. 2012 ; Van Roey et al. 2013). À la différence des grands domaines globulaires, les SLiMs permettent des interactions faibles, transitoires, dynamiques, et sont moins conservés. La nature flexible des SLiMs leur permet d'établir des contacts très différents. Les SLiMs peuvent être classifiés en 4 types différents selon leur fonction ; site ligand (médie des interactions protéine-protéine), site de modification post-traductionnelle, site de clivage protéolytique, ou d'adressage sub-cellulaire (Davey et al. 2012). L'analyse *in silico* des protéines Hox de drosophile, souris et poulet montre que les SLiMs ont généralement une distribution uniforme (Rinaldi, Saurin, et Graba 2018) (**Figure 21**). L'analyse des SLiMs d'une protéine Hox permet généralement de prédire le groupe paralogue auquel elle appartient, indépendamment de son espèce d'origine. Cela suggère que les SLiMs participent aux fonctions paralogue-spécifique des protéines Hox, potentiellement en permettant des interactions avec des partenaires qui seraient donc paralogue-spécifiques (Rinaldi et al. 2018).

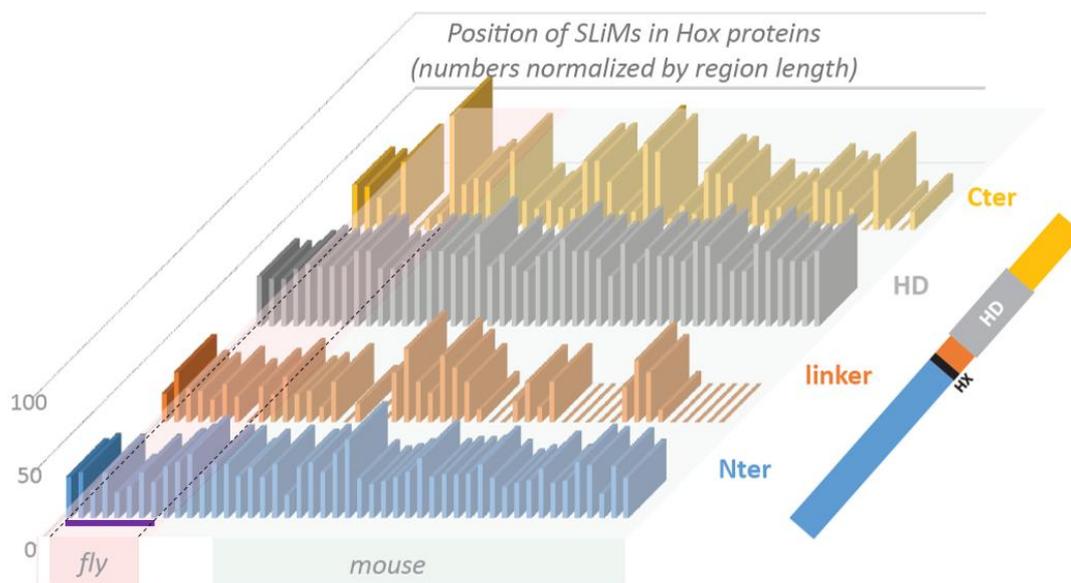


Figure 21 : Répartition des SLiMs à travers les protéines Hox de drosophile et de souris. Le nombre de SLiMs est normalisé selon le nombre de résidus au sein de chaque région des différentes protéines Hox de la drosophile et de la souris : région N-terminale (Nter), région linker, Homéodomaine (HD) et C-terminale (Cter), à l'exception de certaines protéines Hox postérieures chez lesquelles il est impossible de définir une région linker en raison de l'absence d'authentique motif HX. Adapté à partir de Rinaldi et al. 2018.

A l'exception du motif HX très conservé, peu de SLiMs des protéines Hox ont été étudiés fonctionnellement. Les SLiMs sont évolutivement conservés à des degrés différents. Ils sont parfois retrouvés au sein de différents groupes paralogues chez les protostomes et les deutérostomes, comme le motif SSYF (Merabet et al. 2009), ou au sein d'un petit nombre de paralogues uniquement chez un groupe d'animaux plus restreints, comme le motif UbdA retrouvé au sein des protéines Ubx et AbdA des protostomes (Merabet et al. 2009 ; Rinaldi et al. 2018). Certains SLiMs sont retrouvés plus spécifiquement au niveau d'un unique groupe paralogue, conservé sur des distances évolutives plus courtes, comme le motif TDWM présent uniquement au niveau des protéines AbdA des insectes (Merabet et al. 2011). Cependant, même un motif très conservé comme le motif HX peut ponctuellement être perdu chez certains espèces. C'est le cas au niveau de la protéine Hox centrale Fushi-tarazu (Ftz) chez les arthropodes. Chez les lignages d'insectes apparus récemment comme les diptères, Ftz a perdu son potentiel homéotique, ce qui coïncide avec la perte du motif HX, induisant la perte de la capacité à interagir avec le cofacteur PBC. Ftz est par ailleurs spécialisé dans le processus de segmentation. Les orthologues de Ftz chez le coléoptère *Tribolium castaneum* (Tc-Ftz) et la sauterelle *Schistocerca gregaria* (Sc-Ftz) ont en revanche conservé le motif HX, avec des fonctions homéotiques ainsi qu'une fonction au cours de la segmentation. L'équilibre entre les fonctions homéotiques et de segmentation de ces 3 orthologues semble dépendre de la présence de deux motifs, le motif HX et le motif LXXLL. Le motif HX est présent chez Sc-Ftz et Tc-Ftz, tandis que le motif LXXLL est présent chez Tc-Ftz et Ftz de *Drosophila melanogaster* (Dm-Ftz). Cela est corrélé avec le fait que Sg-Ftz présente un potentiel de segmentation faible, Tc-Ftz un potentiel de segmentation modéré, et Dm-Ftz un potentiel de segmentation fort, tandis que seul Sg-Ftz et Tc-Ftz partagent une fonction homéotique (Löhr, Yussa, et Pick 2001). Cette simple corrélation est discutable au cours de l'évolution des arthropodes. Cependant cela illustre le fait que la variation dynamique de la présence de deux SLiMs au sein d'une protéine Hox constitue une plateforme moléculaire flexible permettant de faire varier la fonction d'une protéine Hox au cours de l'évolution (Merabet et Hudry 2011).

2.1.4 Régions intrinsèquement désordonnées

La présence de longues régions intrinsèquement désordonnées est une dernière caractéristique générale des protéines Hox (Merabet et Dard 2014). Ce type de région a été décrit pour promouvoir la diversité au sein de réseaux d'interactions entre protéines (Babu 2016). Cette influence sur les propriétés d'interaction passe en partie par le biais de SLiMs, fréquemment localisés au sein de régions désordonnées. Les régions désordonnées sont aussi souvent des cibles privilégiées de modifications post-traductionnelles comme des phosphorylations ou des acétylations, ou d'épissage alternatif, ce qui permet de diversifier les propriétés d'interactions en fonction des tissus ou encore des étapes du développement embryonnaire (Babu 2016). Le rôle des régions désordonnées des protéines Hox reste encore peu étudié. Les régions intrinsèquement désordonnées influencent les propriétés de liaison à

l'ADN de la protéine Hox Ultrabithorax (Ubx) chez la drosophile en jouant sur sa manière d'interagir avec ses partenaires de manière tissu-spécifique (Liu, Matthews, et Bondos 2008 ; Hsiao et al. 2014). Cela est notamment dû à des modifications post-traductionnelles, comme des phosphorylations tissu-spécifiques, bien décrites dans le cas de la protéine Ubx (Lopez et Hogness 1991).

2.1.5 Modifications post-traductionnelles des protéines Hox

La variabilité des fonctions des protéines Hox peut aussi s'expliquer par des modifications post-traductionnelles. Chez la drosophile, il existe en effet plusieurs phospho-isoformes de la protéine Ubx (Gavis et Hogness 1991). La phosphorylation de la protéines Antp inhibe sa capacité à interagir avec Exd sur l'ADN (Jaffe, Ryoo, et Mann 1997). La phosphorylation du bras N-ter de l'homéodomaine de Scr abolit également sa capacité de liaison à l'ADN, et représente donc une possibilité pour moduler l'activité de cette protéine (Berry et Gehring 2000). La phosphorylation des protéines Hox a été suggérée comme étant un moteur de l'évolution des membres chez les arthropodes. L'incapacité des orthologues de Ubx provenant de crustacés quant à la répression de *Dll* pourrait en effet résider dans une régulation de la phosphorylation (Ronshaugen, McGinnis, et McGinnis 2002). La polyADP-ribosylation de HoxB7 dans des cellules humaines provoque une diminution de son activité transcriptionnelle (Wu et al. 2012). La modification post-traductionnelle des protéines Hox est potentiellement un mécanisme important de modulation de l'activité des protéines Hox, qui reste cependant encore trop peu étudié (Rezsohazy et al. 2015 ; Draime et al. 2018).

2.2 Spécificité de liaison à l'ADN et rôle des cofacteur PBC

2.2.1 Des sites de liaison à l'ADN des protéines Hox monomériques aux sites de liaisons pour les dimères Hox-PBC

Comme décrit plus tôt, les protéines de la classe ANTP ont un HD très similaire. Les analyses *in vitro* de spécificité de la liaison à l'ADN des facteurs de transcription à HD de la drosophile comme de la souris, (Hox et non-Hox) ont montré une très faible variation, avec une préférence pour la reconnaissance d'une séquence TAAT. Seul les Hox postérieurs présentent une préférence pour la liaison à une séquence TTAT sensiblement différente (Noyes et al. 2008 ; Berger et al. 2008) (**Figure 22**). Cette faible spécificité de liaison à l'ADN contraste fortement avec les fonctions très spécifiques des protéines Hox *in vivo*. Cela suggère que les protéines Hox utilisent des partenaires afin de se lier spécifiquement à des cibles génomiques pertinentes.

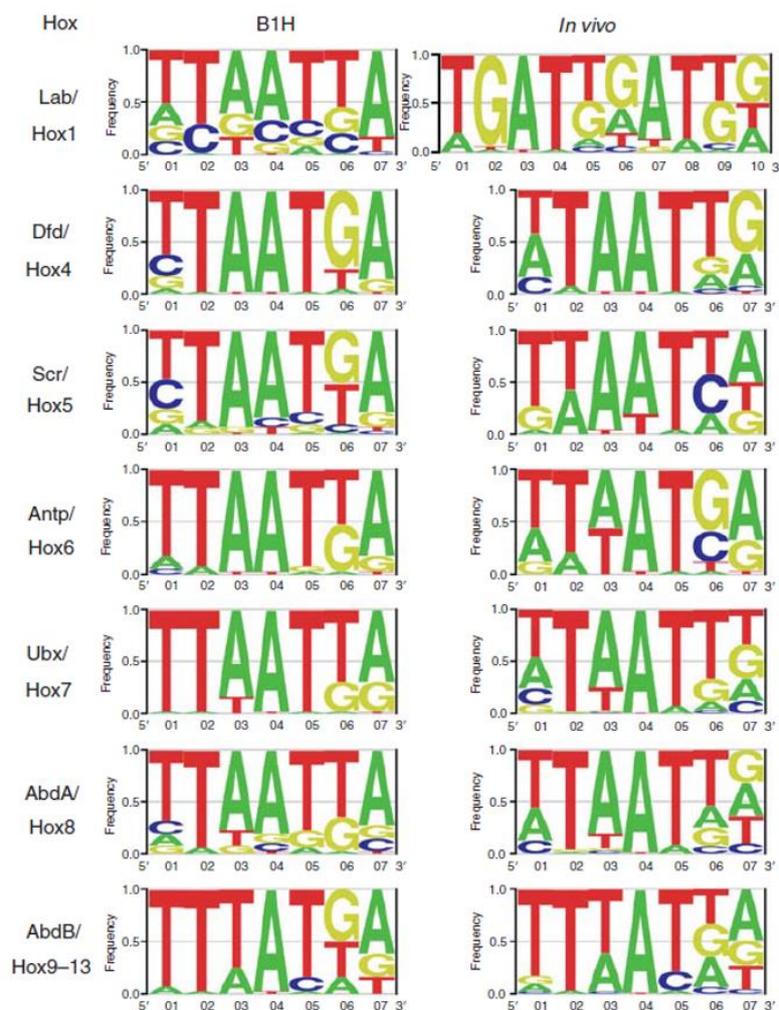


Figure 22 : Séquences nucléotidiques préférentiellement liées par les protéines Hox monomériques. Séquences consensus liées par les protéines Hox monomériques *in vitro* obtenues par une méthode de simple hybride en bactérie (B1H) à droite (Noyes et al. 2008) comparées avec les séquences liées *in vivo* au niveau d'enhancers cibles connus (à gauche). (Mann et al. 2009)

Cependant, jusqu'ici seul un type de cofacteur a été décrit pour interagir directement avec les protéines Hox et moduler leurs propriétés de liaison à l'ADN : les protéines PBC. Chez les vertébrés, on compte 4 représentants des protéines PBC (Pbx1-4), tandis que chez la drosophile, il n'existe qu'une protéine PBC : Extradenticle (Exd) (Longobardi, Torres, et Blasi 2014).

Les protéines PBC peuvent se lier et coopérer avec les protéines Hox afin de créer un hétérodimère Hox/PBC. Cet hétérodimère peut alors utiliser les HD des deux protéines afin de reconnaître des motifs nucléotidiques plus complexes. L'association des protéines Hox à un cofacteur PBC leur confère donc une plus grande spécificité (Mann et Chan 1996) (**Figure 23**). Les deux nucléotides centraux de la séquence reconnue par l'hétérodimère Hox-PBC, où se chevauchent les sites de liaison des protéines Hox et des PBC, peuvent varier selon la protéine Hox en présence, ce qui peut jouer sur la spécificité de liaison à l'ADN des différents dimères Hox/PBC (Chan et al. 1997 ; Ryoo et Mann 1999 ; Joshi, Sun, et Mann 2010).

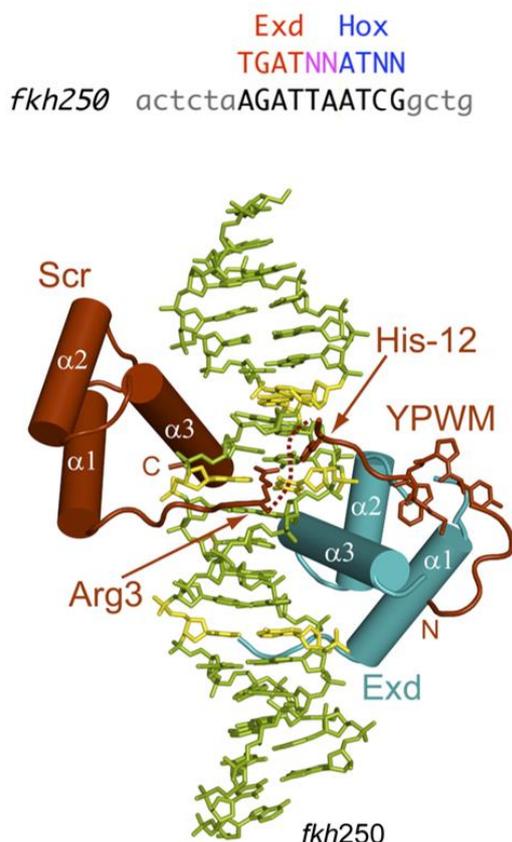


Figure 23 : Hétérodimère Hox/PBC liant l'ADN. Représentation des homéodomaines de la protéine Hox de drosophile *Sex combs reduced* (Scr, en brun) et du cofacteur PBC Extradenticle (Exd, en cyan) interagissant par le biais du motif HX (YPWM) en se liant à l'enhancer *fkh250*. On observe que les deux homéodomaines se lient aux faces opposées du double-brin d'ADN. Les résidus Arg3 et His-12, essentiels à la liaison de Scr au sein du sillon mineur, apparaissent en orange. On observe que la séquence nucléotidique reconnue par le dimère Scr/Exd (en gras et majuscule) au niveau de l'enhancer *fkh250* est plus complexe que les séquences reconnues par les monomères de protéines Hox. Adapté à partir de Joshi et al. 2007.

L'analyse à large échelle de complexes Hox-Exd de drosophile par une approche *in vitro* de SELEX-seq montre que le cofacteur PBC peut révéler une « spécificité latente » des protéines Hox, ce qui permet de classer dimères Hox/Exd en trois groupes de spécificité selon les motifs préférentiellement reconnus. On peut constater que cette classification constitue des groupes cohérents avec la colinéarité des gènes Hox (Slattery, Riley, et al. 2011). Dans le

prolongement de cette idée, une étude basée sur la cristallographie montre en effet que le cofacteur PBC permet aux résidus paralogues-spécifiques du bras N-terminal et de la région linker des protéines Hox de reconnaître des structures spécifiques au niveau du sillon mineur de l'ADN (Joshi et al. 2007). Cela montre que les dimères Hox-Exd ne reconnaissent pas seulement des motifs de séquences spécifiques, mais aussi des structures spécifiques de la forme de la double hélice d'ADN. Cela nous offre un nouvel angle d'étude permettant d'appréhender les mécanismes sous-jacents à la spécificité de liaison à l'ADN des facteurs de transcription (Rohs et al. 2009 ; Abe et al. 2015).

2.2.2 Site de liaison à l'ADN consensuel et non-consensuels pour la fixation des complexes Hox/Exd

Bien que les hétérodimères Hox/Exd montrent une forte préférence pour la liaison au niveau de séquences bien définies, il semble que la régulation de gènes cibles par les complexes Hox/PBC ne reposent pas toujours sur ce type de séquences pour lesquelles ils ont une forte affinité, dites « canoniques » ou « consensuelles ». Chez la drosophile, les séquences régulatrices du gène *shaven baby* (*svb*) utilisées par le complexe Hox/Exd ne correspondent pas aux séquences consensuelles décrites pour être liées avec une forte affinité par ces hétérodimères. Les séquences retrouvées dans les régions cis-régulatrices de *svb* ressemblent davantage à des sites de liaison de faible affinité pour les complexes Hox/Exd décrites par les approches de SELEX-seq (Slattery, Riley, et al. 2011). Dans ce contexte, l'utilisation de plusieurs séquences de liaison de faible affinité pour les complexes Hox/Exd est essentielle pour la régulation tissu spécifique et robuste de *svb* au cours du développement embryonnaire. En effet, ces séquences de faible affinité ne sont reconnues que par les complexes Ubx/Exd, et *svb* ne s'exprime de manière correcte que dans les territoires où Ubx est actif. En revanche, la mutation consistant à convertir ces sites de faible affinité en sites canonique de liaison des complexes Hox/Exd provoque une suractivation de *svb* dans les tissus où il s'exprime en temps normal, mais aussi une expression ectopique dans les tissus où d'autres gènes Hox sont actifs, car les autres complexes Hox/Exd reconnaissent et se lient à ces séquences de forte affinité (Crocker et al. 2015). Cela complexifie la vision que nous avons du mode de reconnaissance moléculaire de leurs cibles par les facteurs de transcriptions : leur spécificité *in vivo* semble pouvoir émerger de l'usage de sites de liaison de faible affinité plutôt que de sites de liaison canoniques de forte affinité (Crocker, Preger-Ben Noon, et Stern 2016 ; Zeiske et al. 2018 ; Kribelbauer et al. 2019) (**Figure 24**).

Le fait que les protéines Hox et Exd puissent utiliser différent mécanismes (dépendant ou non du motif HX) pour interagir leur confère une flexibilité pouvant probablement s'avérer nécessaire lorsqu'il s'agit de se lier à des motifs de faible affinité. La faible capacité de liaison des protéines Hox à des enhancers composés de sites de faible affinité nécessite que ces FT soient présents en forte concentration pour déclencher une activation transcriptionnelle. À l'inverse, les enhancers contenant des sites de forte affinité ne nécessitent que des

concentrations faibles de protéines Hox pour être activés (Crocker et al. 2015 ; Tsai et al. 2017). La présence de cofacteurs tels que PBC peut permettre de stabiliser la liaison des protéines Hox à des enhanceurs composés de sites de faible affinité. Ces cofacteurs peuvent être enrichis au niveau de tels enhanceurs, formant des micro-environnements favorisant l'activation par les protéines Hox (Tsai et al. 2017). Cette forte concentration locale permet de compenser la faiblesse de la liaison à l'ADN par la fréquence des événements de liaison. Ce type de sites permet paradoxalement la robustesse de l'activité de certains enhanceurs développementaux. En effet, les enhanceurs composés de multiples sites de faible affinité organisés de manière optimale selon une « syntaxe » (espacement et orientation des différents sites de faible affinité) permettant leur liaison suffisamment fréquente au sein de micro-environnements où les FT sont suffisamment concentrés (Farley et al. 2016) tolèrent bien le stress environnemental ou la délétion de sites individuels (Tsai, Alves, et Crocker 2019). De plus, la fonction de ce types d'enhancers ne requiert pas la conservation stricte de leur séquence : les mutations ponctuelles n'affectent que peu leur fonction du fait de la redondance des nombreux sites de faible affinité, ce qui les rend très permissifs à l'apparition de nouveaux motifs au cours de l'évolution (Ramos et Barolo 2013 ; Crocker et al. 2016 ; Kurafeiski, Pinto, et Bornberg-Bauer 2019). Cette stratégie moléculaire basée sur des sites de faible affinité peut donc conférer robustesse et spécificité à des enhanceurs tout en permettant des innovations à travers l'accumulation de mutations, il s'agit sans doute d'une stratégie clé de la régulation génétique de nombreux processus développementaux ou évolutifs, comme ceux impliquant les protéines Hox.



Figure 24 : Importance des sites de faible affinité lors de la régulation de *shavenbaby* (*svb*) par les protéines Hox. Embryons de drosophile de stade 15 marqués par des sondes fluorescentes spécifiques de l'ARNm *svb*. Le gène *svb*, maître du développement des trichomes, est activé par Ubx dans l'embryon sauvage (WT). Pour cela, Ubx se lie à de nombreux sites de faible affinité au niveau d'éléments cis-régulateurs de *svb*. Remplacer ces sites de faible affinité par des sites de forte affinité induit une plus forte expression de *svb* là où Ubx est présent, mais aussi l'activation ectopique de *svb* par d'autres protéines Hox au niveau de segments plus antérieurs. Adapté à partir de Crocker, Preger-Ben Noon, et Stern 2016.

L'utilisation de divers modes d'interactions entre les protéines Hox et PBC plus flexibles et dynamiques que celui passant par l'utilisation du motif HX, comme par exemple en utilisant le motif UbdA chez les protostomes, permet donc de concevoir d'autres moyens pour les protéines Hox de produire de la spécificité en utilisant un cofacteur général (Ortiz-Lombardia et al. 2017). D'autres cofacteurs que PBC peuvent aussi entrer en jeu et diversifier encore les interactions possibles entre les protéines Hox et l'ADN *in vivo*, conférant aux protéines Hox une très grande versatilité moléculaire (Carnesecci et al. 2020).

2.3 Versatilité moléculaire : les interactions entre protéines Hox et leurs cofacteurs

2.3.1 Versatilité des interactions avec les cofacteurs TALE

Dans le noyau des cellules, l'interaction entre les protéines Hox et le cofacteur PBC requiert la contribution d'un autre partenaire appartenant également aux protéines à homéodomaine de la famille TALE : les protéines MEIS (Bürglin 1998). Chez les vertébrés, il existe trois représentants de protéines MEIS (MEIS1-3) tandis qu'il n'y en a qu'un seul chez la drosophile : Homothorax (Hth). L'interaction entre les protéines MEIS et PBC a lieu entre deux domaines très conservés localisés au niveau de la partie N-terminale des deux partenaires (Mann et Affolter 1998 ; Longobardi et al. 2014). Cette interaction est essentielle à la fonction des protéines PBC puisque la translocation de PBC du cytoplasme vers le noyau nécessite la dimérisation avec MEIS. L'absence de MEIS provoque donc des phénotypes homéotiques dus à l'absence de PBC jouant ainsi le rôle de cofacteur générique des protéines Hox (Rieckhof et al. 1997 ; Jaw et al. 2000 ; Stevens et Mann 2007). L'interaction entre les protéines MEIS et les protéines Hox en général (Williams, Williams, et Innis 2005), notamment avec les protéines Hox postérieures de manière dépendante de la liaison avec l'ADN (Shen et al. 1997) ont été décrites. Cependant, le rôle de MEIS dans la fonction moléculaire des protéines Hox a été moins étudié que celui de PBC. Les sites de liaison à l'ADN reconnus par les différents types de complexes formés par les protéines Hox/PBC/MEIS (Hox/PBX ; Hox/MEIS ; HOX/PBC/MEIS) sont enrichis au niveau de différents gènes cibles dans l'embryon de souris, ce qui suggère que la diversité des complexes Hox/TALE peut influencer la régulation transcriptionnelle par les protéines Hox (Penkov et al. 2013). De même, la présence de protéines Hox semble altérer la liaison à l'ADN de MEIS lors de processus développementaux spécifiques au cours de l'embryogenèse chez la souris, ce qui suggère que les protéines Hox et MEIS modifient mutuellement leur capacité de liaison à l'ADN *in vivo* (Amin et al. 2015). De plus, la présence des cofacteurs PBC et MEIS semble promouvoir la capacité des protéines Hox à se lier à des régions de la chromatine peu accessibles, en entrant en compétition avec les nucléosomes. Or, c'est au niveau des régions peu accessibles de la chromatine que l'on trouve le plus de gènes cibles paralogues-spécifiques des protéines Hox, ce qui montre l'importance des cofacteurs TALE pour la régulation des gènes cibles spécifiques des protéines Hox (Porcelli et al. 2019).

Le cofacteur MEIS semble pouvoir moduler les contacts moléculaires entre les protéines Hox et PBC, ce qui a d'abord été suggéré par le fait que des protéines Hox et PBC puissent interagir *in vivo* malgré l'absence du motif HX (Galant, Walsh, et Carroll 2002 ; Merabet et al. 2003). Des travaux ont ensuite montré qu'un mode d'interaction Hox/PBC indépendant du motif HX pouvait exister entre plusieurs protéines Hox de drosophile et de souris et le cofacteur PBC. Ce mode particulier d'interaction était dépendant de la présence de Meis1 (Hudry et al. 2012). Un mode HX-indépendant de formation des complexes Hox/PBC/MEIS a aussi été révélé avec des protéines de cnidaires et il a été proposé que des modes multiples d'interactions entre

protéines Hox et TALE puissent avoir servi de support moléculaire pour la diversification fonctionnelle des protéines Hox le long des axes longitudinaux des embryons (Hudry et al. 2014 ; Merabet et Galliot 2015). Ce mécanisme d'interaction Hox/PBC indépendant de HX mais dépendant de MEIS a également été décrit chez les protéines Hox humaines de tous les groupes paralogues à l'exception des groupes 1 et 2 (Dard et al. 2018). Bien que peu de motifs alternatifs d'interaction avec PBC aient été identifiés chez les protéines Hox de la drosophile hormis les motifs UbdA (Merabet et al. 2007 ; Foos et al. 2015) et TDWM (Hudry et al. 2012), l'analyse détaillée de trois différents complexes Hox/PBX/MEIS humains dans différents contextes cellulaires au niveau de différentes séquences nucléotidiques cibles (de faible ou forte affinité) montre une grande variabilité quant aux modes d'assemblages possibles entre les protéines Hox, PBC et MEIS (Dard et al. 2018 ; Dard et al. 2019). Certaines protéines Hox humaines peuvent en effet utiliser des motifs plus ou moins conservés au cours de l'évolution, de manière redondante ou opposée au motif HX pour s'associer aux cofacteurs PBC et MEIS. Ces moyens d'interactions alternatifs peuvent varier selon les protéines Hox, selon la séquence nucléotidique cible et selon le contexte cellulaire (**Figure 25**).

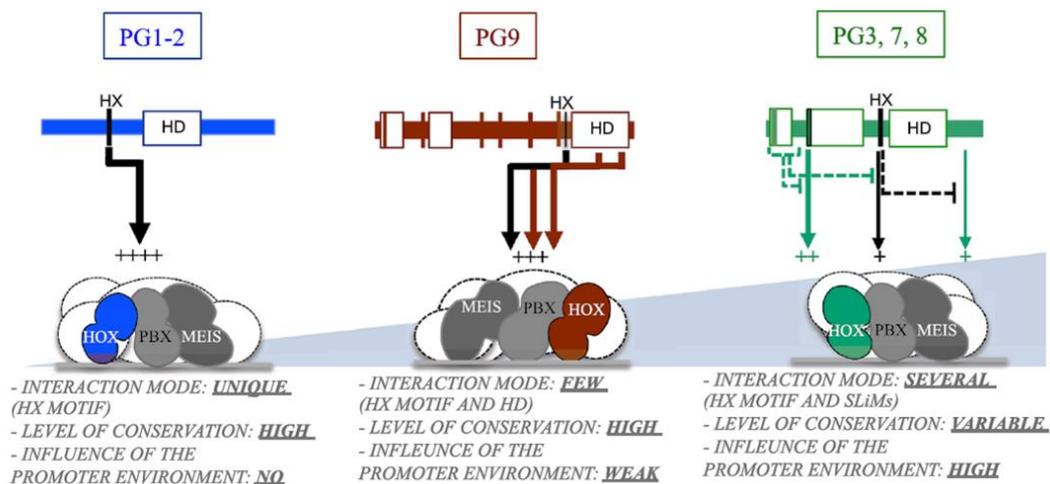


Figure 25 : Les protéines Hox de différents groupes paralogues utilisent des mécanismes moléculaires variables pour interagir avec les cofacteurs TALE. Un exemple représentatif de différentes situations est donné pour différents cas (HOXA1, HOXA9 et HOXA7). Le gradient bleu clair illustre le nombre de modalités d'interactions possibles avec les cofacteurs TALE. HOXA1 utilise uniquement un mode d'interaction dépendant du motif HX. HOXA9 utilise le motif HX et deux résidus paralogue-spécifique de son homéodomaine. HOXA7 utilise différentes combinaisons de motifs de liaison aux cofacteurs TALE ainsi que le motif HX, de manière dépendante de l'environnement protéique et de l'ADN. L'importance relative de chaque interface d'interaction avec les cofacteurs TALE est symbolisée par un nombre de « + » ainsi que par l'épaisseur des flèches. (Dard et al. 2019)

Une étude récente basée sur une approche *in vitro* de SELEX-seq combinée à une analyse *in vivo* interrogeant l'affinité à l'ADN des différents complexes Hox/TALE présents chez la drosophile supporte ces observations. Chez la drosophile, les complexes Hox/TALE peuvent se constituer entre une protéine Hox, le cofacteur Exd, et l'un des deux variants de la protéine

MEIS Hth ; un isoforme possédant un homéodomaine (Hth « full length » ou Hth^{FL}) et un isoforme sans domaine de liaison à l'ADN (Hth « Homothorax-Meis domain » ou Hth^{HM}). Les différents complexes possibles avec la protéine Dfd et les cofacteurs TALE (Ubx/Exd/Hth^{FL} ; Ubx/Exd/Hth^{HM} ; Exd/Hth^{FL} et le dimère Hth^{FL}/Hth^{FL}) présentent des propriétés de liaison à l'ADN très différentes (**Figure 26**). Ces propriétés sont basées sur des différences de la capacité à reconnaître des structures étroites au niveau des sillons mineurs de l'ADN. Cette reconnaissance de structures étroites fait entrer en jeu des régions des homéodomaines jusqu'alors peu décrites pour influencer la liaison à l'ADN des protéines Hox, interagissant avec les nucléotides jusqu'alors considérés comme impliqués dans le simple espacement des sites de liaison canoniques pour les protéines Hox et PBC. Cette variabilité de préférence de liaison à l'ADN des différents complexes permet à chacun de ces complexes de réguler des gènes impliqués dans des processus biologiques différents (Kribelbauer et al. 2020).

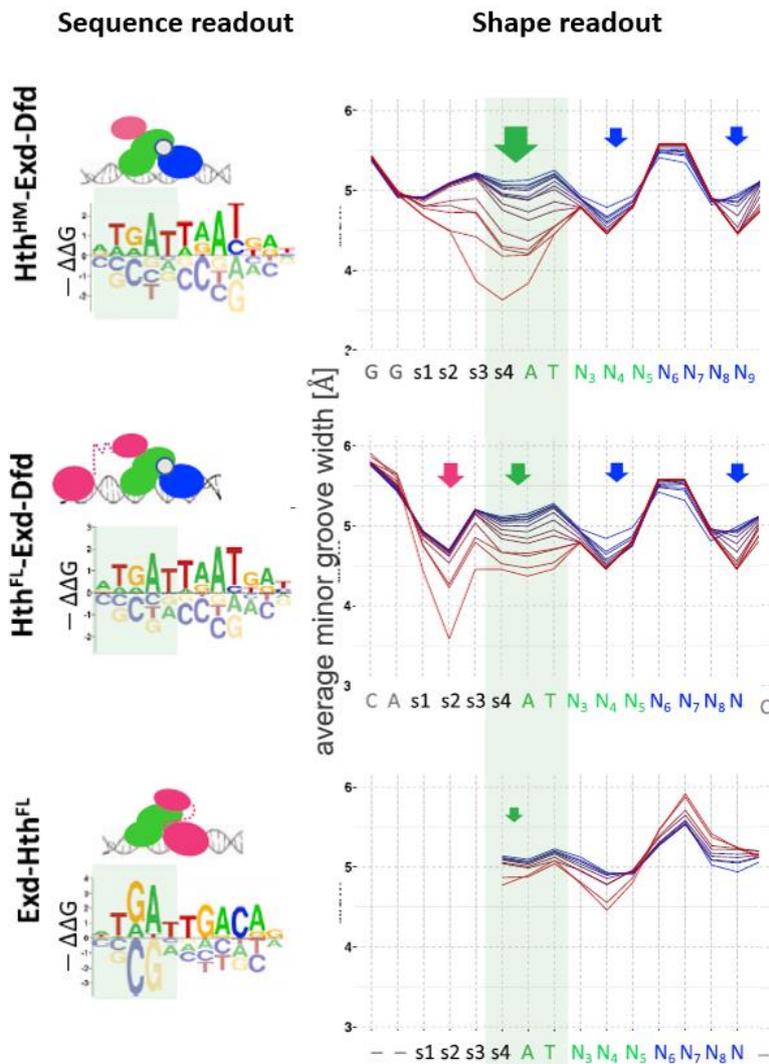


Figure 26 : Les différents complexes Hox/TALE présentent des propriétés de liaison à l'ADN très différentes. Des données de SELEX-seq permettent de présenter les séquences préférentiellement liées par différents complexes Hox/TALE (Hth^{HM}/Exd/Dfd ; Hth^{FL}/Exd/Dfd ; Hth^{FL}/Exd). L'analyse par SELEX-seq permet également de révéler des différences d'affinité vis-à-vis de séquences nucléotidiques présentant un sillon mineur étroit. Adapté à partir de Kribelbauer et al. 2020.

Les travaux cités précédemment montrent ainsi que les complexes Hox/TALE peuvent s'associer selon des mécanismes moléculaires très différents, influencés par le type d'isoforme de MEIS, et permettant de reconnaître des sites atypiques et très différents les uns des autres. *In fine*, cette complexité moléculaire basée sur une même catégorie de cofacteurs peut servir de socle pour la spécificité et la diversité des activités transcriptionnelles des complexes Hox/TALE *in vivo* (Merabet et Hudry 2013) (Merabet et Mann 2016).

De plus, des expériences en cellule de drosophile montrent qu'en absence de cofacteurs TALE, les protéines Hox Ubx et AbdA se lient à l'ADN principalement au niveau de zones accessibles de la chromatine. La présence des cofacteurs Exd et Hth leur permet en revanche de se lier au niveau de zones moins accessibles. Les cofacteurs TALE jouent alors le rôle de FT pionniers, entrant en compétition avec les nucléosomes pour permettre aux protéines Hox d'accéder à l'ADN. Il est intéressant de noter en revanche que la protéine Hox AbdB est quant à elle capable de lier des régions de la chromatine peu accessibles en absence de cofacteurs TALE, ce qui souligne encore l'importance des propriétés intrinsèques des protéines Hox quant aux séquences nucléotidiques auxquelles elles ont accès et peuvent se lier (Beh et al. 2016).

2.3.2 Interaction des protéines Hox avec différents types de facteurs de transcription

Les protéines TALE ne sont pas les seules protéines décrites pour interagir avec les protéines Hox. D'autres protéines à HD sont décrites comme cofacteurs des protéines Hox, par exemple les protéines Sloppy paired (Slp) et Engrailed (En) mentionnées précédemment, impliquées dans la répression de *Distal-less* (*Dll*) en interagissant respectivement avec Ubx et AbdA (Gebelein et al. 2004 ; Gebelein et Mann 2007).

D'autres types de FTs ont été décrits comme cofacteurs des protéines Hox. Les protéines à doigt de zinc C2H2 codées par les gènes *disconnected* (*disco*) et *disco-related* (*disco-r*) agissent de manière redondantes comme des cofacteurs pour les protéines Hox Dfd et Scr lors du développement des segments gnathaux (labiaux, mandibulaires et maxillaires) des larves de drosophiles (Mahaffey, Griswold, et Cao 2001). Un autre FT à doigt de zinc, Teashirt (Tsh), a également été décrit pour jouer un rôle de cofacteur des protéines Hox lors de la spécification de l'identité de segments du tronc (Fasano et al. 1991 ; Robertson et al. 2004), interagissant par exemple avec Scr pour réprimer le gène *modulo* dans le segment prothoracique (Taghli-Lamalle 2007).

Deformed epidermal autoregulatory factor 1 (Deaf1) est un FT à domaine SAND et MYND (Veraksa, Kennison, et McGinnis 2002) pouvant se lier à des éléments cis-régulateurs répondant à la protéine Hox Dfd, et coopérant avec celle-ci pour permettre leur activation (Gross et McGinnis 1996). Deaf1 a la capacité d'interagir avec les protéines Ubx et AbdA dans l'embryon de drosophile (Bischof et al. 2018). Ces observations montrent que les protéines Hox peuvent interagir avec différents types de FT pour accomplir leurs fonctions régulatrices.

Enfin, d'autres FTs peuvent moduler la capacité de liaison à l'ADN des protéines Hox sans même avoir à interagir directement avec celles-ci. Il s'agit des FT pionniers comme Gcm chez

la drosophile, rendant accessibles différentes régions de la chromatine de manière spécifique indépendamment des protéines Hox, à l'inverse des cofacteurs TALE qui coopèrent avec les Hox pour ouvrir la chromatine. En présence de Gcm, les protéines Dfd et Ubx peuvent se lier à des sites auparavant inaccessibles sur le génome (Porcelli et al. 2019).

2.3.3 Interactions avec des éléments de la machinerie transcriptionnelle

Les protéines Hox orchestrent des programmes développementaux spécifiques en régulant la transcription de gènes cibles dépendante de l'ARN polymérase II (ARNpol-II). Cette régulation peut passer par le recrutement direct de la machinerie transcriptionnelle. Par exemple, un crible par double-hybride en levure a montré une interaction entre Antp et la protéine Bric-a-brac interacting protein 2 (Bip2), une protéine homologue aux facteurs associés à TBP chez la drosophile (Gangloff et al. 2001). Cette interaction passe par le motif HX et est nécessaire pour le développement de structures dorsales de l'aile induites par Antp (Prince et al. 2008). Un des composants du complexe Mediator, Med-19, a été également décrit pour interagir avec l'homéodomaine de plusieurs protéines Hox chez la drosophile. Cette interaction a lieu entre le motif HX et un motif HIM de Med-19 très conservé chez un large spectre d'eucaryotes. Cette interaction est nécessaire pour l'activation d'un gène cible de Ubx, *CG13222*, dans le disque imaginal d'haltère (Boube et al. 2014) (**Figure 27**).

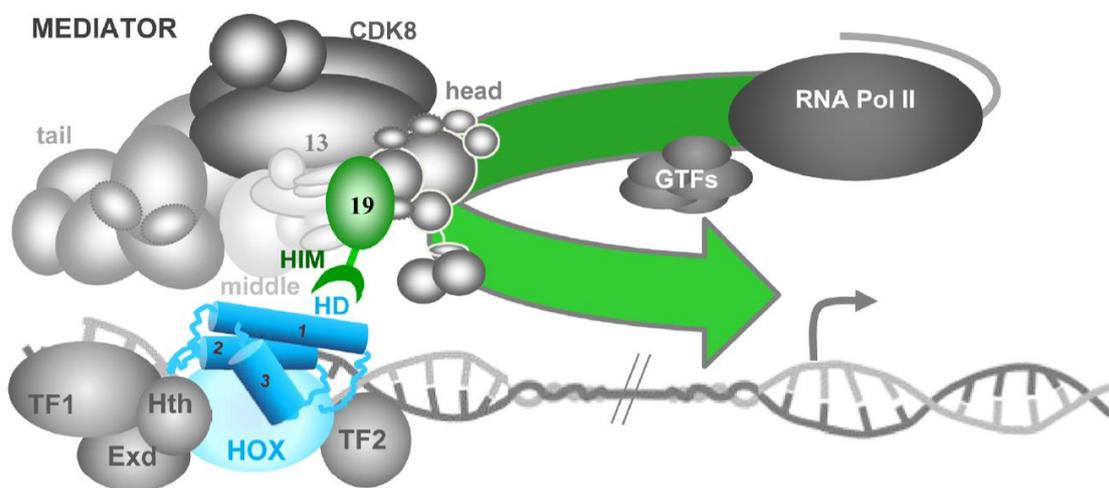


Figure 27 : Med-19 comme interface entre les protéines Hox et le complexe Mediator. Le complexe Mediator est composé de quatre modules : la tête (Head), la queue (Tail), le milieu (middle), et la cyclin-dépendant kinase 8 (CDK-8). Il interagit avec l'ARNpol-II via le module de la tête. Les protéines Hox se lient à l'ADN au niveau de séquences cis-régulatrices à l'aide de cofacteurs, ici les cofacteurs généraux Homothorax (Hth) et Extradenticle (Exd) ainsi que des FT spécifiques (TF2 et 2). L'homéodomaine des protéines Hox lié à l'ADN peut directement interagir avec Med19 (via son motif HIM), faisant le lien avec le complexe Mediator. Cela permet le recrutement de la machinerie transcriptionnelle de l'ARNpol-II au niveau de la séquence régulatrice cible des protéines Hox. (Boube et al. 2014).

Chez la drosophile, le facteur de pause transcriptionnelle M1BP permet le recrutement des protéines Ubx et AbdA aux régions promotrices de gènes cibles, ce qui induit un détachement des protéines du groupe Polycomb, permettant au promoteur de sortir de son état de pause transcriptionnelle (Zouaz et al. 2017).

La transcription via l'ARNpol-II et la maturation des ARN messagers (polyadénylation, épissage alternatif...) peuvent avoir lieu simultanément (Saldi et al. 2016). Cette étape de maturation dépend du recrutement spécifique de protéines régulatrices des ARN (Brown, Stoilov, et Xing 2012). Plusieurs cribles de partenaires des protéines Hox, chez la drosophile comme chez les vertébrés, ont déjà rapporté des interactions potentielles avec des protéines impliquées dans la maturation des ARN (Bondos, Tan, et Matthews 2006 ; Shestakova et al. 2017). C'est notamment le cas de la protéine Disconnected Interacting Protein 1 (DIP1), qui nécessite la présence de son domaine de liaison à l'ARN pour interagir avec Ubx. De plus, DIP1 est décrit pour interagir avec les phénotypes mutants de *Ubx* dans l'haltère (Bondos et al. 2004). Un autre exemple est la protéine Split Ends (Spen), impliquée dans la maturation des ARN et décrite pour provoquer des phénotypes homéotiques. Elle coopère avec Antp pour réprimer la formation de structures de la tête au niveau thoracique (Wiellette et al. 1999). Spen a également été décrite récemment pour interagir avec Ubx dans le mésoderme embryonnaire (Carnesecchi et al. 2020).

Cela suggère que la fonction des protéines Hox n'est pas restreinte à la régulation transcriptionnelle directe mais qu'elles peuvent moduler l'expression de leurs gènes cibles à différents niveaux, notamment lors de la maturation des ARN_m (revu par Carnesecchi, Pinto, et Lohmann 2018). La spécificité fonctionnelle des protéines Hox peut donc aussi émerger de la régulation d'événements en aval de la transcription.

2.3.4 Interactions entre des protéines liant/modifiant la chromatine

Les protéines Hox définissent l'identité des cellules au cours du développement embryonnaire, mais sont aussi décrites pour être impliquées dans la maintenance de cette identité cellulaire même au stade adulte (Leucht et al. 2008 ; Philippidou et Dasen 2013 ; Friedrich et al. 2016 ; Bradaschia-Correa et al. 2019). Les programmes orchestrés par les protéines Hox sont ainsi très stables au cours du développement. Dans ce contexte, certains partenaires connus des protéines Hox sont impliqués dans la régulation de l'état de la chromatine. Ce type de modificateurs de la chromatine peuvent aider les protéines Hox à trouver les séquences régulatrices de leurs gènes cibles afin de réguler leur expression, mais peuvent aussi servir à maintenir cette régulation au niveau chromatinien. Par exemple, chez la drosophile, Ubx parvient à réprimer de manière robuste les programmes génétiques spécifiant des identités cellulaires de lignages alternatifs en interagissant avec la protéine Pleiohomeotic (Pho), un facteur épigénétique des PcG. Ubx réprime l'expression des gènes impliqués dans la spécification des lignages alternatifs en recrutant Pho, ce qui stabilise les modifications épigénétiques répressives de ces gènes d'une manière lignage-dépendante (Domsch et al. 2019).

De nombreux travaux décrivent également le rôle de la protéine GAGA factor (GAF), codée par le gène *Trithorax-like (Trl)*, associée aux protéines Hox. GAF appartient aux TrxG (Farkas et al. 1994) pouvant participer au remodelage de la chromatine en facilitant la formation et la maintenance de régions pauvres en nucléosomes (Tsukiyama, Becker, et Wu 1994 ; Hagstrom et al. 1997). GAF peut aussi favoriser la pause transcriptionnelle en coopérant avec NEFL (Negative Elongation Factor), induisant la pause de l'ARNpol-II à de multiples loci chez la drosophile (J. Li et al. 2013). GAF présente donc une activité à la frontière entre les PcG et les TrxG, agissant soit comme un répresseur, soit comme un activateur transcriptionnel (Mishra et al. 2003 ; Bejarano et Busturia 2004 ; Lehmann 2004). Une approche par CHIP-seq dans les disques imaginaux d'haltères montre que GAF se lie fréquemment à l'ADN au niveau des mêmes gènes cibles que Ubx, ce qui suggère une collaboration entre ces deux protéines (Agrawal et al. 2011). D'autres études montrent également un rôle de certains homologues de GAF chez les vertébrés dans la mise en place de frontières épigénétiques, présentant notamment une fonction d'insulateur au niveau du complexe Hox-D chez la souris (Matharu et al. 2010).

Une autre protéine liée aux éléments insulateurs et interagissant avec les protéines Hox est la protéine à doigts de zinc CCCTC-binding factor (CTCF) (Filippova et al. 1996). Cette protéine très conservée est essentielle pour l'architecture globale du génome, en étant le médiateur de contacts intra- et inter-chromosomiques, et en créant des boucles chromosomiques au sein desquelles les contacts entre gènes et éléments cis-régulateurs sont favorisés (Phillips et Corces 2009 ; Kim, Yu, et Kaang 2015). Lors du développement des membres chez le poulet, le profil de liaison à l'ADN des protéines Hox postérieures (HoxA/D9, HoxA/D10, HoxD12 et HoxD13) révélé par CHIP-seq montre une forte affinité pour les sites également liés par CTCF, suggérant une coopération entre les protéines Hox et CTCF. Cette interaction a pu être confirmée par une technique de Proximity Ligation Assay (PLA), montrant effectivement une interaction entre CTCF et les protéines Hox. Cela montre que les protéines Hox peuvent agir avec CTCF et réguler l'architecture de la chromatine localement au niveau de gènes cibles spécifiques (Jerković et al. 2017).

High Mobility Group protein 1 (HMG1) est une protéine non-histone associée à la chromatine, conservée chez les eucaryotes chez qui elle joue un rôle de régulation de l'expression génétique (revu par Baxeavanis et Landsman 1995). Dans des cellules de souris, HMG1 interagit avec les protéines Hox en établissant un contact entre son domaine HMG et l'homéodomaine (HD). Cette interaction semble dépendante de la capacité de liaison à l'ADN des protéines Hox, puisqu'une mutation de l'HD de HoxD9 abolissant cette capacité rend également impossible l'interaction entre HoxD9 et HMG1. La fonction de HMG1 aussi requiert d'autres domaines que l'HD de HoxA9, puisqu'en présence de l'HD seul, HMG1 n'est pas capable d'activer la transcription. L'interaction entre HMG1 et les protéines Hox permet à HoxD9 de reconnaître un gène cible spécifique (*HCR*), qui n'est par exemple pas reconnu par HoxD8. En revanche, une protéine chimérique HoxD8 dont l'HD est remplacé par celui de HoxD9 va pouvoir interagir avec HMG1 et se lier à l'élément HCR. Les protéines comme HMG1 pourraient donc

être des cofacteurs facilitant la liaison des protéines Hox à leurs séquences nucléotidiques cibles de manière spécifique (Zappavigna et al. 1996).

2.3.5 Interactions entre les protéines Hox et des cofacteurs non-FT

Les protéines Hox sont principalement connues pour leur rôle dans la régulation transcriptionnelle de gènes, mais elles peuvent aussi contrôler d'autres processus tels que la traduction des ARN messagers ou la transduction de signaux. Pour cela, les protéines Hox doivent interagir avec des cofacteurs non-nucléaires.

HoxA9 peut réguler la traduction des ARN messagers au niveau de leur export du noyau et de leur traduction en interagissant avec la protéine eIF4E (eucaryotic translation Initiation Factor 4) via son HD, entrant en compétition avec des inhibiteurs de eIF4E. Une anomalie dans la fonction de HoxA9 peut alors favoriser l'apparition de leucémies d'une manière indépendante de la transcription. (Topisirovic et al. 2005). L'interaction entre HoxA13 et eIF4E dans des cellules d'hépatocarcinome caractérisées par la surexpression de HoxA13, pouvant provoquer une dérégulation post-transcriptionnelle d'ARNm impliqués dans la prolifération cellulaire, a également été observée (Cillo et al. 2011).

D'autre part, plusieurs études montrent des interactions entre des protéines Hox et des cofacteurs modulant leur fonction par le biais de modifications post-traductionnelles, comme la sérine/thréonine kinase CKII, capable de phosphoryler Antp et Scr chez la drosophile (Jaffe et al. 1997 ; Ronshaugen et al. 2002), ou encore PARP1 catalysant l'ADP-ribosylation de HOXB7 dans les cellules humaines (Wu et al. 2012). Cependant, comme décrit précédemment, la modification post-traductionnelle est un mécanisme de régulation de l'activité des protéines Hox encore sous-étudié (Draime et al. 2018).

Des cribles d'interactions protéine-protéine à large échelle réalisés avec les protéines Ubx et HoxA1 ont identifié des interactions avec plusieurs molécules de signalisation cellulaire (Bondos et al. 2006) (Lambert et al. 2012). Des interacteurs candidats très variés ressortent de ces études. Elles montrent des interactions entre Ubx et des molécules de signalisation cellulaire comme Smox (voie de l'activine/TGF- β), Armadillo (voie de signalisation Wingless) ou encore la Cycline K. De même, pour HoxA1 des interactions avec des protéines telles que MDF1 (voies Wnt, JNK), RBCK1 (voie NF- κ B), Leupaxine (adhésion focale), ou encore TRIP6 (NF- κ B) ont pu être révélées. Ces protéines sont connues pour passer du cytoplasme au noyau, et agissent directement sur la régulation génétique. Certains partenaires identifiés sont des kinases pouvant modifier Ubx et HoxA1 et donc modifier leurs fonctions. D'autres protéines peuvent s'associer à des récepteurs de voies de signalisations comme TGF- β (RBPMS, qui pourrait interagir avec HoxA1) ou encore Wnt (Dishevelled, qui pourrait interagir avec Ubx) pouvant moduler les réponses à des signaux cellulaires.

Les protéines Hox ont principalement été étudiées pour leur rôle direct sur la régulation génétique, et le peu d'interactions avec des candidats liés à des fonctions plus éloignées de ce rôle canonique des protéines Hox ont rarement été étudiées au niveau fonctionnel. De plus il est souvent difficile de savoir si les protéines impliquées dans la transduction de signal recrutent les protéines Hox pour agir au niveau transcriptionnel, ou si les protéines Hox modulent ces voies de signalisation en amont, indépendamment de leur activité transcriptionnelle (Rezsohazy 2014).

Cependant une étude a par exemple montré que HoxA1f peut moduler spécifiquement la signalisation de la voie NF- κ B de manière indépendante de la transcription en interagissant avec les protéines RBCK-1 et TRAF2. Dans des cellules épithéliales humaines, un gène rapporteur placé sous la régulation d'éléments de réponse à NF- κ B est activé par HOXA1 mais pas par d'autres protéines Hox comme HoxA2, HoxA9, HoxB9 ou HoxD9). Des versions mutées de HOXA1, ayant subi des substitutions ponctuelles abolissant respectivement la fonction du motif Hexapeptide ou la liaison à l'ADN de l'homéodomaine, sont incapables d'activer l'expression d'un gène rapporteur sous le contrôle d'éléments répondant aux protéines Hox, mais sont toujours capables d'activer le rapporteur en aval d'éléments de réponse à NF- κ B. Cela suggère que cette activation est spécifique de HoxA1 mais indépendante son activité transcriptionnelle. Dans ce contexte, l'interaction entre HoxA1 et RBCK-1 inhibe la stimulation du rapporteur NF- κ B par HoxA1, tandis que la présence de TRAF2 permet son activation. RBCK1 et TRAF2 ont ainsi des effets épistatiques opposés sur HoxA1, permettant la modulation de la voie de signalisation NF- κ B de manière indépendante de l'activité transcriptionnelle de HoxA1 (Taminiau et al. 2016) (**Figure 28**). Ces résultats montrent que les protéines Hox peuvent moduler des voies de signalisation via des interactions spécifiques et indépendantes de leur activité transcriptionnelle.

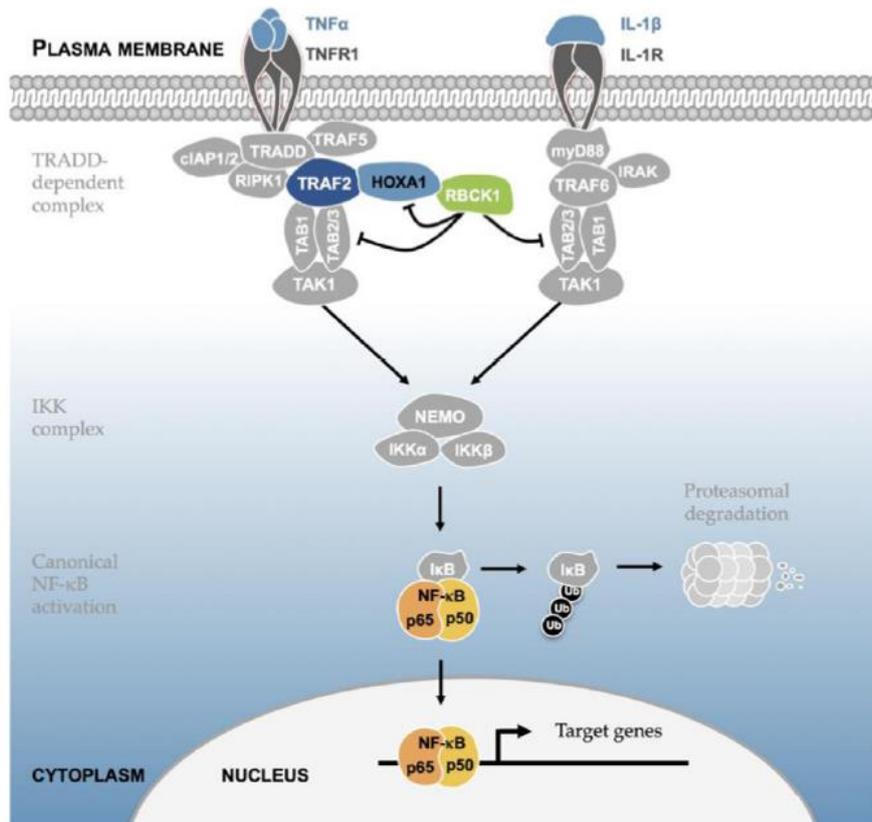


Figure 28 : Modèle de la modulation de la voie NF-κB par HOXA1. La liaison de TNFα à un récepteur au TNF (TNFR) initie le recrutement de TRADD, qui recrute à son tour cIAP1/2, RIPK1, TRAF2 et TRAF5, ce qui forme le « TRADD-dépendant complexe ». Cela permet l'amarrage de TAK1 via TAB2/3, permettant la formation du complexe IKK. Le complexe IKK phosphoryle IκB, ce qui adresse IκB à la dégradation par le protéasome. La dégradation de IκB libère NF-κB, ce qui permet sa translocation nucléaire où il peut réguler l'activité de gènes cibles. HOXA1 peut promouvoir l'activité de TRAF2, ce qui stabilise le complexe TRADD et augmente donc l'activité de la voie NF-κB. D'un autre côté, RBCK1 peut inhiber l'activité de HOXA1 et de TAB2/3, ce qui réprime l'activation de NF-κB (Taminiau et al. 2016).

Les protéines Hox peuvent donc interagir avec des partenaires généraux selon diverses configurations, avec des cofacteurs spécifiques, et cela dans le noyau au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel, comme dans le cytoplasme (Sánchez-Higuera et al. 2019). De plus, l'analyse de l'interactome de la protéine Hox Ubx au sein de différents lignages cellulaires de l'embryon de drosophile montre que les interactomes de Ubx sont très différents selon le contexte cellulaire. Si Ubx interagit effectivement avec des protéines produites de manière restreinte à ces différents tissus, il est également capable d'interagir de manière tissu-spécifique avec des partenaires pourtant présents de manière ubiquitaires. Ces protéines ubiquitaires potentiellement utilisées comme cofacteurs spécifiques peuvent être impliquées dans des processus aussi divers que la régulation transcriptionnelle, la maturation des ARNs ou la régulation épigénétique (Carnesecchi et al. 2020). Tout cela illustre bien la complexité des mécanismes moléculaires qui sous-tendent la spécificité d'action des protéines Hox *in vivo*.

3. Approches expérimentales pour l'analyse des interactions protéine-protéine (IPP) à large échelle ou individuelles

Afin de comprendre la fonction des protéines, il est essentiel de connaître leurs partenaires et plus largement leurs réseaux d'interactions moléculaires. De nombreuses techniques permettent de mettre en évidence et d'étudier les interactions protéine-protéine (IPP) dans différents contextes (**Figure 29**). Certaines techniques sont largement utilisées alors que d'autres ont été développées plus récemment et ouvrent des perspectives nouvelles. Chacune de ces techniques a naturellement ses spécificités et ses biais : certaines sont davantage optimisées pour des cribles à large échelle *in vitro*, alors que d'autres sont dédiées à la validation individuelle *in vivo*, ce qui souligne leur complémentarité. Ce chapitre présente un état de l'art concernant les différentes approches les plus utilisées pour l'analyse des IPP.

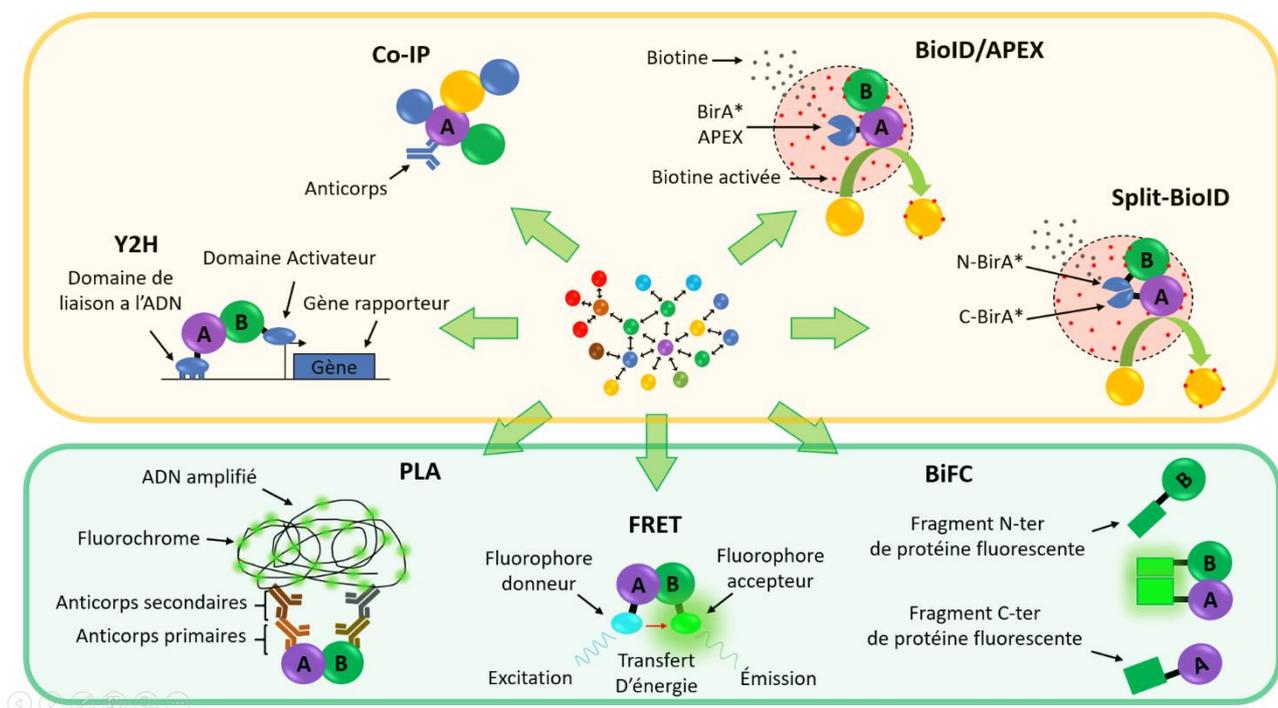


Figure 29 : Schéma récapitulatif du principe des principales méthodes de mise en évidence d'interactions protéine-protéine (adapté à partir de Béganton et al. 2019). Le réseau d'interactions protéiques schématisé au centre peut être étudié à l'aide de méthodes à large échelle (encadré jaune) ou plus adaptées à l'étude d'IPP individuelles (encadré vert). Le répertoire de méthodes présentées n'est pas exhaustif. Les méthodes de Y2H, PLA, FRET et BiFC sont généralement utilisées pour valider une interaction hypothétique entre une protéine appât et une protéine proie connue. A l'inverse, les méthodes de BioID/split-BioID/APEX sont généralement utilisées pour rechercher sans *a priori* l'interactome de protéines appâts. **Y2H** : Yeast-two-Hybrid. **Co-IP** : Co-immunoprécipitation, aussi appelée AP-MS (Affinity Purification – Mass Spectrometry). **PLA** : Proximity Ligation Assay. **FRET** : Fluorescence Resonance Energy Transfert. **BiFC** : Bimolecular Fluorescent Complementation. **BioID** : Proximity-dependant Biotinylation Identification. **APEX** : Ascorbate Peroxydase

3.1 Approches expérimentales pour l'analyse des interactions protéine-protéine (IPP) à large échelle

3.1.1 Les techniques de double hybride

La technique de double hybride la plus largement employée pour rechercher des IPP lors de cribles à large échelle est le double hybride en levure (Y2H) (Fields et Song 1989 ; Walhout, Boulton, et Vidal 2000). Cette approche est basée sur la complémentarité de deux domaines isolés - le domaine de liaison à l'ADN (DBD) et le domaine activateur de la transcription (AD) - du facteur de transcription Gal4, pour activer un gène rapporteur. Il est alors possible de fusionner une protéine appât au DBD, et une protéine proie à l'AD. Si les protéines appât et proie interagissent, alors l'AD se retrouvera suffisamment proche du DBD pour activer le gène rapporteur, produisant un signal quantifiable. Ce gène rapporteur peut coder pour la β -galactosidase, permettant l'apparition d'une coloration bleue en présence du substrat chromogène X-Gal (crible blanc-bleu), ou encore pour une enzyme nécessaire à la biosynthèse d'un métabolite, telle que l'imidazoleglycerolphosphate déshydratase nécessaire à la synthèse de l'histidine, codée par le gène His3, ce qui permet la croissance des levures dans lesquelles la protéine proie et la protéine appât interagissent cultivées sur un milieu dépourvu d'histidine (Vojtek, Hollenberg, et Cooper 1993). Cette technique permet d'effectuer des cribles à haut débit de manière rapide et peu coûteuse à partir de banques de d'ADNc. (Rajagopala et Uetz 2011). La technique de Y2H permet également de réaliser des cribles d'inhibiteurs d'IPP pathologiques. En effet, les IPP étant critiques pour la vaste majorité des processus biologiques, elles sont également essentielles pour certains processus pathologiques (Boyce et al. 2005). Ces interactions peuvent donc constituer des cibles thérapeutiques de choix (Rudin et al. 2012). Lors de l'étude par Y2H d'une IPP connue pour être impliquée dans un processus pathologique, il est possible d'ajouter des molécules inhibitrices candidates afin de tester leur potentiel à perturber cette interaction. Si l'on observe alors une perte d'expression du gène, cela signifie que la molécule candidate inhibe l'interaction entre les protéines de fusion. Le Y2H a été déployé pour identifier des inhibiteurs d'IPP impliqués dans des cancers, comme entre les protéines Myc et Max (Yin 2003), ou les facteurs Ras et Raf-1 (Ki et al. 1998) (Kato-Stankiewicz 2002),.

Cependant, à moins d'étudier des protéines de levure, le Y2H teste la capacité d'interaction de couples de protéines hors de leur contexte natif. Cela est un biais majeur car l'environnement cellulaire de la levure reste différent de celui de cellules animales ou végétales. En particulier, les protéines subissent des modifications post-traductionnelles ou sont exprimées à des niveaux qui sont souvent contexte-spécifiques. Ce biais est d'autant plus important que ces paramètres contexte-spécifiques ont une incidence sur le potentiel d'interaction entre deux protéines. On estime par exemple que le taux de faux positifs parmi les IPP mises en évidence par Y2H serait entre 25% pour des protéines de levure, et jusqu'à 45% pour les IPP entre protéines de vers ou de mouches (Huang, Jedynak, et Bader 2007).

Le Mammalian Two-Hybrid (M2H) est une variante permettant de pallier ce type de biais en adaptant le Y2H à des cellules animales, ce qui permet de tester les IPP dans un contexte biologique plus proche de leur contexte natif. (Luo et al. 1997). Originellement développé pour permettre un filtre rapide de certains faux positifs/négatifs issus de cribles Y2H (valeurs faux positifs M2H pour comparer), le M2H est aussi utilisé pour cribler des molécules pouvant perturber spécifiquement l'interaction entre partenaires impliqués dans certains cancers, révélant de potentielles options thérapeutiques (Li et al. 2011). Le M2H et ses nombreuses adaptations ont été largement utilisés afin d'identifier des IPP dans des contextes très variés tels que la communication virus/cellule hôte (Hu et al. 2015 ; Kumar et al. 2019) ou encore la résistance de certains cancers aux traitements (Liu, Lim, et Hu 2012 ; Patrício et Fardilha 2020). Une technique de double hybride utilisable en culture cellulaire a également été spécialement développée pour tester les IPP de protéines membranaires, le Mammalian Membrane Two-hybrid (MaMTH) : lorsque les deux protéines de fusion interagissent au niveau de la membrane plasmique, l'étiquette de l'une d'elle est clivée, libérant un facteur de transcription capable d'activer l'expression d'un gène rapporteur (Saraon et al. 2017).

L'adaptation la plus récente de cette technique est le Mammalian Two Hybrid inducible (iM2H). Cette méthode utilise des étiquettes différentes à fusionner aux protéines d'intérêts. La protéine appât est fusionnée à un domaine de liaison à l'ADN alternatif, Zinc Finger Homeodomain (ZFHD) bien plus efficace que celui de Gal4 utilisé classiquement. La protéine proie est quant à elle fusionnée à de multiples copies du domaine activateur de FKBP12 (FK). FKBP12 forme un complexe activateur transcriptionnel lorsqu'il interagit avec la protéine FKBP-Rapamycin Associated Protein (FR), qui est également présente sous forme de multiplex dans la cellule. La complémentation de FK et FR nécessite la présence d'un analogue de la rapamycine (ou rapalogue), ce qui rend la fonction du domaine activateur FK inducible par l'ajout d'un rapalogue. La grande efficacité du domaine de liaison à l'ADN ZFHD associé à l'inductibilité de la fonction du domaine activateur permet d'obtenir un niveau de sensibilité 100 fois supérieur à celui des approches de M2H classiques (Riegel et al. 2017).

Les interactions mises en évidence lors de cribles à large échelle, que ce soit par Y2H hors de leur contexte natif ou par M2H dans un environnement plus physiologique, doivent donc être confirmées par d'autres méthodes au sein de contextes biologiques natifs et à l'aide de techniques complémentaires (Bondos et al. 2006).

3.1.2 Protéomique par co-Immuno-précipitation (Co-IP) classique

La purification par affinité et analyse par spectrométrie de masse (AP-MS) est une technique très courante basée sur la purification d'une protéine d'intérêt à l'aide d'un anticorps, à partir d'un lysat cellulaire obtenu dans des conditions non-dénaturantes. Cela permet de préserver les interactions entre la protéine d'intérêt et ses partenaires, afin de les co-purifier. Les partenaires co-immuno-précipités sont ensuite identifiés par spectrométrie de masse (Urh,

Simpson, et Zhao 2009). Cette technique peut être utilisée sans *a priori* pour connaître les partenaires d'une protéine appât d'intérêt, permettant ainsi de réaliser des cribles à large échelle dans différents contextes cellulaires, par surexpression ou immunoprécipitation de la protéine appât (Ewing et al. 2007 ; Huttlin et al. 2017). L'anticorps utilisé pour la co-IP peut être dirigé contre un épitope endogène de la protéine d'intérêt, ou contre un épitope fusionné à la protéine d'intérêt, ce qui permet d'utiliser des anticorps commerciaux déjà validés pour ce type d'approche. Cependant, la faible stringence des étapes de lavage des complexes protéiques rend parfois difficile l'étude de protéines faiblement solubles, telles que les protéines membranaires. De plus, il est possible que des protéines soient précipitées avec la protéine appât de manière aspécifique, entraînant l'apparition de faux positifs. Mais le principal écueil se trouve être la perte des IPP de faible affinité ou transitoires lors des étapes de lyse et de lavage.

Ce dernier écueil est à l'origine de la recherche de nouveaux outils permettant de purifier les complexes protéiques de manière beaucoup plus spécifique et sensible (**Figure 30**).

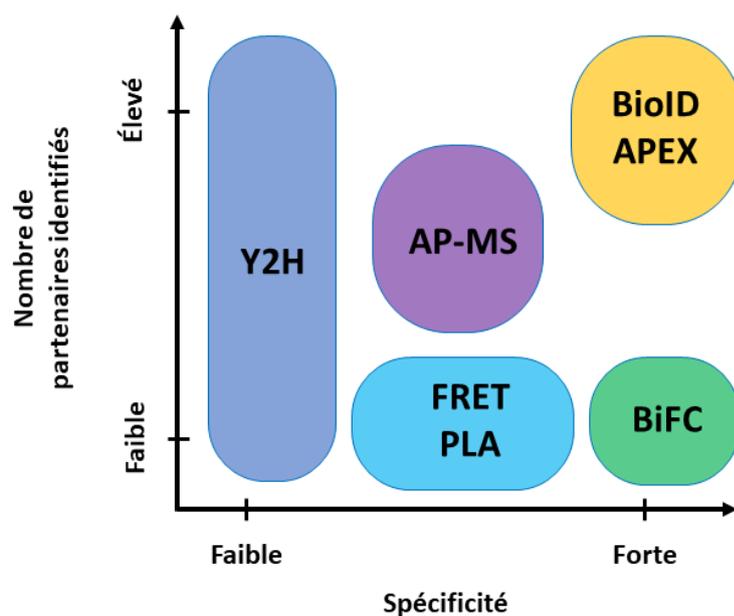


Figure 30 : Classification des principales techniques d'étude des IPPs selon le nombre d'IPP mis en évidence par expérience (résolution/sensibilité) en ordonnée, et selon la spécificité de celles-ci en abscisse. Sont mentionnées des techniques à débit généralement haut/moyen (Y2H, AP-MS, BioID, APEX) ou à bas débit (PLA, FRET, BiFC). La BiFC et les approches d'étiquetage de proximité sont des techniques récentes parmi les plus spécifiques et sensibles par leur capacité à mettre en évidence des IPPs transitoires, mais elles diffèrent drastiquement par leur débit, la BiFC testant l'interaction entre deux protéines d'intérêt, tandis que l'étiquetage de proximité identifie les interacteurs d'une protéine d'intérêt sans *a priori*. Adapté à partir de Béganton et al. 2019.

3.1.3 Marquage dépendant de la proximité

Les techniques de marquage dépendant de la proximité reposent sur la fusion de la protéine d'intérêt avec une enzyme pouvant générer une substance réactive qui va diffuser autour de la protéine appât, et marquer durablement les protéines environnantes. Il est alors possible de purifier ces protéines marquées, mêmes après qu'elles aient cessé d'interagir avec la

protéine appât. Il existe actuellement deux techniques majeures de marquage proximité-dépendant, utilisant soit l'ascorbate peroxydase (APEX) soit des biotine-ligases (BioID).

3.1.3.1 L'Ascorbate Peroxydase (APEX)

L'APEX est une technique de marquage proximité-dépendant utilisant une enzyme, l'ascorbate peroxydase monomérique (28KDa). Initialement utilisée en microscopie électronique (Martell et al. 2012), cette technique permet de marquer durablement les protéines à proximité, lesquelles peuvent ensuite être purifiées et identifiées par spectrométrie de masse (Rhee et al. 2013). En effet, en présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) l'APEX oxyde le biotine-phénol en biotine-phénoxy, un radical à la durée de vie courte (>2,5 ms) pouvant se lier de manière covalente aux acides aminés riches en électrons comme la tyrosine, le tryptophane, l'histidine ou encore la cystéine, dans un rayon d'environ 20nm. Des colonnes adaptées contenant des billes couplées à la streptavidine permettent de retenir spécifiquement et de manière plus sensible les protéines portant cette marque biotine-phénoxy.

La faible perméabilité des cellules au biotine-phénol rend cette méthode peu adaptée aux expériences *in vivo*. Mais la réaction catalysée par l'APEX ne nécessite généralement pas plus de quelques minutes, ce qui permet d'analyser des IPP potentiellement transitoires dans une fenêtre de temps restreinte, comme par exemple au sein de réseaux d'interactions de protéines spécialisées dans la signalisation cellulaire, ou encore de phénomènes très dynamiques comme l'apparition de granules de stress dans les neurones (Markmiller et al. 2018). Cette approche peut également être employée pour étudier le protéome de compartiments sub-cellulaires *in vivo* de façon stade et tissu-spécifique avec succès, tel que le protéome de la matrice mitochondriale des muscles chez la drosophile (Chen et al. 2015). Les avancées dans le domaine de la spectrométrie de masse permettent d'obtenir des données de bonne qualité, notamment en utilisant des techniques quantitatives telles que le SILAC ou l'iTRAQ afin de mieux différencier les interacteurs potentiels de la protéine d'intérêt du bruit de fond (Hung et al. 2014). Ces techniques de spectrométrie de masse quantitatives nécessitent cependant une quantité importante de matériel biologique, ce qui est généralement aisé à obtenir à partir de cultures cellulaires, mais peut s'avérer délicat pour du matériel *in vivo*.

Une limitation majeure de l'APEX est sa sensibilité qui reste malgré tout limitée, et qui ne peut pas toujours être compensée par une augmentation de l'expression de la protéine-fusion, car causant parfois une agrégation des organites (Lam et al. 2015). Une réponse à ce problème fût de diriger l'évolution de l'APEX à l'aide de levures, permettant d'isoler un mutant (A134P), nommé APEX2, bien plus stable, sensible et spécifique que l'APEX originale (Lam et al. 2015). Une autre limitation reste l'utilisation de peroxyde d'hydrogène lors de l'induction de la réaction enzymatique, qui peut induire un stress oxydant et modifier la physiologie des cellules traitées. De plus, si cette technique est indiquée pour l'étude de phénomènes rapides, elle l'est moins pour ce qui est de l'étude de phénomènes plus lents ou oscillants. En revanche,

d'autres techniques d'étiquetage dépendant de la proximité sont plus adaptées pour ces derniers cas de figure.

3.1.3.2 L'identification à la biotine (BioID)

L'identification à la biotine (BioID) est autre type de méthode d'étiquetage proximité-dépendant, à l'origine basé sur l'utilisation d'un cofacteur de l'acétyl-CoA carboxylase de *Escherichia coli*, l'enzyme BirA (35KDa). En présence d'ATP, cette enzyme convertit les molécules de biotine en Biotinoyl-5'-AMP, une molécule très réactive. L'enzyme BirA sauvage va ensuite maintenir piégée cette molécule dans son site actif jusqu'à ce qu'elle puisse la mettre en contact de manière spécifique avec une lysine d'un motif BAP (Biotin Acceptor Peptide) spécifiquement reconnu au niveau de sa protéine cible (Beckett, Kovaleva, et Schatz 1999 ; Fernández-Suárez, Chen, et Ting 2008). L'approche BioID utilise une variante de BirA (BirA*) ayant subi une mutation (R118G) qui réduit fortement son affinité pour le biotinoyl-5'-AMP. Cela a pour conséquence sa libération prématurée du site actif (Roux et al. 2012). Le biotinoyl-5'-AMP ainsi généré va alors pouvoir réagir avec n'importe quel acide aminé basique des protéines alentour dans un rayon d'environ 10nm (Kim et al. 2014) de manière aspécifique. Fusionner cette enzyme à une protéine d'intérêt permet de biotinyler les protéines environnantes, et donc de les purifier puis de les identifier par spectrométrie de masse.

La BioID permet un marquage des protéines qui diffère principalement de l'APEX par la cinétique de la réaction enzymatique beaucoup plus lente, notamment lorsqu'elle est employée dans des systèmes plus froids que sa température optimale (37°C) comme la levure, drosophile ou nématode. C'est donc une technique compatible pour étudier des phénomènes biologiques relativement lents tels que des processus développementaux (Carnesecchi et al. 2020), ou encore fluctuants au cours du temps et pouvant donc n'être que partiellement accessibles en utilisant des méthodes se focalisant sur des fenêtres temporelles restreintes. Des phénomènes mettant en jeu des réseaux de protéines qui évoluent relativement lentement au cours du temps, tels que le réseau d'interaction protéique nécessaire à la voie de signalisation Hippo (Couzens et al. 2013), ou encore la structure dynamique de l'interface cil/centrosome (Gupta et al. 2015) peuvent se révéler difficiles à saisir dans leur ensemble en utilisant des techniques piégeant des IPP en seulement quelques minutes.

La BioID a d'ores et déjà été utilisée avec succès dans le domaine de l'inféctiologie en permettant l'identification d'une protéine essentielle lors d'une étape clé de l'infection par *Plasmodium berghei*, lorsque les gamétocytes cherchent à émerger des érythrocytes afin de se disséminer dans le sang du patient (Kehrer, Frischknecht, et Mair 2016). Cette technique est également utilisée dans le domaine de la cancérologie et a notamment permis d'identifier de nouveaux interacteurs de l'oncogène c-MYC (Dingar et al. 2015), ou encore en botanique (Khan et al. 2018). Enfin, en fusionnant BirA* à des protéines aux localisations sub-cellulaires très finement contrôlées, cette technique peut être utilisée de manière à étudier le protéome de différents compartiments sub-cellulaires (Liu et al. 2018).

La BioID présente malgré tout quelques limitations, notamment par la nécessité de fusionner la protéine appât avec BirA*, qui constitue une étiquette de taille conséquente pouvant altérer sa fonction. La présence de biotine en quantité suffisante dans le milieu réactionnel peut également être un frein au sein de certains modèles. Il est aussi possible que certaines protéines peu riches en lysine puissent être sous-représentées dans la fraction des protéines biotinylées. Enfin, si la BioID est indiquée pour l'étude de phénomènes lents, elle l'est beaucoup moins pour l'étude de phénomènes très rapides.

Plusieurs adaptations de la BioID ont été développées pour résoudre ces limitations. Afin de limiter l'impact de la taille de la BirA* (321 acides aminés) sur la fonction de la protéine appât, une première approche fut de développer d'autres biotine-ligases de taille réduite. La plus petite biotine ligase connue (233 acides aminés) provenant de *Aquifex aeolicus* a été mutée avec succès afin de lui faire perdre sa spécificité de biotinylation d'une manière similaire à BirA*, et fut nommée BioID2. Cette enzyme est fonctionnellement comparable à BirA*, mais provenant d'un organisme thermophile, sa température optimale est de 50°C alors que celle de BirA* est de 37°C, ce qui peut être intéressant pour l'étude de systèmes thermophiles, mais handicapant au sein de modèles cellulaires animaux. Un autre avantage de cette nouvelle variante est qu'elle requiert bien moins de biotine, ce qui peut être intéressant au sein de modèles pauvres en biotines et difficiles à compléter (Kim et al. 2016).

Des variantes de BirA* plus efficaces ont également été générées. Une approche d'évolution dirigée dans des levures a permis de créer deux nouvelles enzymes utilisables en BioID : la TurboID et la mini-TurboID. (Branon et al. 2018) L'activité de ces variantes est bien plus élevée que celle de la BirA* originale. En effet, afin d'obtenir suffisamment de protéines biotinylées pour une analyse par spectrométrie de masse à partir d'une expérience de BioID en culture de cellules, il est recommandé d'induire la biotinylation pendant une durée de 18h. Cette durée passe à seulement 10 minutes en utilisant la TurboID ou la mini-TurboID. La mini-TurboID a également pour avantage d'être une forme tronquée (28KDa) de BirA*, ce qui limite potentiellement son impact sur la fonction de la protéine à laquelle elle est fusionnée. Si BirA* est efficace dans la plupart des compartiments sub-cellulaires, et notamment le noyau, il est intéressant de noter que les variantes TurboID restent très efficaces dans des compartiments sub-cellulaires où BirA* est bien moins efficace, comme le réticulum endoplasmique. En revanche, une activité trop prolongée de ces variantes peut provoquer des biotinylations aspécifiques, ce qui rend nécessaire un contrôle strict de la durée de la réaction. Cela est facile en culture cellulaire, par simple ajout et élimination de biotine dans le milieu de culture, mais plus difficile dans la plupart des organismes modèles. L'activité de ces nouvelles enzymes est telle que le peu de biotine présent dans un milieu de culture cellulaire de base peut entraîner un signal similaire à celui produit par la BirA* originelle, si bien qu'il peut être nécessaire de dialyser le milieu de culture afin d'éliminer toute trace de biotine et éviter une biotinylation en dehors de la fenêtre temporelle souhaitée. De plus, la forte déplétion en biotine due à l'activité de ces enzymes peut parfois avoir un effet toxique. Enfin, le rayon de la biotinylation

passé d'environ 10nm à 35nm, ce qui peut entraîner un bruit de fond accru et surtout l'identification d'un nombre accru d'IPP indirectes (May et al. 2020).

Une nouvelle variante de BioID, l'AirID, générée à l'aide d'algorithmes de reconstruction d'enzymes ancestrales, vise à corriger ces dernières limitations. La AirID présente une activité comparable à celle de la TurboID, mais nécessite moins d'ATP pour fonctionner, ne semble pas provoquer de toxicité, et biotinyler les partenaires de la protéine appât à laquelle elle est fusionnée de façon plus spécifique. (Kido et al. 2020). Le répertoire d'enzymes utilisable pour la BioID semble donc en constante évolution, et des outils permettant de réduire l'impact des biais de cette technique de manière toujours plus satisfaisante sont régulièrement proposés par la communauté.

La BioID a également été déclinée de manière à pouvoir étudier l'interactome d'un dimère de manière spécifique, à l'aide de la Split-BioID (Schopp et al. 2017). Le principe est de fusionner respectivement deux fragments N-ter et C-ter de la BirA* à deux protéines d'intérêt. Lorsque ces deux protéines d'intérêt vont interagir dans une cellule, alors les deux fragments vont compléter et reconstituer une enzyme BirA* fonctionnelle. Cependant, l'activité de l'enzyme reconstituée est inférieure à celle de l'enzyme BirA* d'origine. Cette technique permet s'assurer que la biotinylation soit restreinte aux compartiments sub-cellulaires choisis de manière plus fiable. Cette innovation a également déjà été adaptée à la TurboID (Cho et al. 2020).

3.2 Approches expérimentales pour l'analyse des interactions protéine-protéine (IPP) individuelles

Les approches à haut débit citées plus haut permettent de révéler un certain nombre de nouvelles IPP qu'il faut ensuite pouvoir confirmer de manière plus précise. Dans ce chapitre, je focaliserai volontairement sur les techniques d'imagerie utilisées pour valider et/ou analyser des IPPs individuelles. Ces techniques ont l'avantage de pouvoir être développées dans les cellules ou tissus d'intérêt, en condition fixe ou native.

3.2.1 Approche par ligation de proximité (Proximity Ligation Assay, PLA)

La PLA est une technique très sensible et relativement simple et rapide de détection des IPP, basée sur la reconnaissance des protéines appât et proie par des anticorps primaires, puis des anticorps secondaires conjugués à des oligonucléotides. Si les deux protéines d'intérêt sont suffisamment proches (moins de 40nm) alors leurs oligonucléotides respectifs peuvent s'hybrider. Après une étape de ligation, cela forme un brin d'ADN circulaire amplifiable par PCR (Polymerase Chain Reaction) en cercle roulant, utilisant des nucléotides marqués à l'aide d'un fluorochrome. Cette méthode de production du signal est très efficace et permet à peu

de molécules en interaction de produire un signal fluorescent puissant et stable. L'IPP est alors observable par microscopie (Söderberg et al. 2006), ce qui permet également de visualiser la localisation sub-cellulaire de l'interaction entre les protéines d'intérêt. L'utilisation d'anticorps dirigés spécifiquement contre une protéine ayant subi une modification post-traductionnelle telle qu'une phosphorylation (Koos et al. 2009) permet également d'identifier des partenaires spécifiques de la protéine appât ayant subi cette modification. Cependant, à moins de travailler avec des protéines transgéniques fusionnées à une étiquette comme par exemple un peptide hémagglutinine (HA), cette méthode nécessite de posséder des anticorps suffisamment spécifiques dirigés contre les protéines d'intérêt. Cette méthode nécessite également de fixer les cellules, reste difficile à automatiser et peut être relativement coûteuse en fonction de l'anticorps, ce qui limite son utilisation large.

3.2.2 La technique de transfert d'énergie par résonance de fluorescence ou Förster (Fluorescence Resonance Energy Transfert, ou Förster Resonance Energy Transfert, FRET)

La technique du FRET permet d'étudier les propriétés d'interaction de deux protéines respectivement fusionnées à un fluorochrome « donneur » et à un fluorochrome « accepteur » (Sekar et Periasamy 2003). Si les deux protéines fusionnées interagissent, alors les deux fluorochromes se retrouvent suffisamment proches dans l'espace pour que lors de l'excitation du donneur, il transfère son énergie à l'accepteur par un phénomène de résonance. Si les deux protéines fusions sont suffisamment proches (moins de 10nm), alors l'excitation du fluorochrome donneur provoquera l'émission de photons par le fluorochrome receveur (**Figure 31**). Il est possible de remplacer le fluorochrome donneur par une protéine bioluminescente comme la luciférase (on parle alors de la technique de « BRET »). L'énergie produite par la protéine bioluminescente après l'ajout de son substrat peut exciter le fluorochrome accepteur par transfert d'énergie. Cela permet de s'affranchir de l'utilisation d'une excitation lumineuse exogène, ainsi que du risque de photoblanchiment (Xu, Piston, et Johnson 1999), tout en augmentant considérablement la sensibilité de la technique (Arai et al. 2001). Cela permet notamment d'analyser les IPP avec des protéines produites à des niveaux comparables aux protéines endogènes, tels que des IPP entre des récepteurs à la leptine au niveau de la membrane de cellules en culture (Couturier et Jockers 2003).

Le FRET ne nécessitant pas de fixation, cela permet une analyse cinétique des IPP dynamiques, que cela soit en culture cellulaire (Coulon et al. 2008) ou *in vivo*, par exemple chez les plantes comme *Arabidopsis thaliana* (Subramanian et al. 2004) ou encore la souris (Audet et al. 2010). Cette technique peut également être utilisée efficacement pour cribler des inhibiteurs d'IPP à haut débit en culture cellulaire (Hamdan et al. 2005 ; Couturier et Deprez 2012). Il existe également une variante de FRET Tri-moléculaire, utilisant trois fluorochromes différents pour analyser des IPP au sein de complexes protéiques contenant jusqu'à trois protéines de fusion (Kuo et al. 2018).

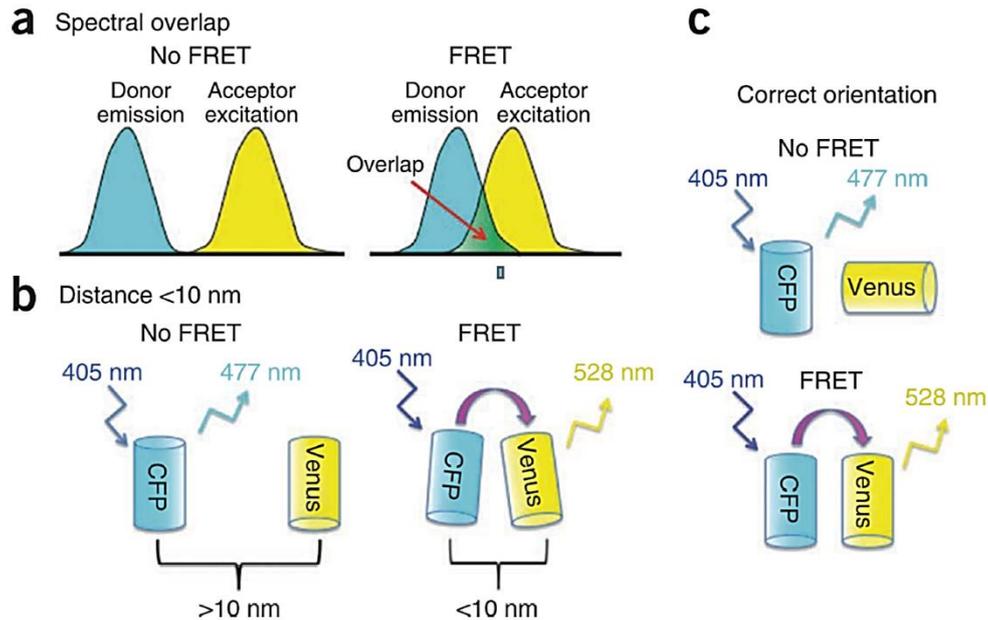


Figure 31 : Conditions nécessaires à un FRET efficace. **A :** Le spectre d'émission du fluorochrome donneur doit chevaucher le spectre d'absorption du fluorochrome receveur afin de l'exciter. **B :** Le transfert d'énergie ne peut pas avoir lieu si les deux fluorochromes (ici le donneur est la protéine CFP, et l'accepteur est la protéine Venus) sont éloignés de plus de 10 nm. **C :** les deux fluorochromes doivent se trouver positionnés parallèlement, sans quoi le fluorochrome donneur émettra sa fluorescence. (Broussard et al. 2013).

Le FRET présente également quelques limitations, telles que la sensibilité des protéines fluorescentes aux changements de pH, de concentration en ions, de température. Le fait d'utiliser simultanément deux protéines fluorescentes différentes nécessite que les conditions environnementales soient compatibles pour chacune d'entre elles. Mais la principale limite du FRET est son faible rapport signal/bruit, principalement dû à la perte d'énergie lors du phénomène de transfert, pouvant rendre l'analyse des données laborieuse (Leavesley et Rich 2016). Même si différentes techniques ont été développées pour pallier à cette limitation, telles que le FRET spectral (Leavesley et al. 2013) ou encore le Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) (Lières et al. 2009), le rapport signal/bruit est toujours inférieur à celui obtenu lors d'un marquage à l'aide d'un seul fluorochrome. Cet aspect peut cependant être encore amélioré, notamment en utilisant des outils informatiques plus performants pour l'analyse des données (Nagy et al. 2014).

3.2.3 La complémentation de Fluorescence Bi-moléculaire (Bimolecular Fluorescence Complementation, BiFC)

La technique de Complémentation de Fluorescence Bi-moléculaire (BiFC) est une technique d'analyse des IPP basée sur la propriété d'une protéine fluorescente à être scindée en deux fragments non-fluorescents capables de reconstituer un complexe fluorescent s'ils se retrouvent proches l'un de l'autre. Si l'on fusionne respectivement ces deux fragments fluorescents à un couple de protéines exprimées dans une cellule, l'apparition d'un signal fluorescent signifie que les deux héli-fragments ont été rapprochés, ce qui suggère une interaction entre les protéines du couple testé.

De nombreuses protéines fluorescentes sont disponibles pour effectuer de telles complémentations, et varient en termes de longueur d'onde d'excitation et d'émission, mais aussi en termes de vitesse de complémentation et d'intensité du signal. (Kodama et Hu 2012). La BiFC multicolore découle de cette grande diversité de fragments utilisables en BiFC. Cette approche repose sur la co-expression de plus de deux protéines fusionnées à des fragments de BiFC compatibles entre eux et formant des complexes aux propriétés fluorescentes différentes selon la manière dont ils s'associent. Il est alors possible de visualiser différentes IPPs au sein d'une même cellule, ainsi que de comparer l'efficacité de la formation des différents complexes alternatifs alors entrés en compétition (Kerppola 2013) (**Figure 32**).

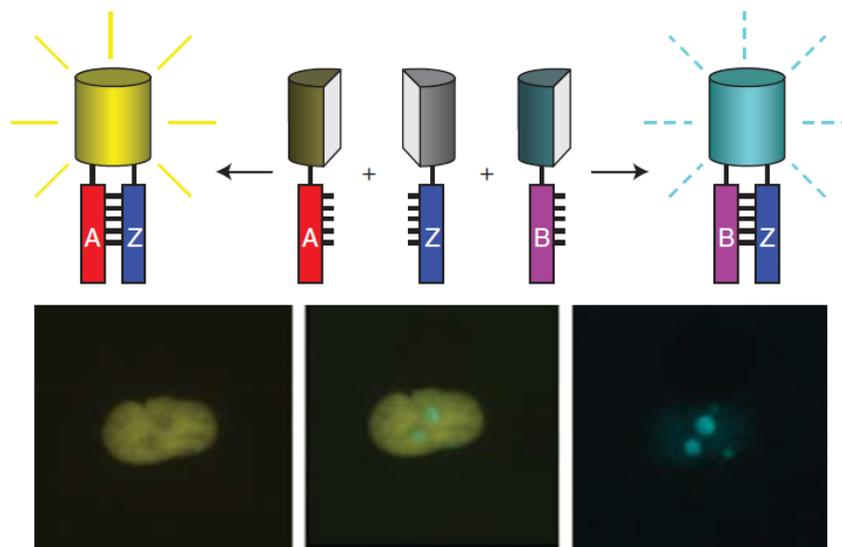


Figure 32 : Principe de la BiFC multicolore. Deux partenaires alternatifs (A et B) sont fusionnés à différents héli-fragments fluorescents (demi-cylindres teintés). Ces deux protéines de fusion sont co-exprimées dans une cellule avec un partenaire d'interaction commun (Z) fusionné avec un héli-fragment compatible avec l'un ou l'autre des héli-fragments fusionnés à A et B. Les complexes formés par l'interaction de Z avec A ou B peuvent être distingués par la différence de leurs spectres fluorescents respectifs. Les images en dessous des schémas sont un exemple de la visualisation de deux complexes protéiques au sein d'une même cellule, l'un nucléolaire (cyan), et l'autre nucléoplasmique (jaune). (Kerppola 2013)

La BiFC a aussi été adaptée à des protéines fluorescentes photocommutables telles que la Dronpa (Lee et al. 2010). Cette protéine qui émet une fluorescence verte à un maximum de 518nm lors d'une excitation à 503nm, peut être commutée dans un état non-fluorescent par une forte exposition à 490nm, puis commutée à nouveau dans un état fluorescent par une faible exposition à 405nm. Ce type de protéine fluorescente présente l'avantage d'être utilisable pour visualiser le transport de protéines (Ando, Mizuno, et Miyawaki 2004) ou encore de reconstituer des réseaux neuronaux *in vivo* (ici chez le poisson zèbre) en réactivant la Dronpa précisément dans chaque neurone successivement considéré, et en tirant partie des transports axonaux rétrogrades et antérogrades pour visualiser leurs morphologies au sein d'un réseau tissu nerveux complexe contenant de nombreux neurones intriqués (Aramaki et Hatta 2006). Il est également possible de mettre en place des approches de microscopie super-résolution en utilisant des protéines photo-activables en BiFC permettant par exemple des approches de microscopie par localisation photoactivée (PALM) et donc de visualiser chaque évènement d'IPP de manière extrêmement précise (Liu et al. 2014).

La BiFC présente l'avantage majeur de permettre la visualisation d'IPP faible et/ou transitoires (Morell et al. 2007) car la formation du complexe fluorescent est le plus souvent irréversible (Shyu et Hu 2008), ce qui permet d'atteindre une haute sensibilité. En contrepartie la dynamique de ces interactions est figée, ce qui peut potentiellement altérer la fonction ou l'activité du complexe. (Kerppola 2008). La BiFC a également l'avantage de pouvoir visualiser les IPP directement *in vivo*, que ce soit au sein de cellules en culture (Dard et al. 2019), de plantes (Kodama et Wada 2009) ou encore chez la mouche drosophile (Duffraisse, Hudry, et Merabet 2014). Cette technique a permis d'identifier des inhibiteurs d'IPPs, comme par exemple un peptide pouvant perturber la formation d'un complexe oncogène, le dimère PIKE-A/Akt, impliqué dans la survie, l'invasion et la migration des cellules de certains glioblastomes multiformes (Qi et al. 2013).

Cependant, la méthode de BiFC présente certaines limitations. En effet le fait de fusionner les protéines candidates a des fragments de protéines fluorescentes peut altérer leur fonction et l'interaction avec leurs partenaires. Lors d'un cribble il peut donc être intéressant de tester différentes topologies de fusion afin de limiter ce type de biais (Kerppola 2008). La BiFC tripartite est une autre réponse possible à cette limitation. Cette approche consiste à scinder une protéine fluorescente en trois fragments complémentaires, dont deux sont bien plus courts que le troisième. Fusionner les protéines appât et proie à ces fragments de faible poids moléculaire permet de limiter l'impact qu'aura la fusion sur la fonction des protéines d'intérêt, ainsi que sur leur capacité à interagir ensemble. Lorsque ces deux protéines fusions interagissent, le troisième fragment libre va alors compléter le complexe fluorescent (Cabantous et al. 2013). Cette approche permet donc de limiter la taille des fragments fusionnés aux protéines d'intérêt, et a été améliorée de manière à présenter un ratio signal/bruit satisfaisant (Shen et al. 2020).

Le potentiel d'affinité entre les deux héli-fragments de protéines fluorescentes pourrait aussi aboutir à l'apparition d'un signal par stabilisation d'un complexe entre deux protéines n'interagissant pas. Cependant l'utilisation de contrôles appropriés, en testant l'IPP entre deux protéines dont l'une est mutée au niveau de domaines nécessaires à l'interaction avec sa partenaire, montre souvent une forte diminution du signal fluorescent (**Figure 33**). C'est notamment le cas lorsque l'on compare l'interaction entre les protéines AbdA et Exd dans l'embryon vivant de drosophile. Ces deux protéines couplées respectivement aux fragments C-terminal et N-terminal de la protéine fluorescente Venus (VC et VN) provoquent l'apparition d'un fort signal fluorescent lorsqu'ils sont coexprimés. Cependant, leur capacité d'interaction étant conditionnée par leur capacité à se lier à l'ADN, la mutation de l'homéodomaine d'un des deux membres du couple AbdA/Exd provoque une forte perte de signal fluorescent, et la mutation simultanée de l'HD des deux protéines abolit totalement le signal fluorescent (Hudry et al. 2011). Cela souligne la spécificité de cette technique, ainsi que sa capacité à analyser l'impact d'une mutation sur les propriétés d'interaction entre deux protéines. Il est également possible de muter les fragments de protéine fluorescente afin de limiter la capacité d'auto-assemblage du complexe fluorescent, et ainsi limiter le risque de faux positif (Zhou et al. 2011).

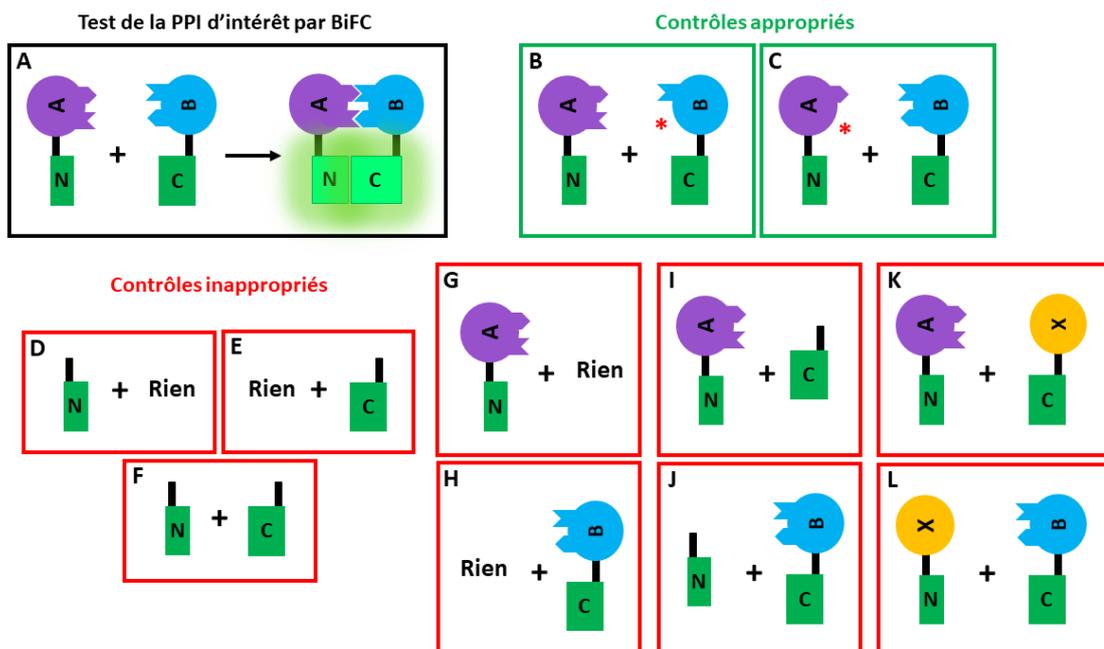


Figure 33 : Les contrôles négatifs de la BiFC. **A** : Schéma d'une expérience de BiFC classique pour la visualisation d'une interaction entre la protéine A et la protéine B. **B et C** : contrôles négatifs appropriés employant des mutations au niveau des domaines responsables de l'interaction entre les protéines A et B. **D à L** : Exemples de contrôles négatifs inappropriés. **D** : Fragment N-terminal seul. **E** : Fragment C-terminal seul. **F** : Fragment N-terminal et C-terminal seuls. **G** : Fragment N-terminal fusionné à A seul. **H** : Fragment C-terminal fusionné à B seul. **I** : Fragment C-terminal utilisé comme interacteur négatif de A fusionné au fragment N-terminal. **J** : Fragment N-terminal utilisé comme interacteur négatif de B fusionné au fragment C-terminal. **K** : Une protéine X différente fusionnée a au fragment C-terminal utilisée comme un interacteur négatif de de A fusionné au fragment N-terminal. **L** : Une protéine X différente fusionnée au fragment N-terminal utilisée comme un interacteur négatif de de B fusionné au fragment C-terminal (adapté de Kodama et Hu 2012).

Cette technique est facilement utilisable en culture cellulaire, et au sein d'organismes modèles tels que la mouche drosophile. Le système UAS/Gal4 permet notamment de diriger l'expression des protéines fusion au sein des types cellulaires d'intérêt, et au moment choisi, ce qui est particulièrement utile pour étudier les IPPs dans leur contexte natif. Avec ce système, il est aussi possible d'utiliser des séquences régulatrices endogènes pertinentes afin d'obtenir un niveau de production des protéines fusion similaire aux protéines endogènes, ce qui est nécessaire afin de tester les IPPs dans des conditions les plus proches possibles des conditions physiologiques (Hudry et al. 2011). Nous pouvons aller encore plus loin dans cette démarche en utilisant le système Split-Gal4, qui consiste en la reconstitution d'un facteur de transcription GAL4 actif via l'association de deux fragments séparés, le domaine activateur (GAL4^{AD}), et le domaine responsable de la liaison à l'ADN (Gal4^{DBD}). En plaçant les transgènes codants pour chacun de ces fragments respectivement sous le contrôle de séquences régulatrices des gènes codant pour la protéine appât et la protéine proie, il est possible de visualiser l'IPP uniquement dans les tissus où les deux protéines sont normalement coexprimées (Bischof et al. 2018) (**Figure 34**).

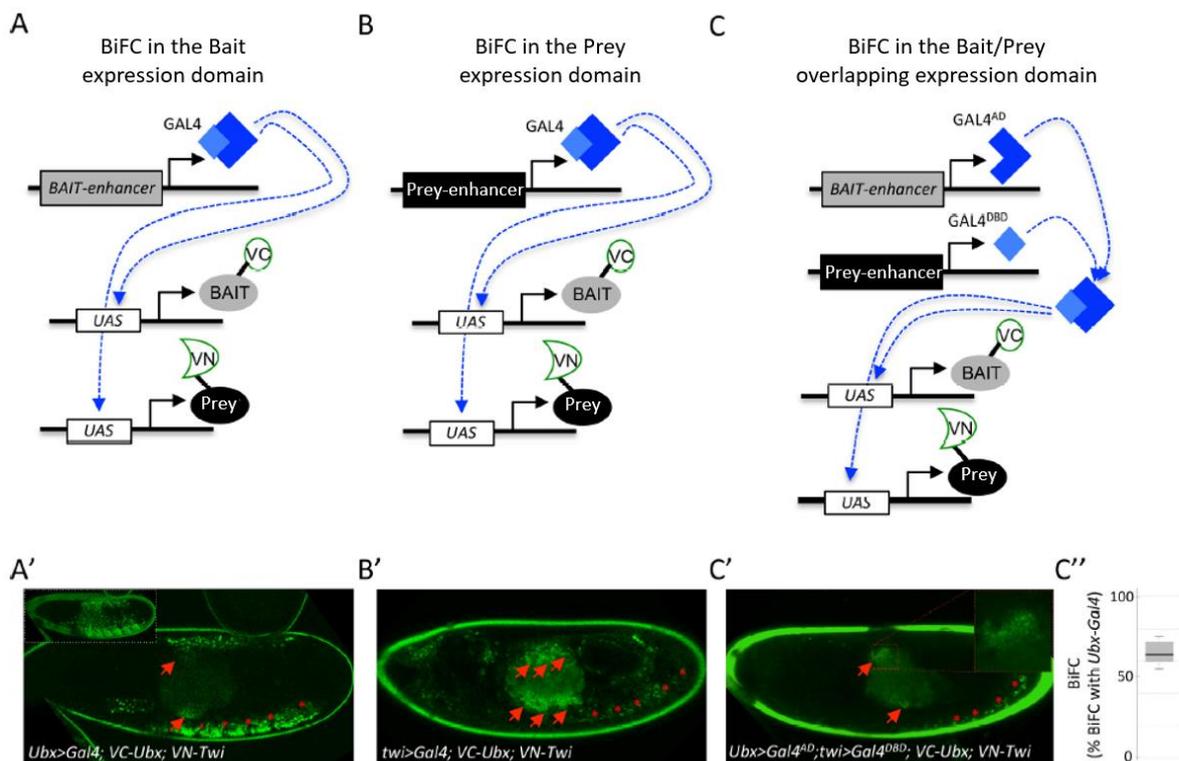


Figure 34 : Couplage de la BiFC au système Split-Gal4 pour la visualisation d'IPP dans les cellules où les domaines d'expression de l'appât et de la proie se chevauchent. A : Principe de la BiFC utilisant un unique Gal4 reproduisant le profil d'expression endogène de la protéine appât. **B :** Principe de la BiFC utilisant un unique Gal4 reproduisant le profil d'expression endogène de la protéine proie. **C :** Principe de la BiFC lors de l'expression indépendante de deux moitiés du FT Gal4 (Gal4^{AD} et Gal4^{DBD}), respectivement sous le contrôle de séquences régulatrices de l'appât et de la proie. Ce système permet la production d'un Gal4 fonctionnel uniquement au niveau des domaines où se chevauchent l'expression dirigée par les séquences régulatrices de l'appât et de la proie. Cela permet d'étudier l'interaction entre ces deux protéines uniquement au niveau des cellules où elles sont normalement présentes. **A', B', C' :** images

illustratives de la BiFC obtenue lors de l'expression de protéines fusion de Ubx et Twi en utilisant Ubx-Gal4 (**A**), Twi-Gal4 (**B**) ou un Split-Gal4 (Ubx-Gal4^{AD}/Twi-Gal4^{DBD}). Les flèches rouges indiquent le signal fluorescent obtenu au niveau du mésoderme viscéral. Les étoiles rouges indiquent le signal fluorescent obtenu au niveau du mésoderme somatique. **C''** : Quantification de l'intensité de la fluorescence obtenue au niveau du mésoderme viscéral en utilisant le système Split-Gal4 par rapport au signal fluorescent obtenu en utilisant Ubx-Gal4. Adapté à partir de Bischof et al. 2018.

La BiFC est donc une méthode d'étude des IPP particulièrement efficace, capable de mettre en évidence des interactions faibles et transitoires en contexte physiologique. Cependant c'est une technique avec *a priori*, nécessitant la génération de transgène pour la protéine appât et la protéine proie. Les approches consistant à combiner une méthode sans *a priori* (comme l'APEX ou la BioID) avec une méthode sensible comme la BiFC sont donc potentiellement très efficaces pour identifier de manière pertinente les acteurs d'un réseau protéique complexe.

4. Le développement des appendices de vol chez les insectes

4.1 L'origine et l'évolution des appendices de vol chez les insectes

Au cours de l'histoire du vivant, le vol par battement actif des ailes (dit « vol battu ») est apparu indépendamment chez 4 groupes d'animaux : les insectes, les ptérosaures, les oiseaux, et les chauve-souris (Alexander 2015). Les insectes furent les premiers animaux à pouvoir voler, et ils développèrent rapidement une grande diversité de morphologies au niveau de leurs appendices de vol, ce qui leur permit de s'adapter à la plupart des niches écologiques terrestres (Dickinson 2006). Il existe deux hypothèses pour expliquer l'origine évolutive des ailes. La première est l'hypothèse de l'origine tergale (le tergum étant le nom de la portion dorsale des segments d'un arthropode), qui propose que les ailes auraient évolué à partir d'excroissances au niveau de la cuticule dorsale, les lobes paranotaux, utilisés afin de planer avant l'apparition du vol battu (Flower 1964). La seconde hypothèse est celle de l'origine pleurale (la pleure étant le nom des sclérites latérales des segments thoraciques et abdominaux des insectes) et propose que les ailes dérivent de segments proximaux de pattes ancestrales (Kukalova-Peck 1978) (**Figure 35**). Le registre fossile suggère que les ptérygotes (les insectes pourvu d'ailes) ont développé des ailes à partir des pattes d'un ancêtre aptérygote (dépourvu d'ailes). Certains ancêtres intermédiaires tels que les paléodictyoptères (au stade de nymphe) présentaient des ailes sur chaque segment. Les gènes Hox ont ensuite permis la perte des ailes au niveau de tous les segments exceptés les second et troisième segments thoraciques (Carroll, Weatherbee, et Langeland 1995) (**Figure 36**).

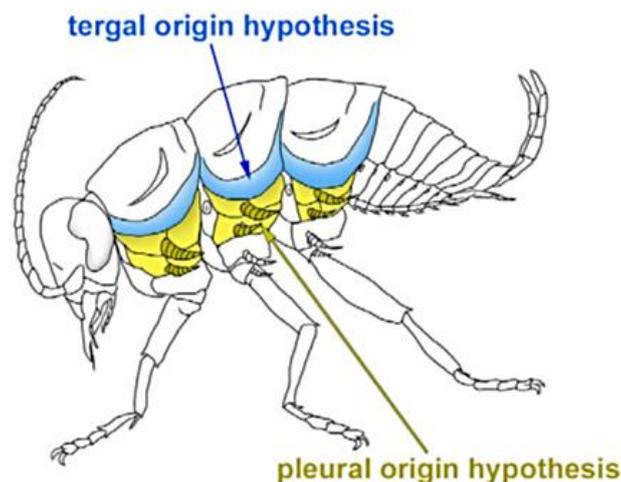


Figure 35 : Origine tergale ou pleurale des ailes chez les insectes. Représentation schématique des hypothèses quant à l'origine des ailes, par la localisation des deux origines proposées, le tergum (en bleu) et la pleure (en jaune) sur le schéma corporel d'un insecte ancestral. (Tomoyasu, et al. 2017)

insectes, mais n'est pas adapté pour le vol d'organismes dont la taille serait inférieure à celle d'un bourdon. En dessous de cette taille, la fréquence de battement d'ailes requise pour le vol est impossible à obtenir avec un vol synchronisé, car il est physiquement impossible de déclencher la stimulation musculaire aussi rapidement. Lors du vol synchronisé, la contraction musculaire est causée par l'influx nerveux déclenchant une libération de calcium à partir du réticulum sarcoplasmique (Hunter 2007). Le calcium doit ensuite être repompé dans le réticulum sarcoplasmique contre son gradient électrochimique afin que le muscle se relâche, mais la vitesse à laquelle le calcium est repompé connaît une limite physique. Cela contraint de fait la fréquence maximale de battement des ailes à environ 100 par seconde (Scherer 1995) bien que dans de rares cas, on observe chez les animaux des muscles oscillateurs classiques permettant d'atteindre des vitesses d'oscillation supérieure à 100Hz, au dépens de la puissance. Cela est possible en diminuant la quantité de myofibrilles dans les muscles au profit des mitochondries et du réticulum sarcoplasmique (Conley et Lindstedt 2002 ; Iwamoto 2011).

Un autre type de vol, dit « asynchrone », est apparu au moins 4 fois chez les insectes : les influx nerveux ne sont plus corrélés aux battements d'ailes. Dans les muscles asynchrones, la quantité de calcium intracellulaire est maintenue à un niveau d'activation alors que les myofibrilles oscillent de manière autonome. La quantité de pompe à calcium pouvant alors être minimisée, la majorité du volume du muscle peut alors être occupée par des myofibrilles afin de produire des oscillations puissantes, et des mitochondries (le coût énergétique de ces oscillations successives étant élevé). Chez les néoptères (tels que les diptères), les muscles de vol ne contrôlent pas directement les ailes, mais contrôlent leur battement indirectement en déformant l'exosquelette thoracique. On parle alors de « vol indirect », par opposition au « vol direct » observé chez les paléoptères (**Figure 37**) (Kukalova-Peck 1978). Les muscles asynchrones ont la particularité d'être activables par étirement : ils se contractent automatiquement dès que l'action de leurs muscles antagonistes provoque leur propre étirement, produisant une forte contraction étirant à son tour les muscles opposants. Ce processus répété permet le battement continu des ailes même en absence de fluctuation de concentration en calcium intracellulaire. Le facteur primaire déterminant la fréquence de battement des ailes est alors la fréquence de résonance mécanique du thorax et des ailes, bien que la variation de la fréquence de l'influx nerveux permette aussi une certaine modulation de la fréquence de battement (Dickinson 2006 ; Iwamoto 2011).

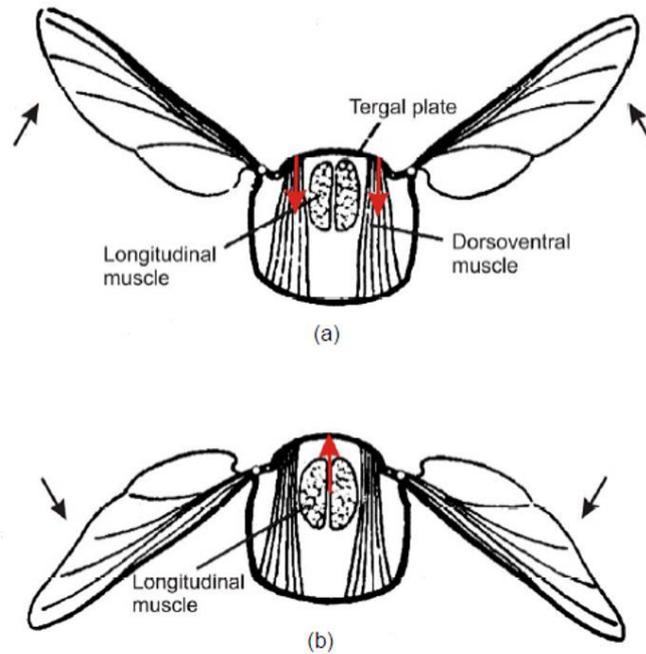


Figure 37 : Principe du vol indirect. Illustration d'une coupe transversale d'insecte. **A** : La contraction des muscles dorso-ventraux tire la plaque tergale vers le bas, ce qui provoque le soulèvement des ailes. **B** : la contraction des muscles longitudinaux pousse la plaque tergale vers le haut, ce qui provoque l'abaissement des ailes. (Mayr et al. 2012).

Chez les diptères, ce mode de vol permettant des battements d'ailes puissants et rapides est accompagné d'une certaine instabilité corporelle, et requiert un système mécanosenseur performant pour garder un contrôle précis des ailes. Les diptères ont ainsi développé des organes mécanosenseurs, dérivés des ailes postérieures se développant au niveau du troisième segment thoracique (T3) et qui joue un rôle de gyroscope : les « haltères ». Les haltères produisent des battements anti-phasiques à la même fréquence que celui des ailes et détectent les rotations durant le vol, ce qui permet de contrôler la rotation malgré la grande vitesse de battement des ailes (Leeuwen et Dickinson 1999 ; Deora, Singh, et Sane 2015).

Chez les diptères, les ailes se développent au niveau du second segment thoracique (T2), le domaine d'expression du gène Hox *Antp* au cours du développement. Cependant, en cas de perte de fonction de *Antp* dans les primordia d'ailes, les ailes se développent normalement (Carroll et al. 1995). Le segment T2 avec une aile est ainsi considéré comme un « groundstate », comme un état par défaut des segments du thorax, qui serait ensuite modifié par d'autres protéines Hox comme *Scr* et *Ubx* afin d'attribuer de nouvelles morphologies aux segments thoraciques (Tsubota, Saigo, et Kojima 2008 ; Tomoyasu 2017). Le gène Hox *Ubx* spécifie le développement de l'haltère au niveau du segment T3 en modifiant le programme développemental de l'aile (Weatherbee et al. 1998) (**Figure 38 A-B**). *Ubx* est aussi responsable de la différence entre les ailes antérieures (T2) et postérieures (T3) chez d'autres espèces d'insectes, telles que les motifs de pigmentation chez le lépidoptère *Precis Coenia* (Weatherbee et al. 1999) (**Figure 38 C-D**). Chez le coléoptère *Tribolium castaneum*, *Ubx*

réprime le développement par défaut de l'élytre, un appendice rigide et protecteur sur le segment T2 afin de promouvoir la formation des ailes au niveau du segment T3 (Tomoyasu et al. 2005) (**Figure 38 E-F**). Plus récemment, *Ubx* a été décrit pour être impliqué dans le dimorphisme des ailes chez le fulgoridé *Nilaparvata lugens* (la cicadelle brune), un ravageur du riz (Liu et al. 2020). Chez cette espèce, *NIUbx* (l'orthologue de *Ubx* chez *Nilaparvata lugens*) s'exprime dans les primordia des deux paires d'ailes sur les segments T2 et T3. Dans ce contexte atypique, *NIUbx* est sous le contrôle positif de la voie de signalisation de l'insuline : lorsque la source nutritive est de bonne qualité, *NIUbx* est très actif dans les primordia d'ailes, ce qui induit le développement d'ailes de petite taille. Lorsque la source nutritive est de moins bonne qualité, alors la voie de l'insuline active peu *NIUbx*, ce qui induit le développement d'ailes de grande taille, utiles pour migrer vers de nouvelles sources de nourriture (Liu et al. 2020 ; Fu et al. 2020) (**Figure 38 G-H**).

Il est donc considéré que les gènes Hox ne constituent ou n'instruisent pas directement le programme moléculaire spécifiant le développement des ailes ou des pattes, mais sont davantage impliqués dans leur suppression ou leur modification.

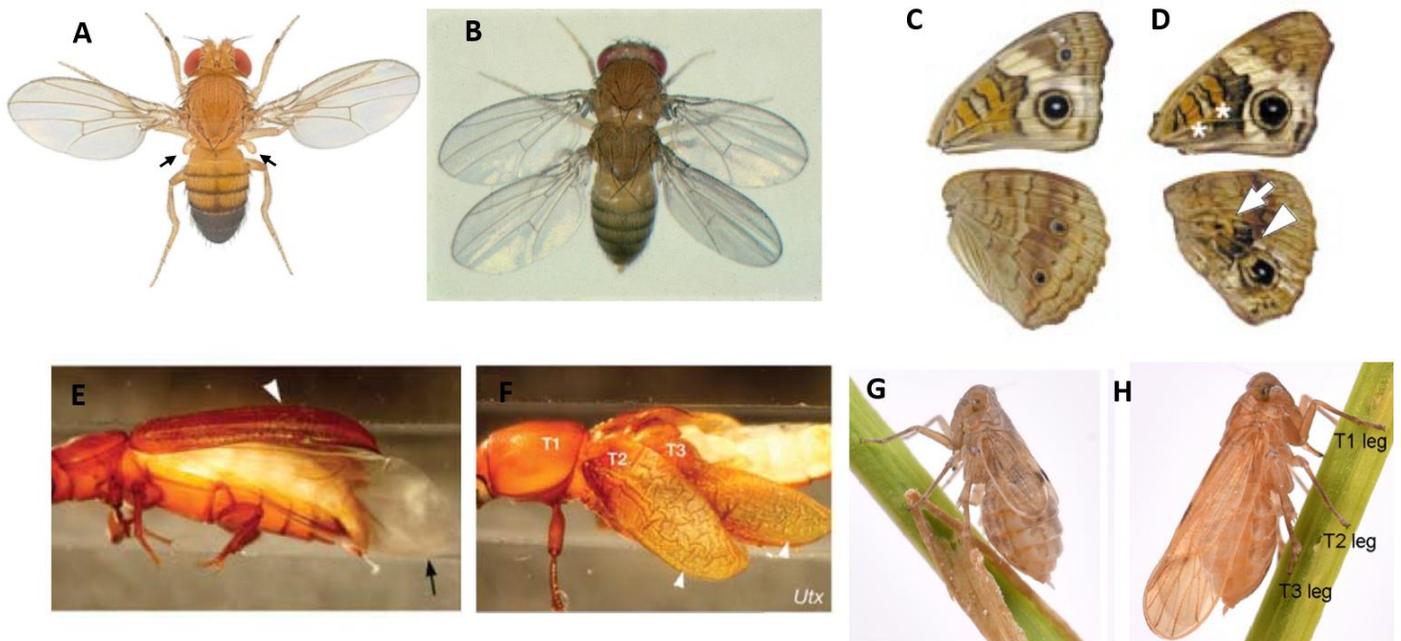


Figure 38 : Rôle de Ubx lors du développement des appendices de vol chez différentes espèces d'insectes. Illustration d'une coupe transversale d'insecte. **A** : Vue dorsale d'une drosophile sauvage. Le segment T2 produit une paire d'ailes, tandis que le segment T3 produit une paire d'haltères (indiquées par des flèches noires). **B** : La perte de fonction de Ubx due à la combinaison des mutations *anterobithorax*, *postbithorax* et *bithorax-3* transforme le segment T3 en un second segment T2. La drosophile possède alors deux paires d'ailes, il s'agit du fameux phénotype bithorax (Lewis 1982). **C** : Chez le papillon *Precis coenia*, les paires d'ailes antérieures et postérieures présentent des motifs de pigmentations différentes (ici au niveau des faces ventrales). **D** : Chez le mutant *Hindsight*, la perte de fonction de *Ubx* provoque l'apparition de motifs de pigmentation des ailes antérieures au niveau des ailes postérieures, notamment la présence de zones pigmentées orange (étoiles au niveau de l'aile antérieure, flèche au niveau de l'aile postérieure) (Weatherbee et al. 1999). **E** : Chez le coléoptère *Tribolium castaneum*, le segment T2 produit une paire d'élytres (flèche blanche), alors que le segment T3 produit une paire d'ailes (flèche noire). **F** : La perte de fonction de *Utx* (l'homologue de *Ubx* chez *T. castaneum*) provoque la transformation des ailes en une seconde paire d'élytres (Tomoyasu et al. 2005a). **G-H** : Chez le fulgoridé *Nilaparvata lugens*, on observe un dimorphisme de la taille des ailes, basé sur une régulation différentielle de l'activité de *Ubx*. **G** : Individu aux ailes courtes. **H** : Individu aux ailes longues (Fu et al. 2020).

4.2 Le développement des ailes chez la drosophile

Les ailes des drosophiles ne servent pas seulement au vol, mais sont aussi utiles par exemple lors de la parade nuptiale, au cours de laquelle les mâles produisent différentes vibrations et sons (impulsions, claquements des ailes...) de manière très stéréotypée au sein d'une espèce (Sturtevant 1915 ; Mazzoni, Anfora, et Virant-Doberlet 2013 ; Anholt et al. 2020). Chez certaines espèces de drosophiles comme *Drosophila sukukii*, *Drosophila biarmipes*, ou encore *Drosophila elegans*, les ailes présentent des taches de pigmentation (Fuyama 1979 ; Kopp et True 2002), dont les motifs sont basés sur la régulation de gènes tels que *yellow* ou *ebony* (Wittkopp, True, et Carroll 2002 ; Gompel et al. 2005). La présence de motifs de pigmentation au niveau des ailes a été acquise puis perdue indépendamment de multiples fois au cours de l'évolution des drosophiles (Prud'homme et al. 2006). Chez les espèces présentant ce type de

pigmentation, les mâles font preuve d'un comportement d'exhibition des ailes au cours de la parade nuptiale, tandis que ce comportement est absent chez les espèces dépourvues de taches de pigmentation, ce qui implique une co-évolution entre la pigmentation des ailes et le comportement (Yeh, Liou, et True 2006). Les ailes sont aussi employées au cours de comportements d'agression (Nilsen et al. 2004), par exemple lorsqu'une femelle n'est pas réceptive à la parade d'un mâle et déploie ses ailes pour l'intimider tout en chargeant vers lui (Sturtevant 1915), mais également au cours des combats entre les mâles lors de l'établissement de rapports de dominance ou lorsqu'ils courtisent la même femelle. Ils déploient alors leurs ailes afin de menacer leur opposant (Chen et al. 2002). Lors des combats, les ailes subissent souvent des dommages, réduisant la capacité des mâles à se reproduire et à voler (Davis et al. 2018). Les ailes sont aussi utilisées afin de détecter les menaces telles que des parasites de type acariens. La stimulation mécanique des poils sensitifs au niveau de la marge de l'aile déclenche un réflexe d'expulsion à l'aide d'un coup de patte extrêmement rapide et précis (Li et al. 2016).

Chez la drosophile, les organes de l'adulte (ou *imago*) apparaissent au cours de la métamorphose à partir de sacs de cellules originelles, appelés disques imaginaux. L'identité de chaque disque est définie précocement par des gènes sélecteurs, et une expression anormale de ces gènes peut provoquer le phénomène de trans-détermination (Morata 2001) (Beira et Paro 2016) (**Figure 39**).

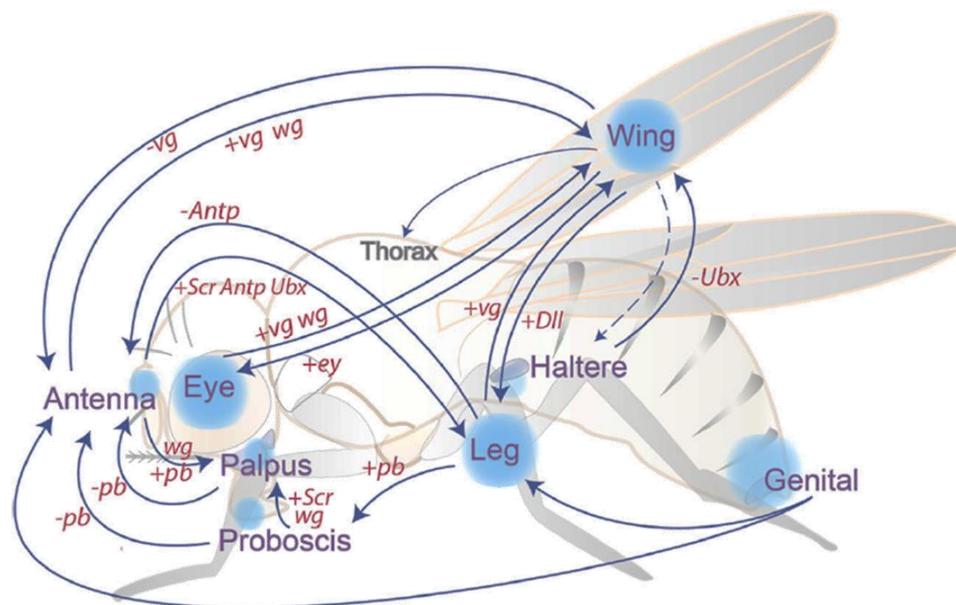


Figure 39 : Vue d'ensemble des phénomènes de trans-détermination. Certaines manipulations génétiques provoquent la trans-détermination de différents tissus de la drosophile (les flèches connectant les cercles bleu). C'est particulièrement le cas de la perte (-) ou du gain (+) de fonction de gènes sélecteurs ou homéotiques (*Ubx* : *Ultrabithorax* ; *Antp* : *Antennapedia* ; *pb* : *proboscipedia* ; *Scr* : *Sex combs reduced* ; *ey* : *eyless* ; *Dll* : *Distalless* ; *vg* : *vestigial* ; *wg* : *wingless*). (Beira et Paro 2016).

Le disque imaginal d'aile est une monocouche de cellules épithéliales indifférenciées et proliférantes, entourée d'une membrane péripodiale protectrice. Au cours du développement

embryonnaire, le disque contient entre une vingtaine et une quarantaine de cellules, pour passer à environ 50 000 à la fin du troisième stade larvaire (Martin 1982 ; Aegerter-Wilmsen et al. 2007). Le développement du disque imaginal d'aile est coordonné par la structuration des deux axes antéro-postérieur (AP) et dorso-ventral (DV), établissant des frontières entre compartiments dorsaux/ventraux et antérieurs/postérieurs. Le « pouch », la zone au centre du disque imaginal, est le territoire présomptif de la partie la plus distale de l'aile, tandis que les parties périphériques du disque imaginal donneront les zones les plus proximales de l'aile (le « hinge », qui connecte l'aile au thorax) ainsi que la partie thoracique de l'aile (notum). Lors de son développement, le disque imaginal d'aile s'invagine et se replie sur lui-même afin de former les deux couches de cellules de l'aile. Au début de la pupariation, les deux couches de cellules se rejoignent et rentrent en contact tout en laissant des espaces qui formeront les veines (Blair 2007) (Bolatto, Parada, et Colmenares 2017) (**Figure 40**).

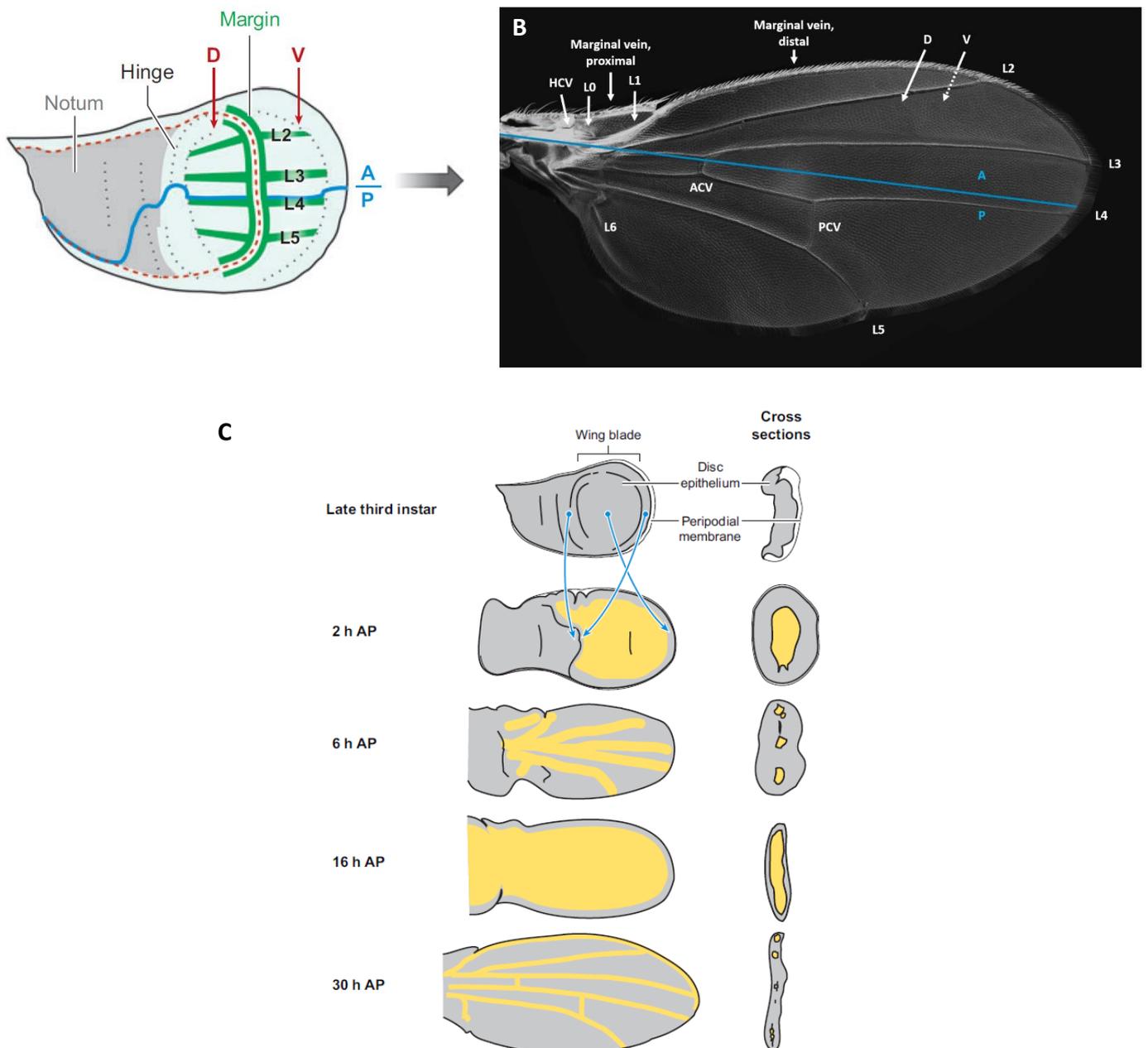


Figure 40 : Morphogenèse de l'aile de drosophile. **A** : Schéma d'un disque imaginal d'aile au stade L3 tardif. La position des veines longitudinales est déjà établie (L2-5), tout comme les compartiments dorsal (D), ventral (V), antérieur (A) et postérieur (P). **B** : morphologie de l'aile adulte illustrée par un cliché de microscopie électronique annoté. Les veines (L0-6) sont annotées, de même que les veines marginales présentant des poils sensitifs, ainsi que les veines transversales (ou « crossveins ») humérale (HCV), antérieure (ACV) et postérieure (PCV). **C** : au cours de la morphogenèse de l'aile, les espaces entre les feuillettes de cellules ventrales et dorsales sont indiqués en jaune. Les flèches entre le stade L3 tardif (« late third instar ») et l'aile deux heures après pupariation (2h AP) montrent comment au cours de l'éversion, les portions dorsales et ventrales présomptives du disque imaginal se replient afin de former les surfaces dorsales et ventrales de l'aile. Adapté à partir de Blair 2007.

Dans le disque d'aile, les centres de signalisations moléculaires se trouvent au niveau des frontières entre les compartiments AP et DV. Les cellules à la frontière AP mettent en place une cascade de signalisation spécifiant le développement le long de l'axe AP. Le facteur *engrailed* (*en*) est exprimé dans le compartiment postérieur du disque. *en* active *hedgehog* (*hh*) et réprime *cubitus interruptus* (*ci*), le médiateur de la signalisation hedgehog dans les cellules postérieures où il est exprimé. À l'inverse, l'absence d'activité de *en* dans les cellules antérieures les poussent à sécréter le morphogène Decapentaplegic (Dpp) (une protéine de type TGF- β) en réponse à la signalisation Hedgehog qui leur provient du compartiment antérieur (**Figure 41A**). Cela se fait par l'intermédiaire de *ci*, qui n'est pas réprimé par *en* dans le compartiment antérieur. Cela produit un gradient du morphogène Dpp de part et d'autre de la frontière AP (Blair 1992 ; Zecca, Basler, et Struhl 1995). Dpp régule la localisation de l'expression de *Spalt-related* (*Sal*) et *Optomotor blind* (*Omb*) via des effets de signalisation à courte et longue distance (Sturtevant et al. 1997 ; del Álamo Rodríguez, Terriente Felix, et Díaz-Benjumea 2004 ; Shen et al. 2008) (**Figure 41B**). L'activité de ces gènes permet notamment de définir les territoires d'expression de gènes tels que *brinker* (*brk*) (Cook, Biehs, et Bier 2004) ou *knirps* (*kni*) (Lunde et al. 1998 ; Xu et al. 2017 ; Martín, Ostalé, et Celis 2017) (**Figure 41C**), tandis que Hh active également *knot* (*kn*) à proximité de l'axe AP (Mohler et al. 2000). Ce réseau moléculaire permet le développement coordonné de l'aile le long de l'axe AP ainsi que le bon positionnement des veines de l'aile, notamment en définissant très finement le profil d'expression de *rhomboid* (*rho*) (Sturtevant, Roark, et Bier 1993) (**Figure 41D**).

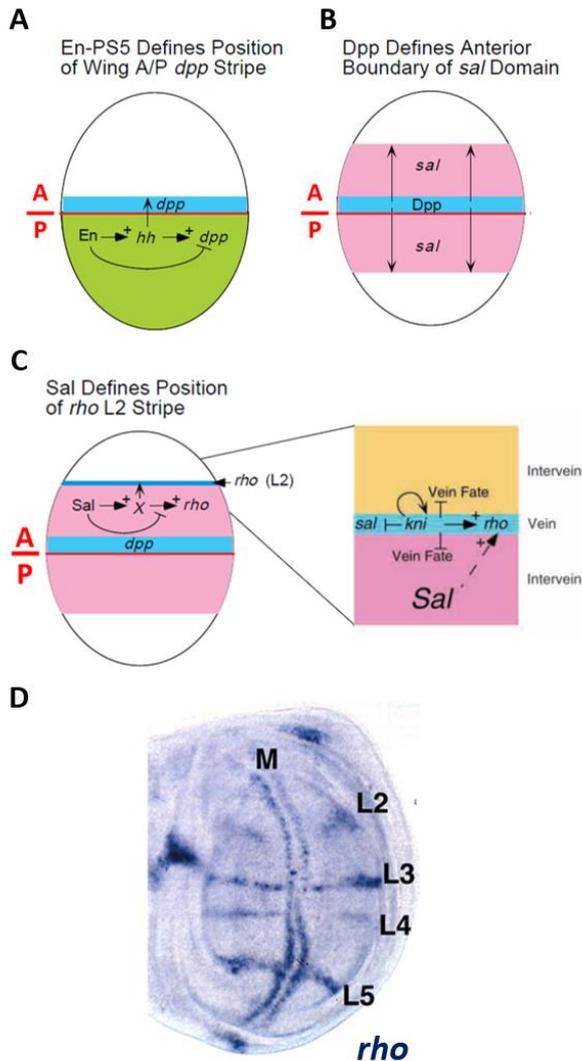


Figure 41 : La voie de signalisation Dpp contrôle le développement de l'axe antéro-postérieur des ailes de drosophile. A : *engrailed* (*en*) s'exprime dans le compartiment postérieur du disque imaginal d'aile, où il active *hedgehog* (*hh*), activant à son tour *decapentaplegic* (*dpp*) au niveau d'une bande étroite le long de l'axe AP. Engrailed réprime *dpp* dans le compartiment postérieur. **B :** la diffusion de Dpp à partir de la frontière AP détermine la limite de la zone d'expression de *spalt* (*sal*). **C :** La limite antérieure de l'expression de *sal* détermine le domaine d'expression de *rhomboid* (*rho*) au niveau du primordium de la seconde veine longitudinale (L2), par l'intermédiaire de l'activation de *knirps* (*kni*) jouant également un rôle dans la délimitation nette du domaine d'expression de *sal* en produisant un rétrocontrôle négatif. **D :** L'activation de *rho* est également localisée au niveau des territoires présomptifs de la marge de l'aile (M) ainsi que des veines longitudinales dès le troisième stade larvaire (L2-5), et est nécessaire à leur développement. Adapté à partir de Sturtevant et al. 1997, Lunde et al. 1998 et Lunde et al. 2003.

De manière analogue, l'axe DV se développe à l'aide d'un réseau moléculaire s'organisant autour de la frontière entre les compartiments dorsal et ventral. Le gène *apterous* (*ap*) est exprimé dans le compartiment dorsal du disque imaginal d'aile depuis le premier stade larvaire, et définit l'identité dorsale (**Figure 42A**). *apterous* induit l'expression de *Serrate* (*Ser*), codant pour un ligand de Notch (N) dans les cellules dorsales, et restreint l'expression du ligand Delta (*Dl*) aux cellules ventrales (**Figure 42B**). La signalisation Notch induit l'expression de *Wingless* (*Wg*) au niveau de la frontière dorso-ventrale, agissant comme un morphogène de manière similaire à *Dpp* autour de l'axe AP (Micchelli et Blair 1999). *Wg* régule l'expression de *Dl* et *Ser* au niveau de la frontière pour maintenir sa propre expression (**Figure 42C**). *Wg* active également différents gènes à des points précis de son territoire d'activité le long de l'axe DV, tels que *vestigial* (*vg*), un gène favorisant le développement de l'aile, dont l'expression se localise dans une large bande autour de l'axe DV, au niveau de la marge présomptive de l'aile (Couso, Knust, et Martinez Arias 1995).

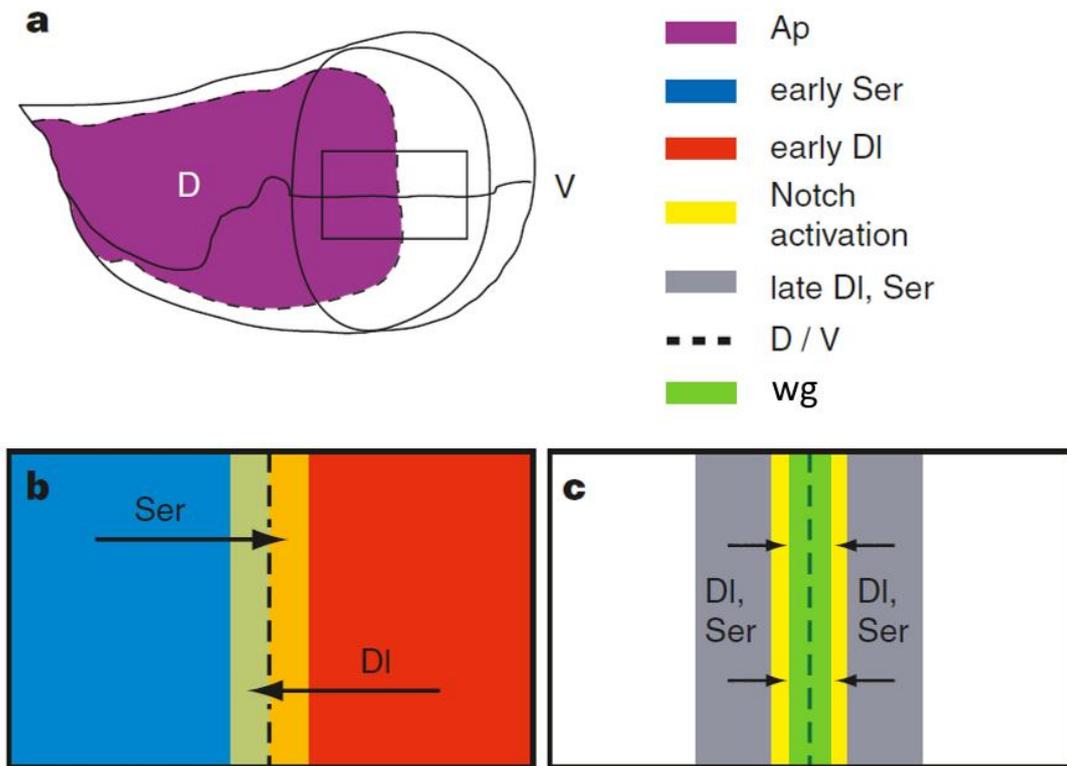


Figure 42 : La voie de signalisation Notch contrôle le développement de l'axe dorso-ventral des ailes de drosophile.
A : *apterous (ap)* s'exprime dans le compartiment dorsal (D) du disque imaginal d'aile. **B :** *ap* induit l'expression de *Serrate (Ser)* dans le compartiment dorsal, qui y réprime *Delta (DI)*, restreignant l'expression de *DI* au compartiment ventral (V). **C :** ces signaux induisent l'activation de *wingless (wg)* au niveau de la frontière dorso-ventrale (D/V). Adapté à partir de Micchelli et Blair 1999.

4.3 Rôle du gène *Ubx* au cours du développement de l'haltère

Chez les diptères, qui sont parmi les ordres d'insectes les plus récemment apparus (Zdobnov et Bork 2007) (**Figure 43**), la paire d'ailes postérieures est réduite en un petit organe mécanosenseur appelé « haltère ». Contrairement aux ailes, les haltères n'ont pas de rôle direct pour le vol, mais jouent un rôle de gyroscope permettant aux diptères de stabiliser leurs rotations durant le vol. Chez la drosophile, le contrôle visuel du vol est modulé par une boucle de rétroaction basée sur des signaux de proprioception, notamment gyroscopiques, fournis par les haltères, ce qui permet un contrôle du vol très efficace (Mureli et Fox 2015 ; Bartussek et Lehmann 2016). Les haltères sont ainsi très différents des ailes quant à leur fonction et leur morphologie. Outre le fait que les haltères sont bien plus petites que les ailes, la partie la plus distale des haltères, le capitellum, est de forme sphérique, tandis que l'aile est plate et constituée de deux couches de cellules (Roch et Akam 2000). Contrairement aux ailes, les haltères ne présentent pas de veines ni d'inter-veines, ni de marge dotée de poils mécanosenseurs (« bristles ») (Weatherbee et al. 1998 ; Li et al. 2016) (**Figure 44**).

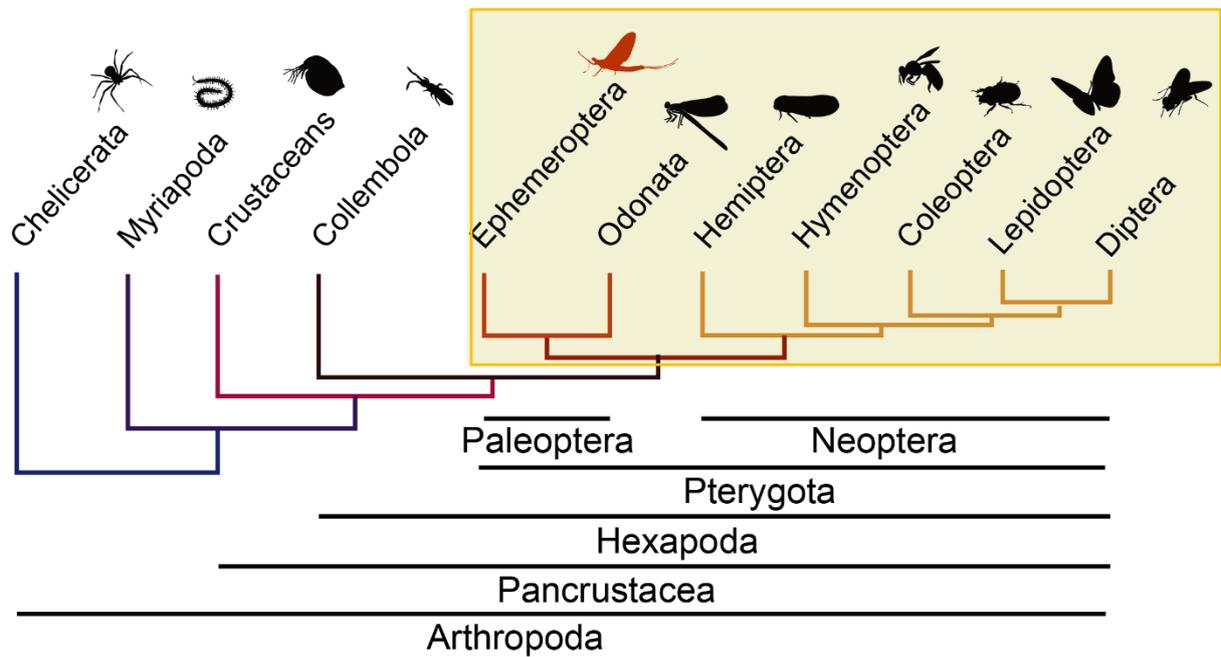


Figure 43 : Arbre phylogénétique simplifié des arthropodes. Les ptérygotes sont indiqués par le rectangle orange. Adapté à partir de Almudi et al. 2020.

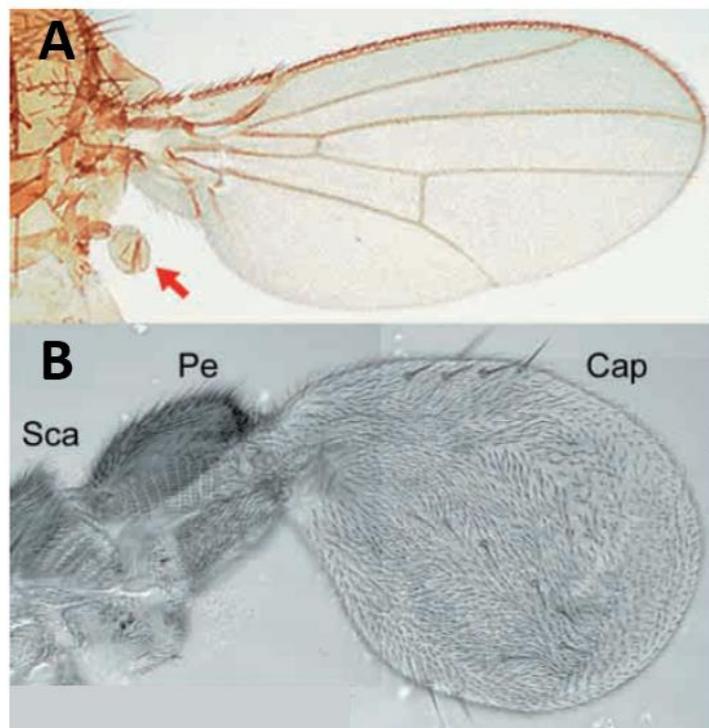


Figure 44 : Positionnement et morphologie de l'haltère. A : Vue dorsale du thorax de drosophile, montrant les appendices de vol. L'haltère (flèche rouge) est situé postérieurement par rapport à l'aile. B : L'haltère est constitué de trois parties de cuticule distinctes : le scabellum (Sca), le pedicellus (Pe) et le capitellum (Cap), de la plus proximale à la plus distale. Adapté à partir de Roch et Akam 2000.

Ultrabithorax (Ubx) spécifie l'identité du troisième segment thoracique (T3) chez les insectes. Il est nécessaire au bon développement des appendices qui se développent à ce niveau (Weatherbee et al. 1999 ; Tomoyasu et al. 2005). Chez la drosophile, *Ubx* est exprimé dans les disques imaginaux d'haltères, mais pas dans les disques imaginaux d'ailes (sauf dans la membrane péripodiale, qui ne contribue pas directement au développement de l'aile) (**Figure 45A**). La perte de fonction de *Ubx* au niveau du segment T3 provoque la transformation des haltères en ailes (Lewis 1963 ; Cabrera, Botas, et Garcia-Bellido 1985 ; White et Akam 1985 ; White et Wilcox 1985) (**Figure 45B**). Son activation ectopique au niveau du segment T2 provoque à l'inverse une transformation des ailes en haltères (Lewis 1955 ; Lewis 1982 ; Micol et García-Bellido 1988 ; González-Gaitán, Micol, et García-Bellido 1990) (**Figure 45B**).

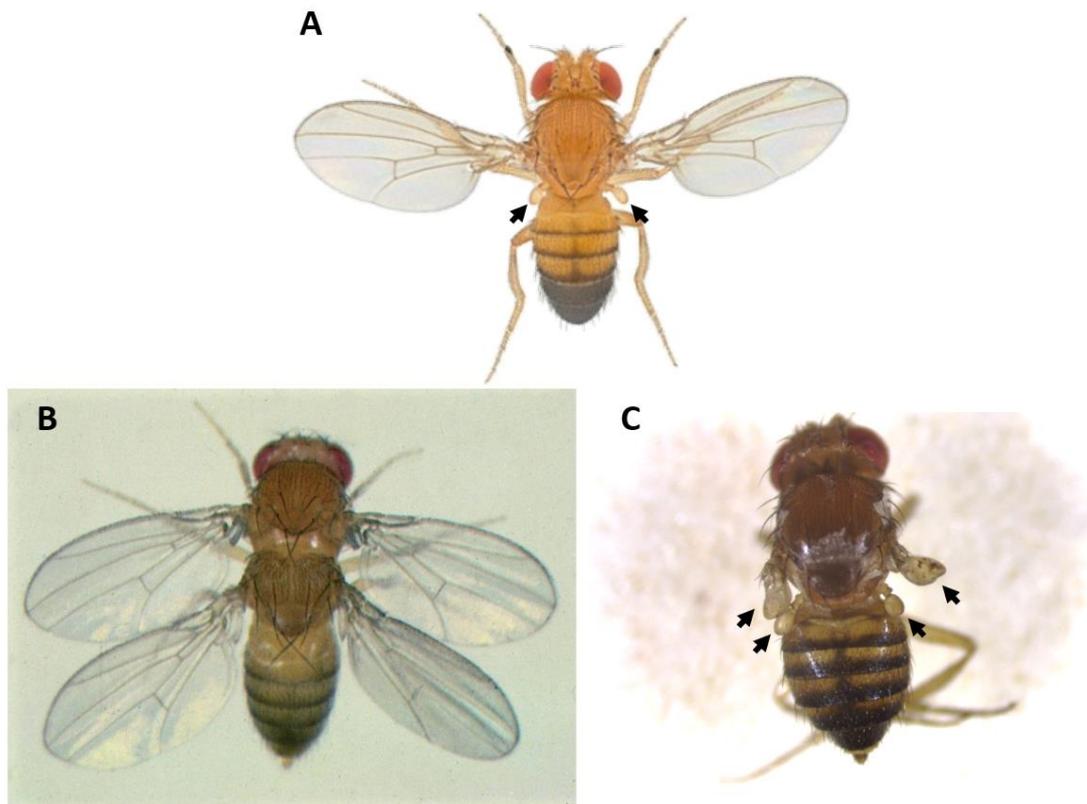


Figure 45 : *Ubx* spécifie l'identité de l'haltère. **A :** Vue dorsale d'une drosophile sauvage. Les haltères sont indiqués par des flèches noires. **B :** La perte de fonction de *Ubx* due à la combinaison des mutations *anterobithorax*, *postbithorax* et *bithorax-3* transforme le segment T3 en un second segment T2. La drosophile possède alors deux paires d'ailes, il s'agit du fameux phénotype bithorax. **C :** Le gain de fonction de *Ubx* au niveau du second segment thoracique dû à la mutation *Ubx^{HM}* provoque la transformation des ailes en organes semblables à des haltères. Adapté à partir de Lewis 1982.

Plus tardivement, chez la puppe, *Ubx* contrôle le développement de petits organes mécanosenseurs, les sensilles campaniformes (SC), au niveau des parties les proximales de l'haltère. Ces organes sont composés d'un dôme de cuticule auquel est relié un neurone sensoriel. Il existe différents types de SC, en fonction de leur morphologie et de leur orientation, ce qui les rend sensibles à des stress mécaniques différents et à des déformations

très spécifiques de la cuticule. Les SC sont organisées sous forme de complexes répartis de manière stéréotypée le long des ailes et des haltères (Cole et Palka 1982). On retrouve des complexes de SC au niveau des deux segments les plus proximaux de l'haltère (le *scabellum* et le *pedicellus*), qui sont homologues aux complexes de SC retrouvés au niveau de l'aile. (Cole et Palka 1982). Ubx est nécessaire au développement des SCs de l'haltère au cours de la pupariation, et la perte de fonction de Ubx à ce moment précis transforme les SCs de l'altère en SCs semblables à celles retrouvées sur l'aile. Inversement, l'activation ectopique de Ubx dans l'aile en pupariation induit la transformation de SCs de l'aile en SCs de l'altère (Roch et Akam 2000).

Ubx agit à différents niveaux du programme développemental de l'aile, réprimant des gènes impliqués dans la spécification dorso-ventrale du disque, régulant la taille de l'organe, sa forme, ainsi que la formation de bristles (Prasad, Bajpai, et Shashidhara 2003 ; Mohit et al. 2006). L'aile et l'altère sont donc des organes homologues en série, dont le développement différentiel repose sur une modulation par Ubx d'un programme développemental par défaut. De manière plus générale, la modification de programmes développementaux permettant le développement de différentes structures homologues en série est un moteur essentiel de la diversification morphologique au cours de l'évolution, qui a largement contribué à l'adaptation des insectes à de nombreuses niches écologiques (Ohde, Yaginuma, et Niimi 2013 ; Tomoyasu et al. 2017 ; Hu, Linz, et Moczek 2019).

L'origine du gène *Ubx* peut être retracée au cours de l'évolution bien avant l'apparition des insectes et de leur schéma corporel. On le retrouve notamment chez les crustacés où il participe également au développement du tronc, mais sans y spécifier de différence entre les différents segments (Averof et Akam 1995). On le retrouve impliqué dans le schéma corporel des arthropodes de manière générale, notamment dans la régulation du développement des membres (Ronshaugen et al. 2002), et aussi chez le groupe frère des arthropodes qu'est celui des onychophores, ce qui suggère une origine de *Ubx* antérieure à la divergence arthropodes/onychophores (Grenier et al. 1997) (**Figure 46**). L'orthologue de *Ubx* provenant d'un onychophore (*OUbx*), *Acanthokara kaputensis*, exprimé artificiellement chez la drosophile, peut provoquer des transformations d'antennes en pattes, et d'aile en haltère de manière similaire à *Ubx* de drosophile. Cependant, contrairement à *Ubx*, *OUbx* n'est pas capable de transformer l'ectoderme embryonnaire thoracique en ectoderme abdominal, ni de réprimer le gène *Distal-less (Dll)*, sélecteur des pattes au niveau thoracique. Des expériences utilisant des protéines chimères entre *Ubx* et *OUbx*, notamment une protéine *Ubx* dont l'homéodomaine est remplacé par celui de *OUbx*, montrent que ces divergences fonctionnelles sont dues à des régions de *Ubx* extérieures à l'homéodomaine, qui reste quand à lui très conservé à la fois fonctionnellement et en termes de séquence (Grenier et Carroll 2000).

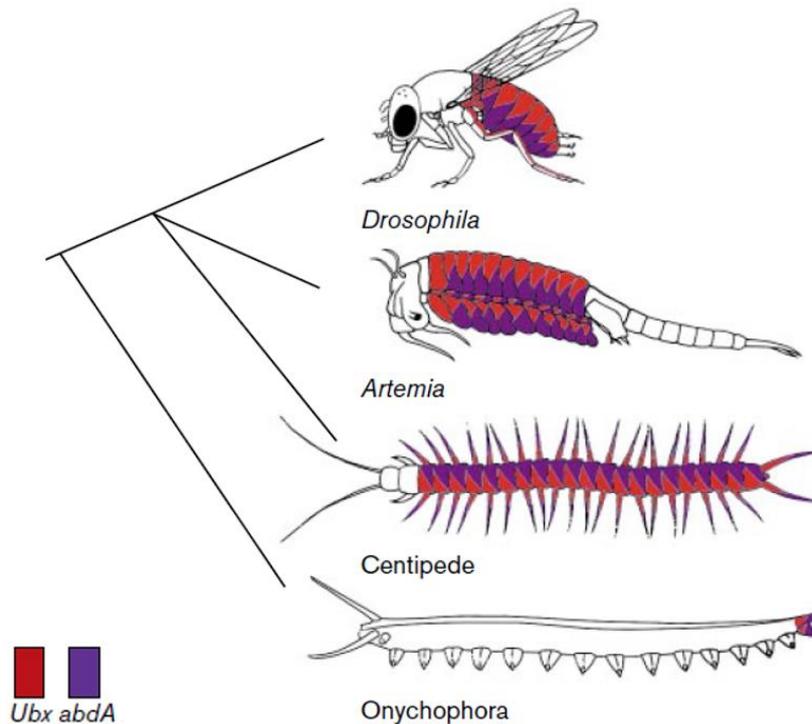


Figure 46 : Implication des gènes *Ubx* et *abdA* dans le schéma corporel des arthropodes. Les domaines d'expression des gènes *Ubx* (en rouge) et *abdA* (en violet) sont indiqués sur les schémas corporels de différents arthropodes et d'un onychophore. Lorsque les profils d'expression de *Ubx* et *abdA* se chevauchent (drosophile et artémie) ou ne sont pas distinguables (centipède et onychophore), les deux couleurs sont représentées. La limite antérieure de l'expression de *Ubx/abdA* varie selon les espèces, et est toujours corrélée avec une transition de la morphologie des appendices le long de l'axe antéro-postérieur. Adapté à partir de Grenier et al. 1997.

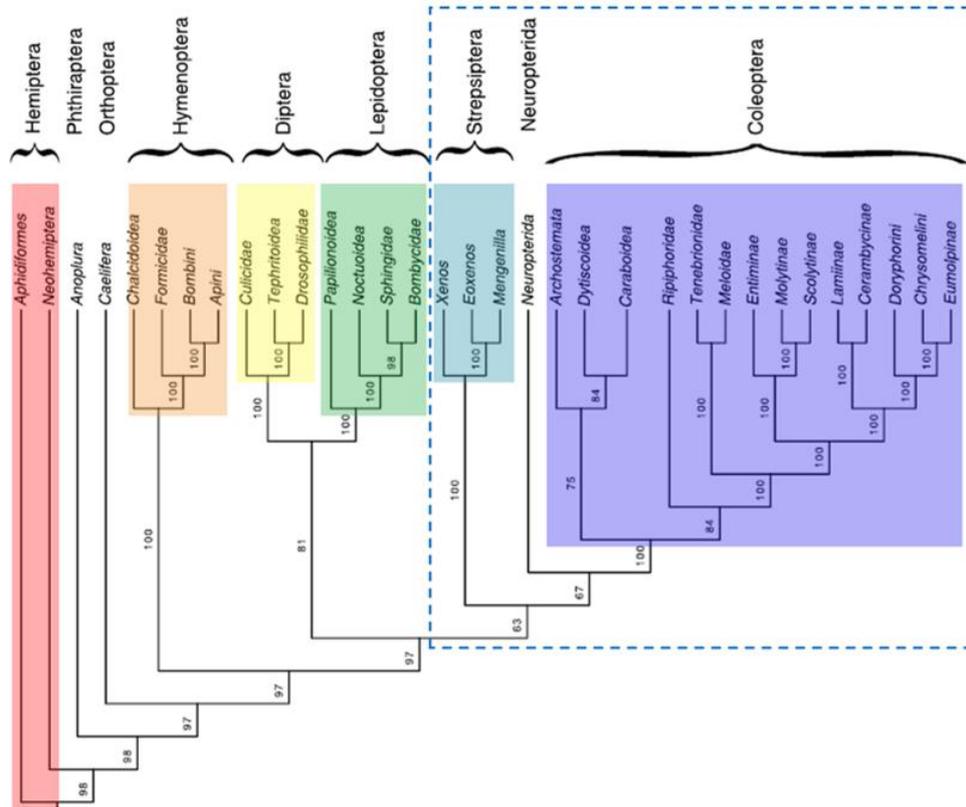
De nombreuses études ont tenté d'élucider les gènes cibles de *Ubx*. Les premières études ont utilisé des approches par gène candidat, identifiant avec succès des gènes cibles impliqués dans la mise en place des axes AP (voie de signalisation *Dpp*) et DV (voie de signalisation *Wg*) au cours du développement des ailes (Weatherbee et al. 1998 ; Shashidhara et al. 1999). D'autres études ont ensuite montré que la protéine *Ubx* se lie au niveau d'éléments cis-régulateurs des gènes *Spalt* et *Knot*, nécessaires au développement des ailes (Galant et al. 2002 ; Hersh et Carroll 2005). Enfin, des études ont ensuite tenté des approches à plus large échelle, basées notamment sur des puces à ADN, ont permis d'identifier un plus grand nombre de gènes cibles directs et indirects de *Ubx*. Certains ont cherché à identifier les gènes différentiellement exprimés entre les disques imaginaux d'ailes et d'haltères afin de révéler les cibles potentielles de *Ubx* dans le disque d'haltère (Mohit et al. 2006 ; Crickmore et Mann 2006). Une autre étude a cherché à identifier les gènes cibles exprimés différents moments du développement des ailes et des haltères (larve, pré-pupe et puppe) pour identifier plus spécifiquement les gènes cibles de *Ubx* au cours du développement de l'haltère. Cette étude a montré qu'au cours des différentes étapes du développement de l'haltère, *Ubx* provoque la diminution ou l'augmentation de centaines de gènes différents (Pavlopoulos et Akam 2011), tel un « micromanager » (Akam 1998). Elle a permis d'identifier des voies de signalisations essentielles pour le développement de l'haltère. *Ubx* restreint notamment la croissance de l'haltère afin d'en faire un organe de petite taille en limitant la diffusion du morphogène *Dpp*. Cela a lieu en augmentant l'expression du gène codant pour un récepteur de *Dpp*, *thickveins* (*tkv*), et par la répression du gène *division abnormally delayed* (*dally*) impliqué dans sa circulation.

La différence de taille entre les ailes et les haltères est visible tout au long du développement, les disques imaginaux d'ailes contenant environ 50 000 cellules en fin de stade larvaire, alors que les disques imaginaux d'haltères n'en contiennent qu'environ 10 000 (Martin 1982). Des expériences de séquençage après immunoprécipitation de la chromatine (ChIP-seq) suggèrent que les gènes *dally* et *tkv* sont des cibles directes de Ubx (ChIP-seq) (Crickmore et Mann 2006 ; Makhijani et al. 2007). Ubx se lie au niveau des séquences cis-régulatrices du gène *CG13222* (*Cuticular protein 47Ee* ou *Cpr47Ee*) et régule son expression positivement dans le disque imaginal d'haltère. Cela illustre le fait que Ubx ne fait pas que réprimer des gènes acteurs du développement des ailes, mais active également de nouveaux acteurs requis pour le développement de l'haltère (Hersh et al. 2007a). La régulation des voies Hippo et Akt par Ubx permet aussi de réguler la taille de l'organe. Cela passe par la modulation de facteurs de signalisation, comme le gène *yorkie* (*yki*), *expanded* (*ex*) et le microARN *bantam* (*ban*), impliqués dans la prolifération, la survie cellulaire (Slattery, Ma, et al. 2011) et le contrôle de la taille des organes (Zhang, Yue, et Jiang 2009). Ces voies de signalisations contrôlent aussi spécifiquement des caractères comme l'organisation des trichomes, qui reflètent l'identité de l'haltère (Singh, Sánchez-Herrero, et Shashidhara 2015). Plus généralement, les études de ChIP-seq accompagnées de transcriptome ont fourni une liste complète des gènes cibles directs de Ubx au cours du développement des haltères (Slattery, Ma, et al. 2011 ; Choo, White, et Russell 2011 ; Agrawal et al. 2011). Un grand nombre des gènes cibles de Ubx codent eux-mêmes pour des facteurs de transcription (FT) et/ou des composants essentiels des voies de signalisation. De plus, certains motifs reconnus par les FTs tels que Homothorax (Hth), Trithorax-like (Trl, GAGA-factor/GAF) ou Mother Against Decapentaplegic (MAD) sont enrichies à proximité des séquences liées par Ubx. Cela suggère que Ubx s'associe avec un certain nombre d'autres FTs pour la réguler ses gènes cibles (Mann, Lelli, et Joshi 2009 ; Merabet et Mann 2016).

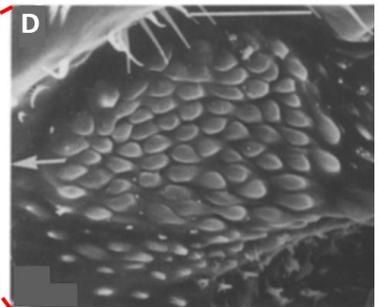
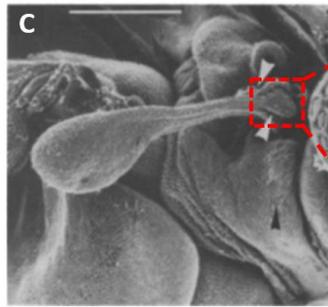
La forme sphérique et la taille réduite des haltères les différencient des ailes de manière frappante. Des travaux ont montré que la forme caractéristique des haltères pouvait résulter de l'activité de Ubx au niveau de certains composants de la matrice extracellulaire (MEC) (De Las Heras et al. 2018). Ces composants de la MEC sont produits par les corps gras et acheminés vers les disques imaginaux via l'hémolymphe. Ubx semble donc contrôler la stabilité des composants de la MEC en réprimant l'expression du gène *Mmp1* (*Matrix Metalloprotease 1*) au niveau du pouch du disque imaginal d'haltère. *Mmp1* est une enzyme contrôlant le renouvellement de la MEC en dégradant ses composants et est abondante dans le disque d'aile. La répression de *Mmp1* par Ubx permet d'augmenter la persistance des éléments de la MEC, ce qui limite l'expansion du disque d'haltère, tout en empêchant l'apposition des couches de cellules dorsales et ventrales nécessaires pour la formation d'une aile plate. La répression de *Mmp1* permet ainsi à Ubx de contrôler la morphologie de l'haltère directement en jouant sur la vitesse de dégradation de la MEC (De Las Heras et al. 2018).

L'haltère est apparu indépendamment au moins deux fois au cours de l'évolution, chez les diptères mais aussi chez un groupe d'insectes plus proche phylogénétiquement des coléoptères : les strepsiptères (Wigglesworth 1946 ; Wiegmann et al. 2009 ; McKenna et Farrell 2010) (**Figure 47A**). Ces insectes énigmatiques ont un mode de vie basé sur le parasitisme entomophage. Ils sont capables de parasiter des hôtes divers (plus de 34 familles d'insectes, appartenant à 7 ordres différents, tels que certaines guêpes) et présentant un dimorphisme sexuel extrême. Alors que le mâle se métamorphose en *imago* capable de voler après avoir émergé de son hôte, la femelle vit en total endoparasite de son hôte et présente une forme de pédomorphose, la néoténie : elle reste sous une forme larvaire, tout en ayant atteint la maturité sexuelle (Chafino et al. 2018 ; Kathirithamby 2018). Le mâle adulte présente un schéma corporel inverse de celui des diptères au niveau des appendices thoraciques : une paire d'haltères au niveau du segment T2, et une paire d'ailes au niveau du segment T3 (**Figure 47 B et E**). Les haltères des strepsiptères sont très similaires à ceux des diptères tant en termes de morphologie qu'en termes de fonction (Pix, Nalbach, et Zeil 1993) (**Figure 47 C, D, F, et G**). Ceci est un exemple frappant de convergence évolutive, cependant le rôle des gènes Hox dans ce processus reste sujet à spéculations : est-ce l'orthologue de *Ubx* qui est ici responsable du développement de l'haltère en s'exprimant dans le segment T2, ou bien l'orthologue de *Antp* s'exprimant dans le segment T2 qui a acquis la fonction de spécifier le développement de l'haltère ? (Akam et al. 1994) Le fait que cet organisme soit rare et difficile à collecter est un obstacle majeur pour répondre à cette question (Yarger et Fox 2016).

A



B



E

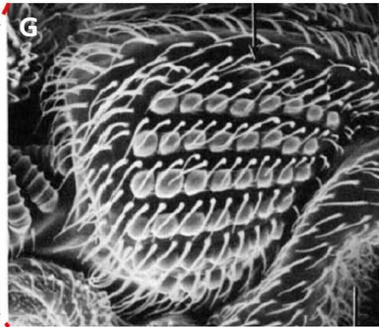
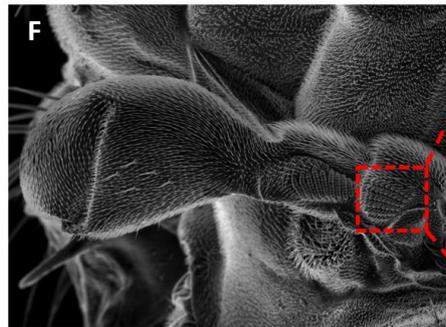
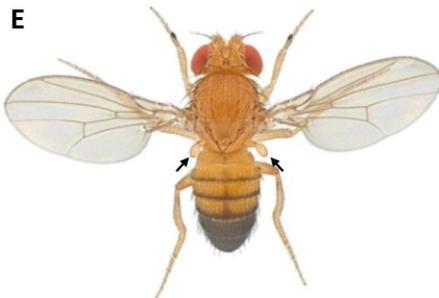


Figure 47 : Convergence évolutive entre les haltères des diptères et des strepsiptères. **A** : Arbre phylogénétique de la classe des insectes. Le rectangle en tiret souligne le fait que les strepsiptères sont plus apparentés aux coléoptères qu'aux diptères. Adapté à partir de Boussau et al. 2014. **B** : Vue dorsale d'un strepsiptère mâle adulte. Les haltères (flèches noires) se développent au niveau du second segment thoracique, antérieurement par rapport aux ailes. Adapté à partir de McKenna et Farrell 2010. **C** : Cliché de microscopie électronique à balayage d'un haltère de strepsiptère (*Xenos vesparum*). Les flèches indiquent les champs dorsaux et ventraux de sensilles campaniformes présents au

niveau proximal de l'appendice. **D** : Agrandissement du champ ventral de sensilles campaniformes. Adapté à partir de Pix, Nalbach, et Zeil 1993. **E** : Vue dorsale d'une drosophile sauvage. Les haltères sont indiqués par des flèches noires. **F** : Cliché de microscopie électronique à balayage d'un haltère drosophile. On observe également la présence de champs de sensilles campaniformes. **G** : Agrandissement d'un champ de sensilles campaniformes proximal. Cela illustre la similarité morphologique entre les haltères de strepsiptères et de diptères, malgré leur apparition indépendante au cours de l'évolution. Adapté à partir de Cole et Palka 1982.

Chapitre II : Résultats

Partie 1 : Hox dosage and the control of flight appendage morphology in insects

Cet article est issu du projet de recherche principal d'une autre étudiante en thèse, Rachel Paul, auquel j'ai pu contribuer. Pour cela, j'ai réalisé les expériences mettant en évidence la régulation de *Antp* par Hth (**Expanded view 9**) à l'exception de l'analyse des données de CHIP-Seq et de FAIRE-Seq. J'ai réalisé les immunomarquages en contexte d'augmentation de la dose de *Antp* (**Figure 3G**). J'ai participé à l'acquisition des immunomarquages de Ubx et *Antp* chez les différentes espèces étudiées, ainsi qu'à la prise de clichés illustratifs et servant à la mesure de leurs organes de vol. J'ai également participé aux dissections nécessaires pour réaliser les PCR quantitatives (**Figure 1**). J'ai acquis les images ayant permis la mesure des ailes de drosophile sauvages et lors de la perte de fonction de *Antp* (**Expanded view 8 D'**). J'ai acquis les clichés de microscopie électronique, à l'exception de ceux de **Expanded view 10**.

Hox dosage controls flight appendage diversification in insects

Rachel Paul^{1*}, Guillaume Giraud^{1*}, Katrin Domsch², Marilyne Duffraisse¹, Frédéric Marmigère¹, Soumen Khan³, Solene Vanderperre¹, Ingrid Lohmann², Robby Stoks⁴, LS Shashidhara^{3,5} and Samir Merabet^{1,*}

¹ IGFL, ENS Lyon, UMR5242, 32 Av. Tony Garnier, 69007 Lyon, France

² University of Heidelberg, Centre for Organismal Studies (COS) Heidelberg
Department of Developmental Biology, Im Neuenheimer Feld 230, D-69120 Heidelberg
Germany

³ Indian Institute of Science Education and Research (IISER), Dr. Homi Bhabha Road,
Pashan, Pune 411 008, INDIA

⁴ Laboratory of Aquatic Ecology, Evolution and Conservation, Charles Deberiotstraat 32 -
box 2439, 3000 Leuven, Belgium

⁵ Ashoka University, Sonipat 131029, India

* These authors contributed equally to this work

* Correspondence: samir.merabet@ens-lyon.fr

Abstract

Flying insects have invaded all niches on Earth and this astonishing radiation could not have been possible without a remarkable morphological diversification of their flight appendages. Here, we show that wing morphology from evolutionary distant four-winged insect species is associated with the differential expression of two Hox genes, *Antennapedia* (*Antp*) and *Ultrabithorax* (*Ubx*). Interestingly, species with similar or dissimilar pairs of wings display similar or distinct Hox expression levels in their forewing and hindwing primordia, respectively. Importantly, we find that wing formation also requires Hox gene expression and that different doses of *Antp* or *Ubx* specify flight appendage morphology in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. We propose that Hox dosage variation is a major determinant of flight appendage diversification during insect evolution.

Insects have developed various strategies for flying in the air, which is reflected at the level of their flight appendages. For example, insects can use two pairs of wings with similar or dissimilar morphology (as observed in different orders, including Odonata, Hymenoptera and Lepidoptera), or only one pair of wings and the other pair of wings transformed as a protective envelope (the elytra in Coleoptera) or a balancing organ (the halteres in Diptera). What are the molecular mechanisms underlying such morphological diversification?

Most of our current understanding stems from work in the fruit fly *Drosophila melanogaster* and the beetle *Tribolium castaneum*. A similar scenario is observed in those two species: the Hox gene *Ultrabithorax* (*Ubx*) represses the formation of the second thoracic (T2) flight appendage and promotes the development of the third thoracic (T3) flight appendage, while the Hox gene *Antennapedia* (*Antp*) has no obvious function in flight appendage formation on the T2 segment (Agrawal, Habib, Yelagandula, et L S Shashidhara 2011; Carroll, Weatherbee, et Langeland 1995 ; Hersh et al. 2007 ; Pavlopoulos et Akam 2011b; Prasad N, Tarikere S, Khanale D, Habib F 2016; Tomoyasu, Wheeler, et Denell 2005). These observations led to the assumption that *Ubx* shares a role in T3 flight appendage development while T2 flight appendage formation is Hox-free in insects (Carroll et al. 1995 and Scott D Weatherbee et al. 1999). Analyses in different butterfly species confirmed the role of *Ubx* (Scott D Weatherbee et al. 1999 and Tong et al. 2014) but also revealed that *Antp* could be involved in the evolution of butterfly-specific wing patterns (Saenko, M. S. P. Marialva, and Beldade 2011), underlining that T2 flight appendages could require the input of Hox genes in some instances. To assess whether the Hox-free state model could be generalized or not among the insect kingdom, we analyzed *Antp* and *Ubx* expression in the flight appendage primordia of four-winged insect species of the orders Odonata, Hymenoptera and Lepidoptera, covering more than 350M years of insect evolutionary time (Misof et al. 2014). Insect species were chosen according to their flight appendage formula on the T2 (forewings, FWs) and T3 (hindwings, HWs) segments, exhibiting either similar (the damselfly *Ischnura elegans*: **Fig. 1A**) or different (the bee *Apis mellifera* with smaller HWs and the silkworm *Bombyx mori* with FW and HW of different shape: **Fig. 1A**) morphologies. Immunofluorescence assays with *Antp* and *Ubx* cross-species antibodies revealed *Antp* nuclear staining in both the FW and HW primordia in all studied insect species, whereas *Ubx* nuclear staining was mostly restricted to the HW primordium (**Fig. 1**). RT-qPCR experiments were also performed to quantify *Antp* and *Ubx* mRNA expression level in each flight appendage primordium (see materials and methods and **Expanded views 1-3**). Results showed that the overall *Antp+Ubx* mRNAs expression level was similar between the FW and HW primordium in *Ischnura elegans* (with HW/FW ratio equal to 1,19: **Fig. 1**), but

not in *Apis mellifera* and *Bombyx mori* (with respectively 2 times and 3,5 times higher Hox expression level in the HW primordium: **Fig. 1**). The expression of Antp in the wing primordium of all tested insects, together with the correlation of Hox level variation and wing morphological differences, are challenging the Hox-free state model in wing formation. We thus decided to further explore the potential role of the Hox dosage in flight appendage formation, using the genetically tractable *Drosophila melanogaster* as a model system.

Pioneer work showed that Antp was neither expressed in the wing primordium region that will give rise to the distal wing blade (the so-called “pouch”) nor required for wing blade formation in *Drosophila* (Carroll et al. 1995). These results were acquired more than two decades ago, with no information on Antp expression in the wing primordium (the wing imaginal disc) of early L1 and L2 larval stages. We thus repeated immunofluorescence assay in the wing imaginal discs, from early to late larval developmental stages. Our staining reproduced the previously characterized expression profile of Antp in the hinge and notum regions of the L3 wing disc (**Fig. 2A**). However, we also revealed an additional expression pattern in the pouch region, with a homogenous distribution at the L1 larval stage that becomes progressively restricted to the ventral (V) and dorsal (D) sides, and a specific expression in few cells along the DV boundary of the pouch from L2 to mid-L3 larval stages (**Fig. 2A-B** and **Expanded view 4**). Both the increased sensitivity of the Antp antibody (**Expanded view 4**) and the improved staining protocol (see materials and methods) most likely explain why this expression profile has been missed before. The novel expression profile of Antp in the wing disc pouch was also reproduced with a GFP antibody recognizing an endogenous Antp-GFP fusion protein that we generated (see materials and methods) and with the *PI* autoregulatory element of *Antp* (Carroll et al. 1995, Papadopoulos et al. 2019, and **Expanded View 4**). In addition, recent single cell RNA-seq data performed in the wing disc confirmed that *Antp* was co-expressed with several wing-specifying genes in the pouch (Deng et al. 2019 and **Expanded view 5**). In contrast, Antp was only expressed in the peripodial membrane and at very low level in a few cells of the hinge part in the haltere imaginal disc (**Expanded View 6**). The expression of Antp in the pouch was also specifically lost in the *Cbx* mutant background that leads to anterior expression of Ubx and T2 wing-to-haltere transformation (Expanded View 6). More importantly, the *Ubx* mutant background leading to the four-winged fly exhibited the *de novo* wing-like expression pattern of Antp in the pouch of the T3 haltere-to-wing transformed disc (**Expanded View 6**). Together, these observations confirmed that Antp expression in the wing disc pouch is specifically linked to the wing developmental program.

Considering the novel expression profile of *Antp* in the wing disc pouch, we asked whether it is of any functional relevance for the proper development of the wing. Subtle wing phenotypes have previously been described in mutant clones for *Antp* (Struhl 1981, Struhl 1982) and *Antp* was shown to induce wing-like structures in the head under particular ectopic expression conditions in *Drosophila* (Kurata et al. 2000, Prince, et al. 2008). Here, we specifically targeted *Antp* expression in the wing disc pouch region by using CRISPR/Cas9 (Bassett et Liu 2014) with different Gal4 drivers. The specificity of gRNAs against *Antp* was validated in the embryo and haltere and leg imaginal discs (**Expanded view 7**). Abolishing *Antp* expression in the whole pouch of the wing disc with the *MS1096-Gal4* driver (**Expanded view 8**) led to strong wing size reduction and weak margin defects (**Fig. 2B-B'**). A similar phenotype was observed when *Antp* was targeted by using RNA-interference (Dietzl, Chen, Schnorrer, K. C. Su, et al. 2007 and **Expanded view 8**). Because the wing margin originates from cells located along the DV boundary of the pouch, we specifically targeted *Antp* expression in these corresponding cells by using the *Distalless (Dll)-Gal4* driver (**Expanded view 8**). Under this condition, we observed strong wing margin defects but no obvious wing size reduction (**Fig. 2C**). The wing phenotypes induced by the loss of *Antp* upon CRISPR/Cas9 were correlated with the altered expression profiles of genes involved in wing disc growth (*Mad*, *nubbin (nub)* and *spalt (sal)*) and wing margin formation (*wingless (wg)*, **Fig. 2D-D'**). Together these results established that the expression of *Antp* in the wing disc pouch is required for the proper wing blade formation in the adult fly.

We next sought to identify potential upstream regulators of *Antp* in the wing disc pouch. We thus searched for genes with similar expression profiles and characterized roles in wing formation. We found the expression of the Hox cofactor Homothorax (*Hth*) (Merabet and Mann 2016) and *Antp* to overlap, both in the hinge region and in the dorsal and ventral parts of the pouch (**Expanded views 5 and 9**). Moreover, *Antp* expression in the dorsal and ventral part was lost when *hth* function was compromised in the wing disc pouch, resulting in malformed adult wings (**Expanded view 9**), while the loss of *Antp* did not affect the expression of *Hth* (**Expanded view 9**). In addition, ectopic expression of *hth* in the whole pouch of the wing disc was sufficient to induce high *Antp* expression levels in the same cells (**Expanded view 9**). This effect was followed by wing-to-haltere transformation phenotypic traits (**Expanded view 9**). Finally, the analysis of *Hth* Chip-seq data performed in the wing imaginal discs (McKay et Lieb 2013, Kribelbauer et al. 2020) revealed a significant binding on the *P1 cis*-regulatory region and another putative enhancer of *Antp* (**Expanded view 9**). Thus, *Hth* could directly regulate the expression of *Antp* in the wing disc pouch. Interestingly, *Hth* was recently described as a

transcriptional repressor of *Ubx* in the haltere imaginal disc (Delker et al. 2019), highlighting that this regulator differentially controls Hox gene expression in the different flight primordia.

The wing-to-haltere transformation phenotype observed upon the *hth*-induced expression of *Antp* suggested that the functional output of *Antp* might depend on its expression level. To test this hypothesis, we asked whether *Antp* could directly substitute *Ubx* and rescue the four-wings *Ubx* mutant phenotype. Intriguingly, similar to *Ubx* (**Expanded view 10** and Casares, Calleja, et Sánchez-Herrero 1996), high levels of *Antp* expression were sufficient to control/drive haltere formation (**Expanded View 10**), which was not the case for another Hox gene, *Deformed* (*Dfd*, **Expanded View 10**). The haltere rescue assays showed that haltere formation was tightly linked to a high dose of Hox gene products. We, therefore, compared more precisely the expression level of *Antp* and *Ubx* in the wing and haltere disc pouch. Immunostaining with *Antp* and *Ubx* antibodies revealed that *Ubx* was 18,5 times more strongly expressed than *Antp* (**Fig. 3A-C**). Because the affinity could be different between the two antibodies, we also used the *Antp-GFP* and *Ubx-YFP* lines for quantifying the expression level with the same anti-GFP antibody. This analysis revealed that *Ubx* expression levels were 10 times higher than *Antp* levels (**Fig. 3D-F**), confirming that the wing and haltere developmental programs are linked to distinct Hox doses. To further evaluate the impact of the Hox dose on the wing and haltere development, we gradually modified the Hox expression level in the pouch of the wing and haltere discs. These genetic experiments showed that a gradual increase of *Antp* level in the wing pouch led to a progressive decrease of the wing size (**Fig. 3G-G'**). Importantly, the wing resembled to a haltere in terms of size, shape and hairs organization when the expression level corresponded to 490% of endogenous *Antp* (5 times higher than endogenous *Antp*, **Fig. 3G-G'**). Conversely, a gradual loss of *Ubx* led to a progressive increase of the haltere size, and characteristic wing-like phenotypic traits (including veins, hairs organization and flattening) eventually appeared when the level decreased to 39% of endogenous *Ubx* (2,5 times lower than endogenous *Ubx*, **Fig. 3H-H'**). In both cases, intermediary levels led to intermediary phenotypes. In combination with the rescue experiment, these results demonstrated that the formation of wing or haltere is not dependent on a specific Hox protein (here *Antp* or *Ubx*) but on a specific Hox dose in *Drosophila*.

The direct impact of the Hox dose on morphological diversification in animals remains surprisingly poorly investigated, and only two examples are known, the control of the size and number of digits in vertebrates (Zákány et al. 1997) and the leg length in a water strider species (Refki et al. 2014). Previous work described the importance of autoregulation to buffer against increases in *Ubx* protein level (Crickmore, Ranade, et Mann 2009) and the fine-tuning of *Ubx*

transcription in a compartment-specific manner within the haltere imaginal disc (Delker et al. 2019). Interestingly, recent studies showed that the nutritional status could control the level of Ubx in a rice planthopper insect, with long and short wings linked to a low and high level of expression, respectively (Fu et al. 2020 and Li et al. 2020). In this study, we reveal the importance of the Hox dosage in the course of wing evolution both by expression analyses in several insect species and genetic arguments in *Drosophila* (**Figure 4**). We propose that Hox dosage variation is an underestimated yet likely widely used molecular strategy to diversify Hox activity and thereby morphologies during animal evolution.

METHODS

Drosophila strains

Drosophila strains were cultured following standard procedures at 25°C. *Yellow white* was used as a wild-type strain. Hox constructs fused to the C-terminal fragment of Venus (VC) have previously been used (Hudry et al. 2012). *Antp-GFP* fly line was generated by using the corresponding MiMIC fly line (*Antp*^{MI02272}, line 33187 at the Bloomington stock center) for inserting the GFP-encoding fragment (MiMIC injection service of Bestgene Inc.), as described (Venken et al. 2011). The *Ubx-YFP* fly line is from the Cambridge protein trap project Flyprot (line CPTI-000601). The *UAS-Antp-gRNAs* construct was designed as previously described (Port et Bullock 2016). Suitable gRNAs, which bind in the first exon, were identified using the webtool CRISPR Optimal Target Finder (<http://targetfinder.flycrispr.neuro.brown.edu>). Four different gRNAs were cloned together into the pCFD6 plasmid according to the protocol published on <https://www.crisprflydesign.org> (*Antp-gRNA1*:GATGACGCTGCCCCATCACA, *Antp-gRNA2*:GGCCGTTGTAGTAGGGCATG, *Antp-gRNA3*:GGCGGGATCAGCAGACGCTG, *Antp-gRNA4*:GGTTCTGATGGACCTGTGAT). The pCFD6-UAS-*Antp-gRNAs* construct was injected by BestGene (*attP5*, third chromosome). Primers and sequence maps are available upon request. The following GAL4 and UAS stocks were used: *Ubx-GAL4*^{LDN} (de Navas, Garaulet, et Sánchez-Herrero 2006), *UbxHM* (Pavlopoulos et Akam 2011c), *abxpbx* (de Navas et al. 2006), *Nab-Gal4* (Pavlopoulos et Akam 2011c), *Dll-Gal4* (Calleja et al. 1996), *MS1096-Gal4* (Bloomington, #8696), *MS209-Gal4* (Bloomington, #25676), *AntpP1-Gal4* (Bloomington, #26817), *Nubbin-Gal4* (Bloomington, #25754), *UAS::hthRNAi* (*hth*^{KK108831} line

from VDRC), *UAS::AntpRNAi* (Bloomington #27675), *UAS::UbxRNAi* (*Ubx*^{GD5049} from VDRC).

Immunofluorescence Assay in *Drosophila* imaginal discs

Imaginal discs were fixed following dissection in 4% paraformaldehyde (methanol free) for 15 min. Washes were done with 1×PBS 0.1% TritonX solution (PBTx). Samples were then blocked with 2% BSA solution for 2h. Primary antibodies were incubated for 24h at 4°C and then washed in PBTx and secondary antibodies incubated for 2h at room temperature. Samples were then washed in PBTx and mounted in Vectashield (Vector laboratories) for confocal acquisition. Primary antibodies used were mouse anti- Antp 4C3 (1:20; DSHB); mouse anti- Antp 8C11 (non-diluted ;DSHB) ; mouse anti-Ubx FP3.38 (1:200; DSHB) ; mouse anti-Ubx/ABD-A FP6.87 (1:20; DSHB) ; rabbit anti-GFP PABG1 (1 :500 ; Chromotek); rabbit anti-PDM1 (nubbin, 1 :500 ; from J. Enriquez lab) ; mouse anti-Wg 4D4 (1:200; DSHB); rabbit anti-Spalt (1:200) and anti-Hth (1:200) antibodies (from J. Enriquez lab).

Immunofluorescence Assay in *Ischnura*, *Apis* and *Bombyx* flight primordia/imaginal discs

Wing primordia (*Ischnura elegans* and *Apis mellifera*) or imaginal discs (*Bombyx mori*) were fixed following dissection in 4% paraformaldehyde (methanol free) for 15 min. Washes were done with 1×PBS 0.3% TritonX solution (PBTx). Samples were then blocked with 2% BSA solution for 24h. Primary antibodies were incubated for 48h at 4°C and then washed in PBTx and secondary antibodies incubated for 24h at 4°C. Samples were then washed in PBTx and mounted in Vectashield (Vector laboratories) for confocal acquisition.

Microscopy and Imaging

All the fluorescence microscopy images of imaginal discs and wing primordia were captured using confocal Leica SP8. Images were recorded at a 1024x1024 pixel resolution using oil objective 40x. Expression intensity of GFP, Antp and Ubx was determined using the histogram function of the FIJI Software. Briefly, threshold was adjusted (using the « Image calculator» function) to create an image containing all positive nuclei (using the « Subtract » function) that were analyzed for fluorescence quantification (using the « analyze particles » function) and deduce the mean fluorescence intensity. The adult *Drosophila* appendage phenotype images were taken by Scanning electron microscope Hirox SH-3000. The adult wing and haltere were isolated from the rest of the insect body to allow for better manipulation while mounting samples. Picture of adult insects were taken with a Keyence VHX7000 microscope.

Quantitative real-time PCR (RT-qPCR)

Tissue, RNA collection and Reverse Transcription (RT):

Tissues were collected either from larvae (*Bombyx mori*), or from nymphs (*Apis mellifera*, and *Ischnura elegans*). T2 and T3 wings imaginal discs or wings primordia were collected separately, and dissections from 3 to 4 individuals were pulled in each sample. RNA was extracted using NucleoZol (Macherey-Nagel). RNA concentration was evaluated using Qubit4 fluorometer (ThermoFisher). RT was carried out 5 minutes at 70°C followed by 1 hour at 42°C in 20 µl reactions containing 0.5 mM dNTP each, 10 mM DTT, 0.5 µg oligo(dT)₁₅ (Promega) and 200 U of M-MLV-Reverse Transcriptase (Promega).

Primers design and real-time qPCR:

All primers were designed to have comparable biochemical properties (%GC content and melting temperature). For Antp and Ubx, primers were designed within the highly conserved homeodomain (HD) common to most different transcripts to avoid excluding any transcripts with putative transcriptional activities (Supplementary Table 1 and Expanded view 1). Because Ubx sequence is not identified in *Ischnura elegans*, we used a low-stringency annealing temperature to amplify its HD with primers derived from the HD of *Limnopus dissortis*. The amplified fragment was separated in a 2% agarose gel, cloned into pCR II TOPO vector using the TOPO TA cloning kit (Thermo Fisher Scientific) and sequenced. The obtained Ubx sequence for *Ischnura elegans* undoubtedly match those of the Ubx HD in the other studied species and was used to design new specific primers for the qPCR.

Real-time PCR was conducted in a 10 µl reaction containing 0,1% of RT product, 2 µM of each dNTP, 10 pmol of each primer and 5µl of Sybergreen mix (iTaq Universal SYBR Green Supermix Biorad). For each set of primers, amplification efficiency was first tested using a gradient of annealing temperatures in order to harmonized annealing temperature for all sets. For all PCR reactions, cDNA was denatured 10 minutes at 95°C and amplified for 40 cycles in a two steps program as following: 30 seconds at 95° followed by 30 seconds annealing and polymerization at 65°. For each set of primers, standard curves were performed using serial dilution of the amplicon based on the calculation of the molecular weight specific to each amplicon. Finally, standard curves were used to calculate mRNA copy numbers in the analyzed samples (**Expanded view 2**). The amount of template was adjusted to equal quantity between samples within the same tissue of the same species based on the level of Tubulin (Tub) for *Apis mellifera* and *Bombyx mori*, or the level of Actin (Act) for *Ischnura elegans*.

ChIP seq analyses

Fastq files for Hth ChIP-seq in the wing imaginal discs were downloaded from NCBI GEO datasets (GSM3578084 and GSM3578085) and aligned to the dm6 assembly using the bwa-mem software (Li et Durbin 2009). Sam files were further converted to bam, duplicate reads removed and sorted using the samtools package, version 1.9 (Li H, 2009). The bamCompare function from the Deeptools package (version 3.1.3, (Ramírez et al. 2016)) was used to generate the input normalized bigwig file. The FAIRE seq wiggle files for the haltere and wing imaginal discs were obtained from the NCBI GEO datasets (GSM948716 and GSM948717). The reference assembly was modified to dm6 version using the CrossMap software (Zhao et al. 2014). All alignments were visualized using the IGV software (version 2.8.0) (Robinson et al. 2011) and Hth binding site prediction was performed using the MAST program (version 5.1.1) (Bailey et Gribskov 1998) from the MEME suite.

Single-cell RNA-seq data analysis

Feature-barcode matrices was retrieved from the NCBI Gene Expression Omnibus repository under the accession numbers GSM3902311. Further analysis was performed using the Seurat R package v3.1 (Butler et al. 2018 and Stuart et al. 2019). We first normalized the data. Next, the data were scaled. Using the FindVariableFeatures function, 3,000 features were identified as highly variable from cell-to-cell. We then performed linear dimensional reduction using the Principal Component Analysis (PCA) method including 50 Principal Components (PCs) and to visualize the data we used the Uniform Approximation and Projection method (UMAP) (McInnes et al. 2018). We used the WhichCells function to select the nubbin positive cells from the wing imaginal disc epithelial cells.

Statistical information

Statistical analyses were performed with Excel 2010 (Microsoft) and considered statistically significant at a P value < 0,05. When normality or equal variance between samples was achieved, an unpaired two-tailed t -test was used. When normality or equal variance of samples failed, nonparametric tests such as the Wilcoxon signed-rank test were performed. All values are presented as mean \pm SD. The number of experiments and samples are indicated in the figure legends. All pairwise comparisons were two-tailed. The investigators were not blinded to allocation during experiments and outcome assessment.

REFERENCES

- Agrawal, Pavan, Farhat Habib, Ramesh Yelagandula, et L. S. Shashidhara. 2011. « Genome-level identification of targets of Hox protein Ultrabithorax in *Drosophila*: novel mechanisms for target selection. » *Scientific reports* 1(i):205. doi: 10.1038/srep00205.
- Bailey, Timothy L., et Michael Gribskov. 1998. « Combining evidence using p-values: Application to sequence homology searches ». *Bioinformatics*. doi: 10.1093/bioinformatics/14.1.48.
- Bassett, Andrew, et Ji Long Liu. 2014. « CRISPR/Cas9 mediated genome engineering in *Drosophila* ». *Methods* 69(2):128-36. doi: 10.1016/j.ymeth.2014.02.019.
- Butler, Andrew, Paul Hoffman, Peter Smibert, Efthymia Papalexi, et Rahul Satija. 2018. « Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species ». *Nature Biotechnology*. doi: 10.1038/nbt.4096.
- Calleja, M., E. Moreno, S. Pelaz, et G. Morata. 1996. « Visualization of gene expression in living adult *Drosophila*. » *Science (New York, N.Y.)* 274(5285):252-55.
- Carroll, Sean B., Scott D. Weatherbee, et James A. Langeland. 1995. « Homeotic genes and the regulation and evolution of insect wing number ». *Nature* 375(6526):58-61. doi: 10.1038/375058a0.
- Casares, F., M. Calleja, et E. Sánchez-Herrero. 1996. « Functional similarity in appendage specification by the Ultrabithorax and abdominal-A *Drosophila* HOX genes. » *The EMBO journal* 15(15):3934-42.
- Crickmore, Michael a., Vikram Ranade, et Richard S. Mann. 2009. « Regulation of Ubx expression by epigenetic enhancer silencing in response to Ubx levels and genetic variation ». *PLoS Genetics* 5(9). doi: 10.1371/journal.pgen.1000633.
- Delker, Rebecca K., Vikram Ranade, Ryan Loker, Roumen Voutev, et Richard S. Mann. 2019. « Low affinity binding sites in an activating CRM mediate negative autoregulation of the *Drosophila* Hox gene Ultrabithorax ». *PLoS Genetics* 15(10). doi: 10.1371/journal.pgen.1008444.
- Deng, Mingxi, Ying Wang, Lina Zhang, Yang Yang, Shengshuo Huang, Jiguang Wang, Hao Ge, Toyotaka Ishibashi, et Yan Yan. 2019. « Single cell transcriptomic landscapes of pattern formation, proliferation and growth in *Drosophila* wing imaginal discs ». *Development (Cambridge)*. doi: 10.1242/dev.179754.
- Dietzl, Georg, Doris Chen, Frank Schnorrer, Kuan Chung Su, Yulia Barinova, Michaela Fellner, Beate Gasser, Kaolin Kinsey, Silvia Oettel, Susanne Scheiblauer, Africa Couto, Vincent Marra, Krystyna Keleman, et Barry J. Dickson. 2007. « A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila* ». *Nature* 448(7150):151-56. doi: 10.1038/nature05954.

- Fu, Sheng Jie, Jin Li Zhang, Sun Jie Chen, Hao Hao Chen, Yi Lai Liu, et Hai Jun Xu. 2020. « Functional analysis of Ultrabithorax in the wing-dimorphic planthopper *Nilaparvata lugens* (Stål, 1854) (Hemiptera: Delphacidae) ». *Gene* 737. doi: 10.1016/j.gene.2020.144446.
- Hersh, Bradley M., Craig E. Nelson, Samantha J. Stoll, Jason E. Norton, Thomas J. Albert, et Sean B. Carroll. 2007. « The UBX-regulated network in the haltere imaginal disc of *D. melanogaster* ». *Developmental Biology* 302(2):717-27. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.11.011.
- Hudry, Bruno, Sophie Remacle, Marie-Claire Delfini, René Rezsöházy, Yacine Graba, et Samir Merabet. 2012. « Hox proteins display a common and ancestral ability to diversify their interaction mode with the PBC class cofactors. » *PLoS biology* 10(6):e1001351. doi: 10.1371/journal.pbio.1001351.
- Kribelbauer, Judith F., Ryan E. Loker, Siqian Feng, Chaitanya Rastogi, Namiko Abe, H. Tomas Rube, Harmen J. Bussemaker, et Richard S. Mann. 2020. « Context-Dependent Gene Regulation by Homeodomain Transcription Factor Complexes Revealed by Shape-Readout Deficient Proteins ». *Molecular Cell* 78(1):152-167.e11. doi: 10.1016/j.molcel.2020.01.027.
- Kurata, Shoichiro, Masahiro J. Go, Spyros Artavanis-Tsakonas, et Walter J. Gehring. 2000. « Notch signaling and the determination of appendage identity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(5):2117-22. doi: 10.1073/pnas.040556497.
- Li, Heng, et Richard Durbin. 2009. « Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform ». *Bioinformatics*. doi: 10.1093/bioinformatics/btp324.
- Li, Xiang, Mu-Hua Zhao, Miao-Miao Tian, Jing Zhao, Wan-Lun Cai, et Hong-Xia Hua. 2020. « An InR/Mir-9a/NIUbx Regulatory Cascade Regulates Wing Diphenism in Brown Planthoppers ». *Insect Science* n/a(n/a). doi: 10.1111/1744-7917.12872.
- McInnes, Leland, John Healy, Nathaniel Saul, et Lukas Großberger. 2018. « UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection ». *Journal of Open Source Software*. doi: 10.21105/joss.00861.
- McKay, Daniel J., et Jason D. Lieb. 2013. « A Common Set of DNA Regulatory Elements Shapes *Drosophila* Appendages ». *Developmental Cell* 27(3):306-18. doi: 10.1016/j.devcel.2013.10.009.
- Merabet, Samir, et Richard S. Mann. 2016. « To Be Specific or Not: The Critical Relationship Between Hox And TALE Proteins ». *Trends in Genetics* xx:1-14. doi: 10.1016/j.tig.2016.03.004.
- Misof, Bernhard, Shanlin Liu, Karen Meusemann, Ralph S. Peters, Alexander Donath, Christoph Mayer, Paul B. Frandsen, Jessica Ware, Tomáš Flouri, Rolf G. Beutel, Oliver Niehuis, Malte Petersen, Fernando Izquierdo-Carrasco, Torsten Wappler, Jes Rust, Andre J. Aberer, Ulrike Aspöck, Horst Aspöck, Daniela Bartel, Alexander Blanke, Simon Berger,

- Alexander Böhm, Thomas R. Buckley, Brett Calcott, Junqing Chen, Frank Friedrich, Makiko Fukui, Mari Fujita, Carola Greve, Peter Grobe, Shengchang Gu, Ying Huang, Lars S. Jermiin, Akito Y. Kawahara, Lars Krogmann, Martin Kubiak, Robert Lanfear, Harald Letsch, Yiyuan Li, Zhenyu Li, Jiguang Li, Haorong Lu, Ryuichiro Machida, Yuta Mashimo, Pashalia Kapli, Duane D. McKenna, Guanliang Meng, Yasutaka Nakagaki, José Luis Navarrete-Heredia, Michael Ott, Yanxiang Ou, Günther Pass, Lars Podsiadlowski, Hans Pohl, Björn M. Von Reumont, Kai Schütte, Kaoru Sekiya, Shota Shimizu, Adam Slipinski, Alexandros Stamatakis, Wenhui Song, Xu Su, Nikolaus U. Szucsich, Meihua Tan, Xuemei Tan, Min Tang, Jingbo Tang, Gerald Timelthaler, Shigekazu Tomizuka, Michelle Trautwein, Xiaoli Tong, Toshiki Uchifune, Manfred G. Walzl, Brian M. Wiegmann, Jeanne Wilbrandt, Benjamin Wipfler, Thomas K. F. Wong, Qiong Wu, Gengxiong Wu, Yinlong Xie, Shenzhou Yang, Qing Yang, David K. Yeates, Kazunori Yoshizawa, Qing Zhang, Rui Zhang, Wenwei Zhang, Yunhui Zhang, Jing Zhao, Chengran Zhou, Lili Zhou, Tanja Ziesmann, Shijie Zou, Yingrui Li, Xun Xu, Yong Zhang, Huanming Yang, Jian Wang, Jun Wang, Karl M. Kjer, et Xin Zhou. 2014. « Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution ». *Science* 346(6210):763-67. doi: 10.1126/science.1257570.
- de Navas, Luis F., Daniel L. Garaulet, et Ernesto Sánchez-Herrero. 2006. « The ultrabithorax Hox gene of *Drosophila* controls haltere size by regulating the Dpp pathway. » *Development (Cambridge, England)* 133:4495-4506. doi: 10.1242/dev.02609.
- Papadopoulos, Dimitrios K., Kassiani Skouloudaki, Ylva Engström, Lars Terenius, Rudolf Rigler, Christoph Zechner, Vladana Vukojević, et Pavel Tomancak. 2019. « Control of Hox transcription factor concentration and cell-to-cell variability by an auto-regulatory switch ». *Development* 146(12):dev168179. doi: 10.1242/dev.168179.
- Pavlopoulos, Anastasios, et Michael Akam. 2011a. « Hox gene Ultrabithorax regulates distinct sets of target genes at successive stages of *Drosophila* haltere morphogenesis. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(7):2855-60. doi: 10.1073/pnas.1015077108.
- Pavlopoulos, Anastasios, et Michael Akam. 2011b. « Hox gene Ultrabithorax regulates distinct sets of target genes at successive stages of *Drosophila* haltere morphogenesis. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(7):2855-60. doi: 10.1073/pnas.1015077108.
- Port, Phillip, et Simon L. Bullock. 2016. « Augmenting CRISPR applications in *Drosophila* with tRNA-flanked sgRNAs ». *Nature Methods*. doi: 10.1038/nmeth.3972.
- Prasad N, Tarikere S, Khanale D, Habib F, Shashidhara LS. 2016. « A comparative genomic analysis of targets of Hox protein Ultrabithorax amongst distant insect species. » *Scientific reports* Jun 14(6):27885.
- Prince, Frédéric, Tomonori Katsuyama, Yoshiteru Oshima, Serge Plaza, Diana Resendez-Perez, Meera Berry, Shoichiro Kurata, et Walter J. Gehring. 2008. « The YPWM motif links Antennapedia to the basal transcriptional machinery. » *Development (Cambridge, England)* 135(9):1669-79. doi: 10.1242/dev.018028.

- Ramírez, Fidel, Devon P. Ryan, Björn Grüning, Vivek Bhardwaj, Fabian Kilpert, Andreas S. Richter, Steffen Heyne, Friederike Dünder, et Thomas Manke. 2016. « deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis ». *Nucleic acids research*. doi: 10.1093/nar/gkw257.
- Refki, Peter Nagui, David Armisén, Antonin Jean Johan Crumière, Séverine Viala, et Abderrahman Khila. 2014. « Emergence of tissue sensitivity to Hox protein levels underlies the evolution of an adaptive morphological trait ». *Developmental Biology* 392(2):441-53. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.05.021.
- Robinson, James T., Helga Thorvaldsdóttir, Wendy Winckler, Mitchell Guttman, Eric S. Lander, Gad Getz, et Jill P. Mesirov. 2011. « Integrative genomics viewer ». *Nature Biotechnology*.
- Saenko, Suzanne V., Marta S. P. Marialva, et Patrícia Beldade. 2011. « Involvement of the conserved Hox gene *Antennapedia* in the development and evolution of a novel trait ». *EvoDevo* 2(1). doi: 10.1186/2041-9139-2-9.
- Struhl, G. 1982. « Genes controlling segmental specification in the *Drosophila thorax* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79(23):7380-84. doi: 10.1073/pnas.79.23.7380.
- Struhl, Gary. 1981. « A homoeotic mutation transforming leg to antenna in *Drosophila* ». *Nature* 292(5824):635-38. doi: 10.1038/292635a0.
- Stuart, Tim, Andrew Butler, Paul Hoffman, Christoph Hafemeister, Efthymia Papalexi, William M. Mauck, Yuhao Hao, Marlon Stoerckius, Peter Smibert, et Rahul Satija. 2019. « Comprehensive Integration of Single-Cell Data ». *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2019.05.031.
- Tomoyasu, Yoshinori, Scott R. Wheeler, et Robin E. Denell. 2005. « Ultrabithorax is required for membranous wing identity in the beetle *Tribolium castaneum* ». *Nature* 433(7026):643-47. doi: 10.1038/nature03272.
- Tong, Xiaoling, Steven Hrycaj, Ondrej Podlaha, Aleksandar Popadic, et Antónia Monteiro. 2014. « Over-expression of Ultrabithorax alters embryonic body plan and wing patterns in the butterfly *Bicyclus anynana* ». *Developmental Biology* 394(2):357-66. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.08.020.
- Venken, Koen J. T., Karen L. Schulze, Nele a Haelterman, Hongling Pan, Yuchun He, Martha Evans-Holm, Joseph W. Carlson, Robert W. Levis, Allan C. Spradling, Roger a Hoskins, et Hugo J. Bellen. 2011. « MiMIC: a highly versatile transposon insertion resource for engineering *Drosophila melanogaster* genes ». *Nature Methods* 8(9):737-43. doi: 10.1038/nmeth.1662.
- Weatherbee, Scott D., H. Frederik Nijhout, Laura W. Grunert, Georg Halder, Ron Galant, Jayne Selegue, et Sean Carroll. 1999. « Ultrabithorax function in butterfly wings and the evolution of insect wing patterns ». *Current Biology* 9(3):109-15.

Zákány, József, Catherine Fromental-Ramain, Xavier Warot, et Denis Duboule. 1997. « Regulation of number and size of digits by posterior Hox genes: A dose-dependent mechanism with potential evolutionary implications ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(25):13695-700. doi: 10.1073/pnas.94.25.13695.

Zhao, Hao, Zhifu Sun, Jing Wang, Haojie Huang, Jean Pierre Kocher, et Liguang Wang. 2014. « CrossMap: A versatile tool for coordinate conversion between genome assemblies ». *Bioinformatics*. doi: 10.1093/bioinformatics/btt730.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Bloomington and Vienna stock centers for providing the *Drosophila* fly lines, the Developmental Studies Hybridoma Bank for antibodies and the Arthrotools platform of the UMS3444 of Lyon for fly food. We thank Rosa Barrio for the Spalt antibody and Jonathan Enriquez for the Hth antibody. We thank M. Kmita and M. Averof for their helpful comments on the manuscript. Work in S. M.'s laboratory was supported by the CNRS, ENS-Lyon, Fondation pour la Recherche Médicale (FRM 160896) and Centre Franco-Indien pour la Promotion de la Recherche Avancée (Cefipra N°5503-P). Work in I. L.'s laboratory was supported by the DFG (LO 844/5-2).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Rachel Paul: conceptualisation, execution of experiments, data analysis, formal analysis, writing. Guillaume Giraud, Kathrin Domsch, Marilyne Duffraisie, Soumen Khan: execution of experiments, data analysis. Solene Vanderperre: formal analysis. Frédéric: execution of experiments, data analysis, writing. Ingrid Lohman, Robby Stoks, LS Shashidhara: writing. Samir Merabet: conceptualization, data analysis; formal analysis, writing.

COMPETING INTERESTS

Authors declare that no competing interests exist.

MATERIALS & CORRESPONDENCE

Requests should be addressed to Samir Merabet (samir.merabet@ens-lyon.fr)

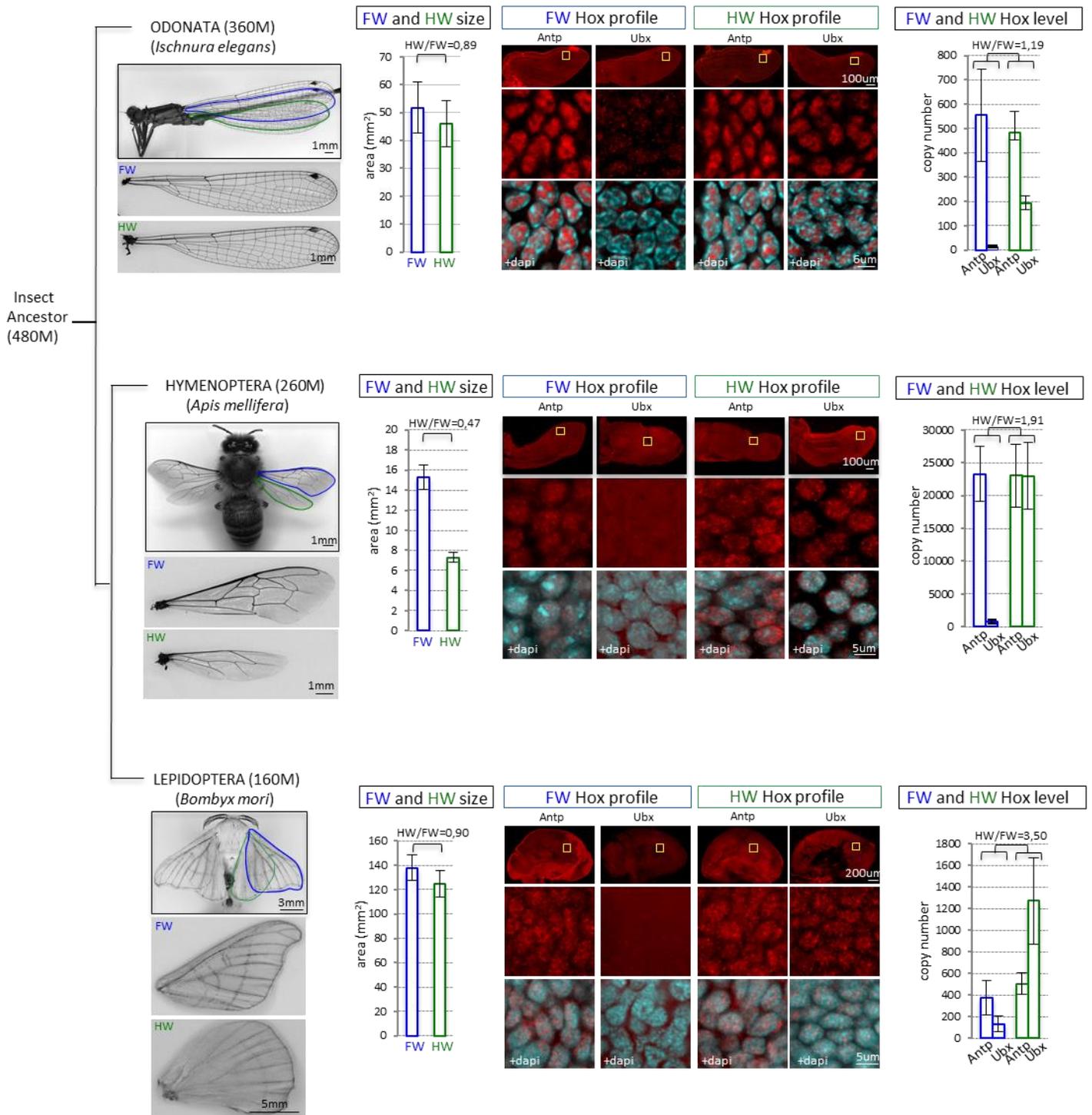
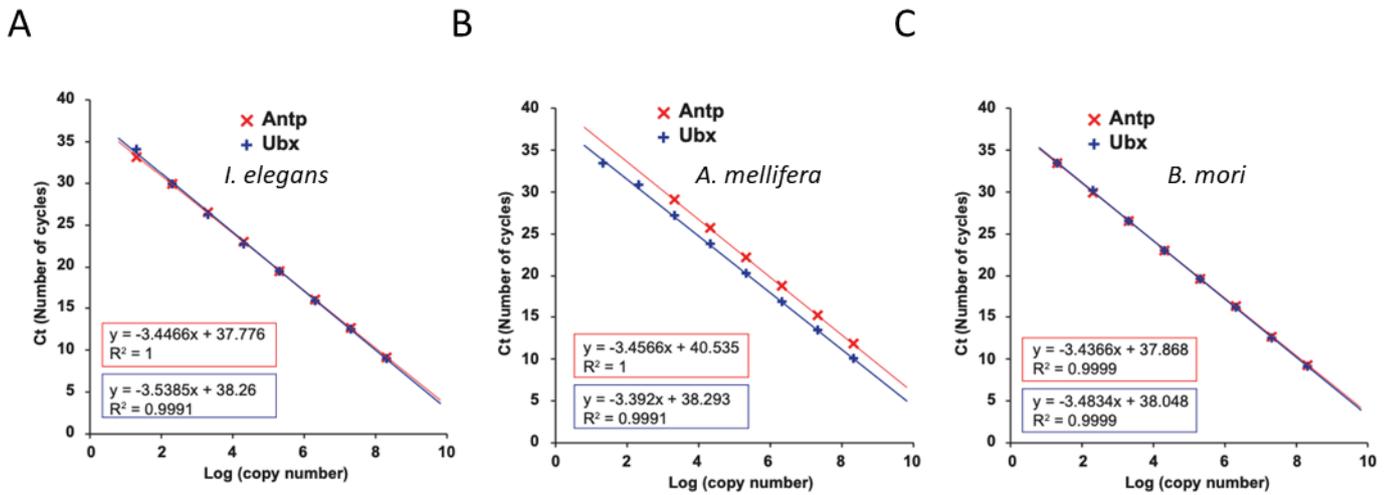


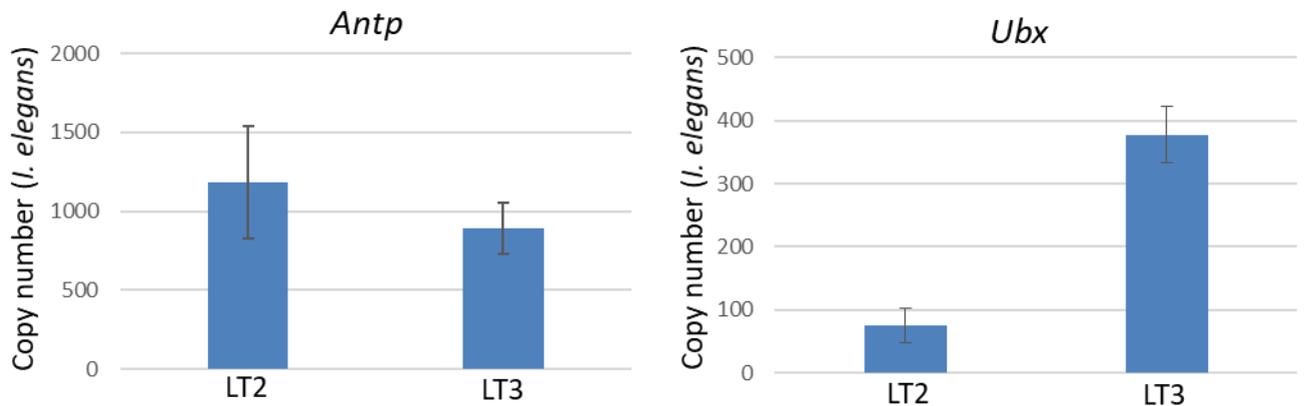
Figure 1

Figure 1. Antp and Ubx are expressed in the flight appendage primordia of evolutionary distant insect species. Simplified insect evolutionary tree with illustrated pictures of insect species used in this study (the timescale is given in Million (M) years). Individual forewings (FW, surrounded in blue) and hindwings (HW, surrounded in green) are shown below each adult species. Graphs on the right show the quantification of the adult FW and HW area (n=20). The HW/FW ratio indicates the size difference between the two pairs of wings. The expression profile of Antp and Ubx (in red) is shown in the full FW and HW primordium (top) and in enlargements (yellow box) on few cells to better highlight the specific nuclear staining (with nuclear DAPI co-staining in cyan). Fluorescent immunostaining was reproduced from three independent experiments (n=8 for *Ischnura elegans*; n=10 for *Apis mellifera* and n=12 for *Bombyx mori*). Graphs on the right show RT-qPCR quantification for *Antp* and *Ubx* mRNA from dissected FW and HW primordia of late nymph (*Ischnura elegans*, n=9) and pharate pupa (*Apis mellifera*, n=12) or from imaginal discs of 5th instar larva (*Bombyx mori*, n=12). The HW/FW ratio is calculated based on the total *Antp+Ubx* mRNA expression level in each primordium. Bars represent mean \pm SD of three independent experiments.

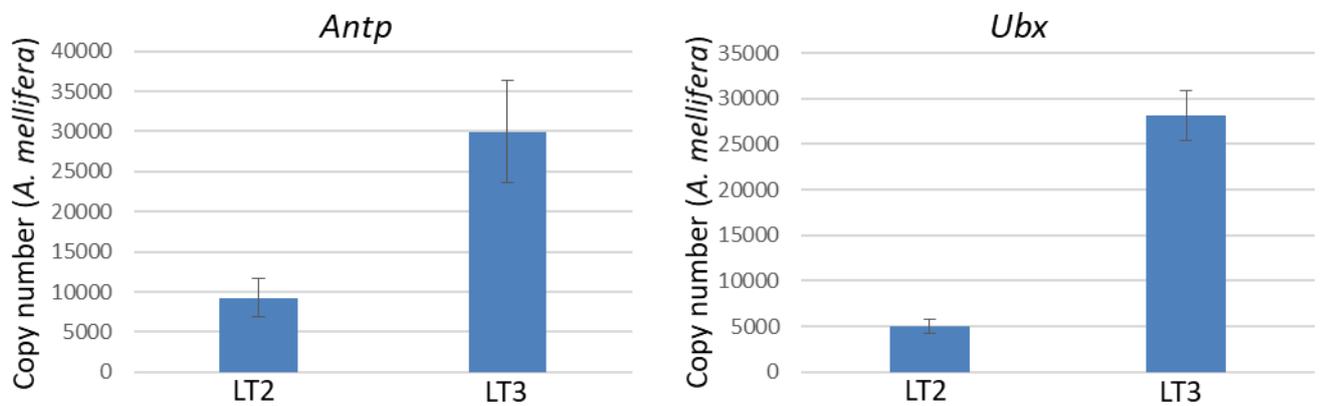


Expanded view 2. qPCR primers analysis. Standard affinity curves for *Antp* (in red) and *Ubx* (in blue) in *Apis mellifera* (A), *Bombyx mori* (B), and *Ischnura elegans* (C). Line graphs show the cycle threshold (Ct) according to the log of each initial copy number. Equations and R² for linear regression are indicated.

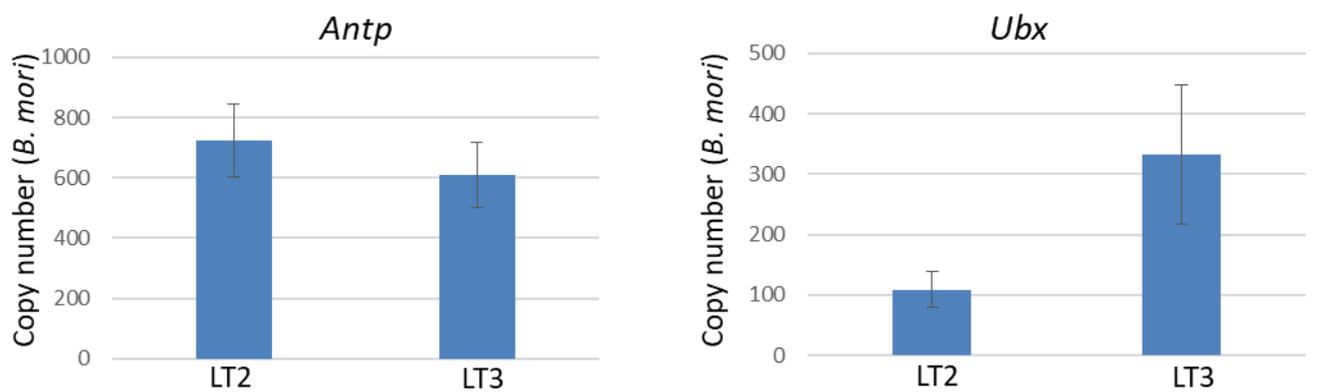
A



B



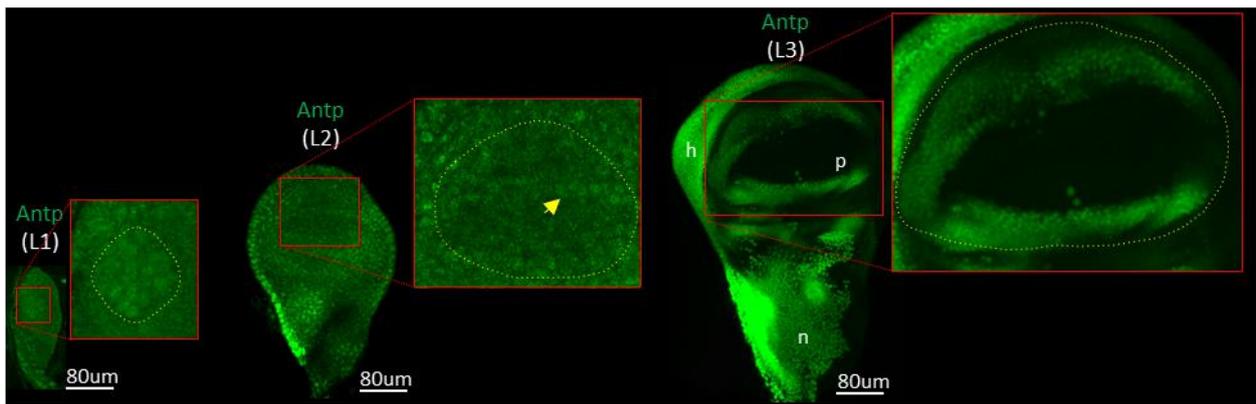
C



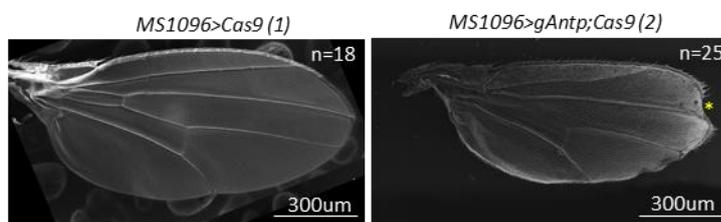
Expanded view 3. Control RT-qPCR of *Antp* and *Ubx* in the leg primordia of the second (LT2) and third (LT3) thoracic segment in *Ischnura elegans* (A), *Apis mellifera* (B) and *Bombyx mori* (C).

Bars represent mean \pm SD of three independent experiments.

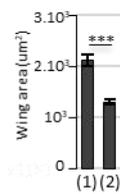
A



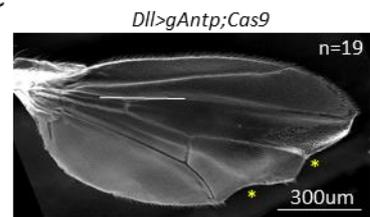
B



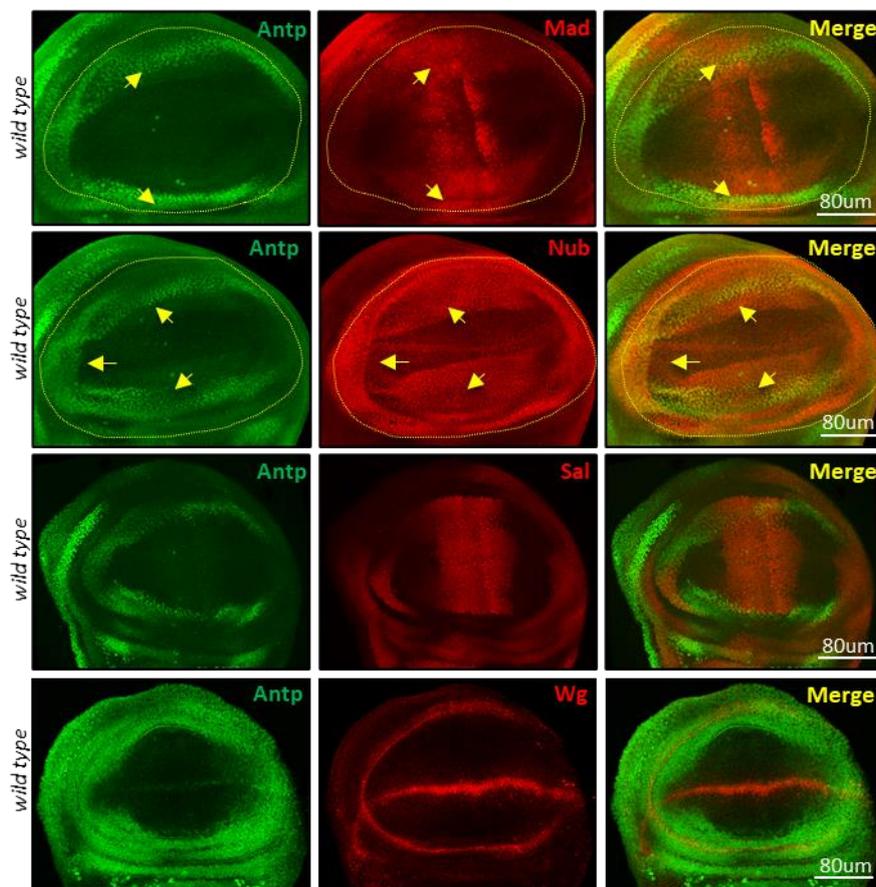
B'



C



D



D'

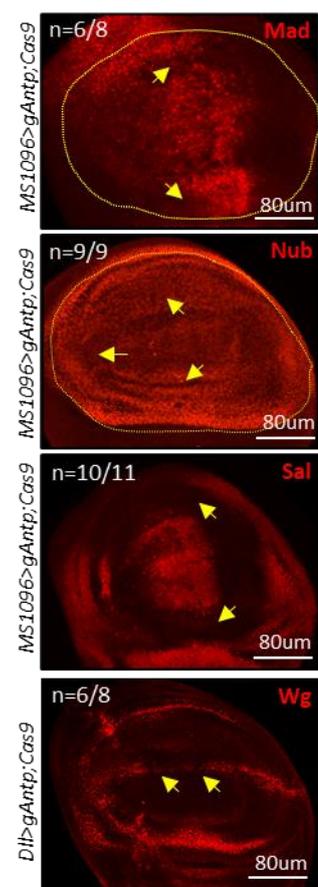
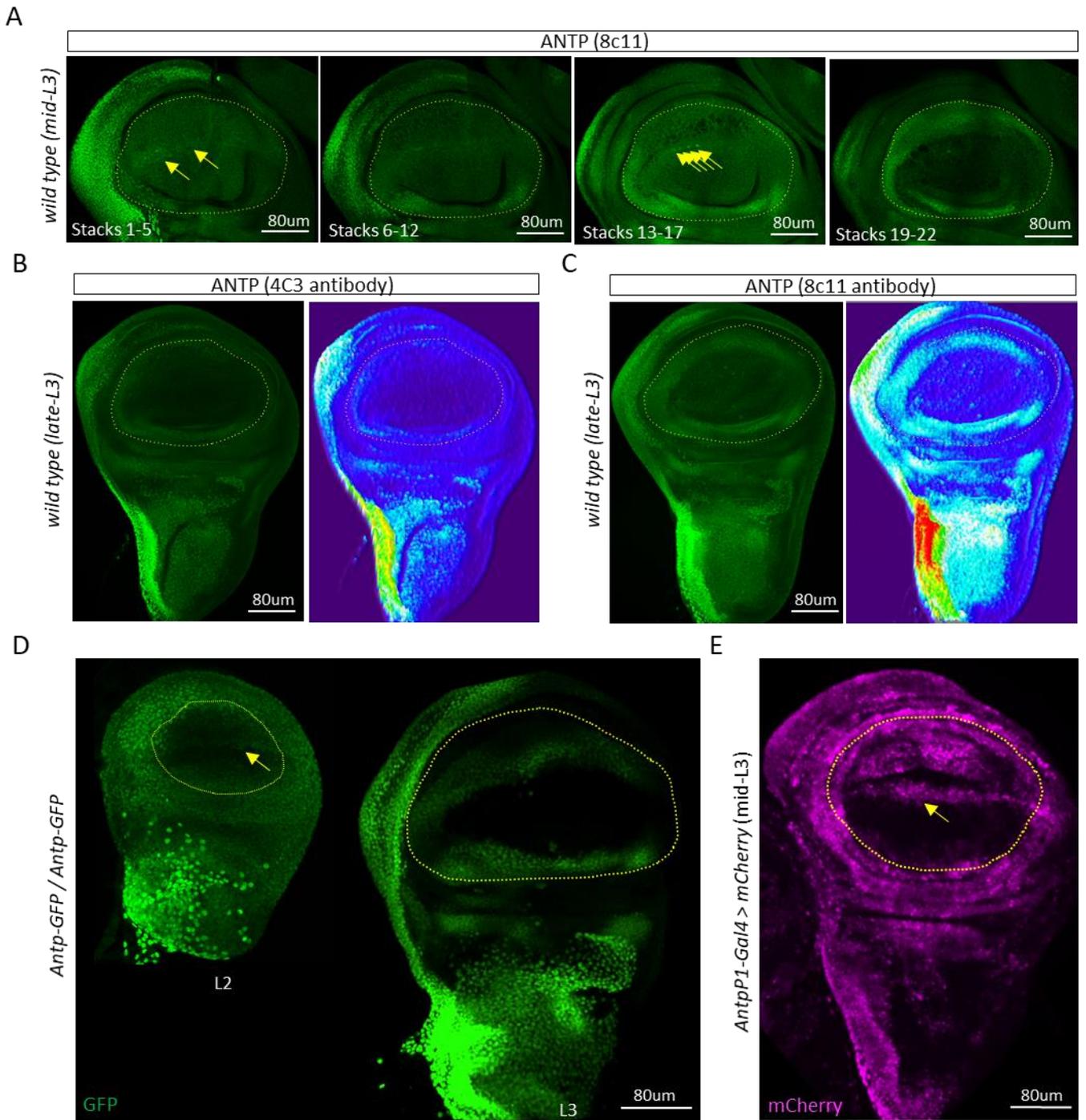
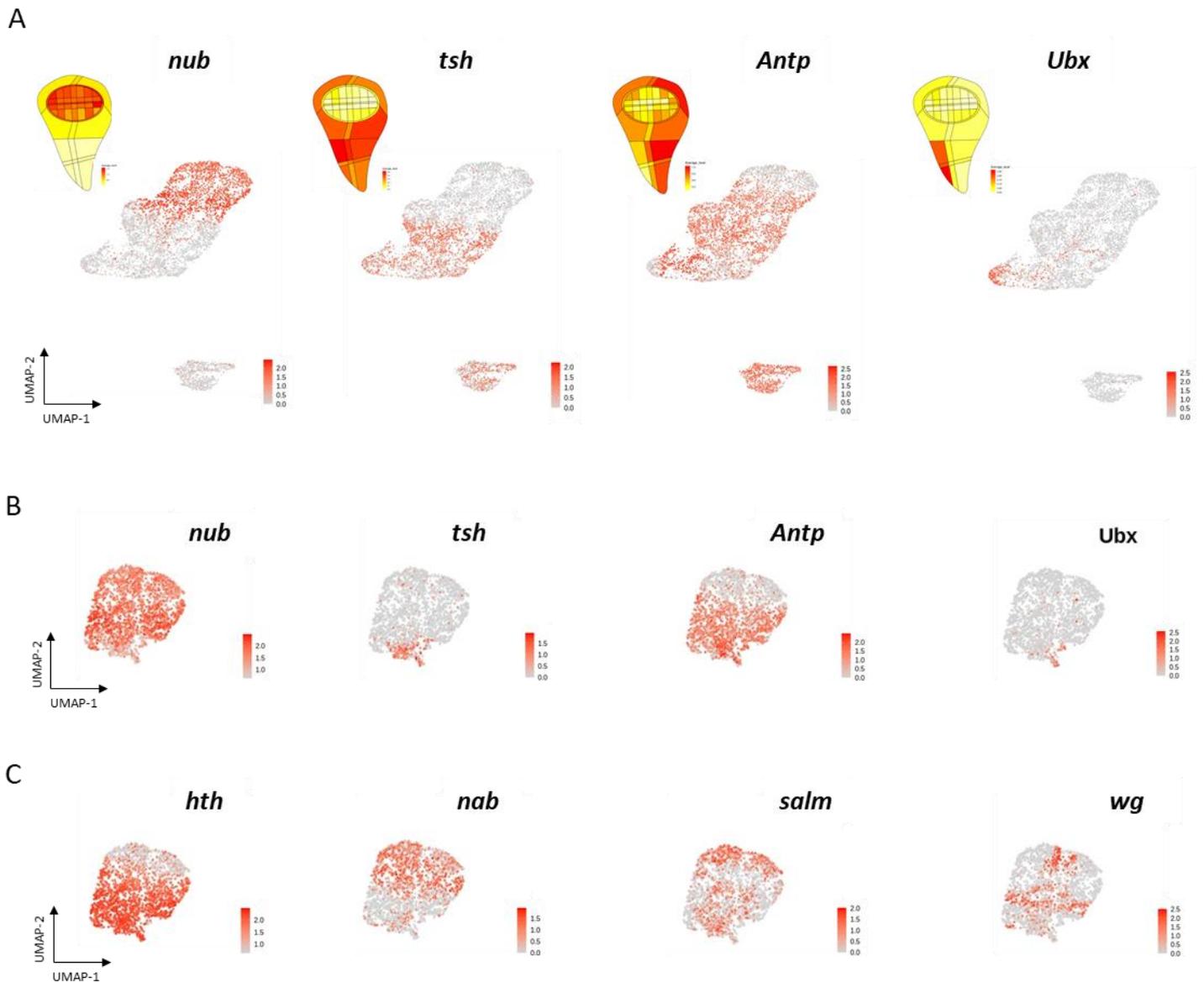


Figure 2

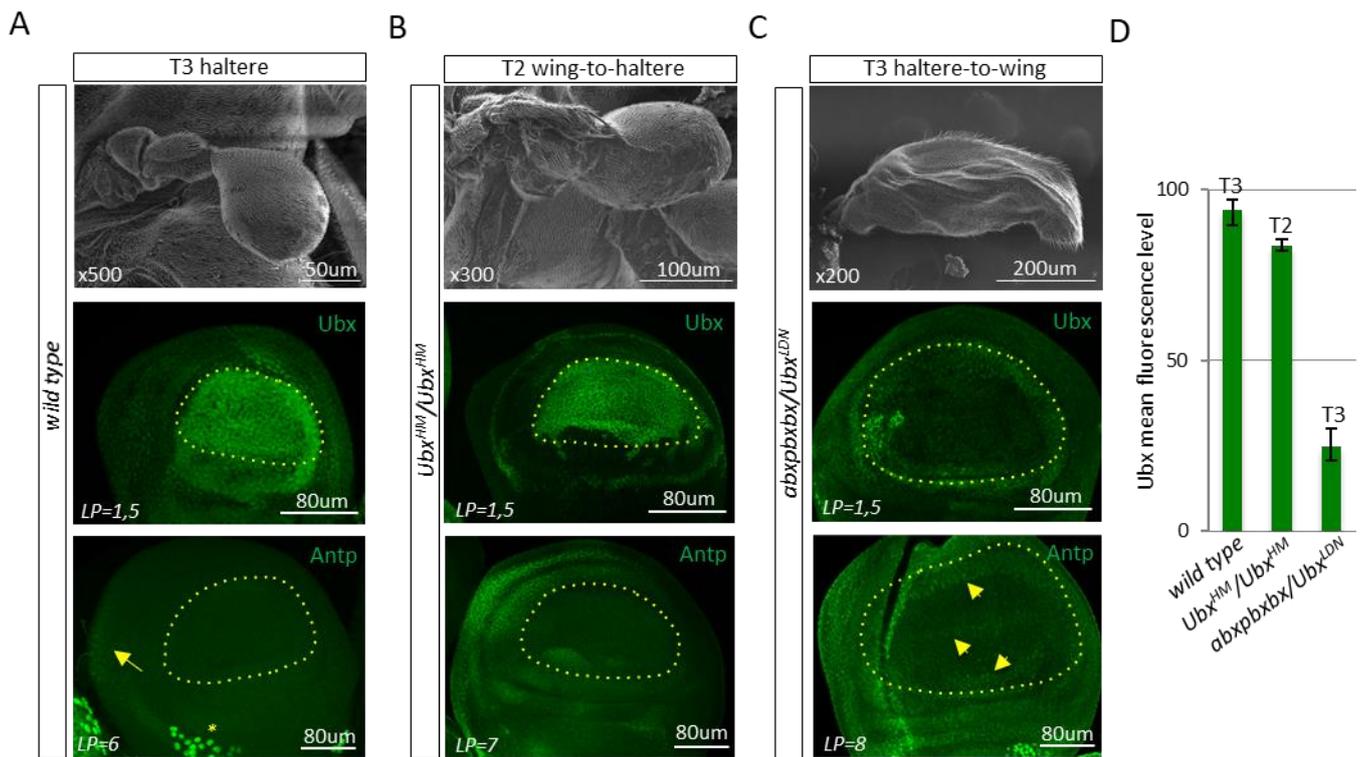
Figure 2. The expression of Antp in the wing disc pouch is important for proper formation of the *Drosophila* adult wing blade. **A.** Expression profile of Antp (green) in the wing disc at the larval stages 1 (L1), 2 (L2) and 3 (L3). The pouch region is outlined (yellow dotted line) and enlarged (red box) to better show the typical expression pattern that becomes progressively restricted to the ventral and dorsal sides. Yellow arrow depicts the peculiar profile in cells across the dorsal-ventral boundary of the pouch, which is apparent from L2 to mid-L3 larval stages. The pouch (p), hinge (h) and notum (n) regions are indicated in the L3 wing disc. This expression profile was observed in four independent experiments (n=25). **B.** Illustrative SEM pictures of adult wings from control (*MS1096-Gal4* driver with *UAS-Cas9*, n=18) and *Antp* mutant (*MS1096-Gal4* driver with *UAS-Cas9* and *UAS-gRNAs* against *Antp*, n=25) males, as indicated. The yellow star indicates wing margin defect (observed in 61% of dissected wings). **B'.** Quantification of the wing area in the control (1) and *Antp*-mutant (2) flies. The loss of *Antp* induces a significant reduction of the wing size (****P*value<0,0001). Bars represent mean \pm SD of three independent experiments. **C.** Illustrative SEM picture of a *CRISPR/Cas9*-induced *Antp* mutant wing with the *Distalless (Dll)-Gal4* driver. This context does not affect wing size but leads to strong reproducible wing margin defects (19/21 dissected wings from two independent experiments). **D.** Co-expression of Antp (red) with wing specifying genes (green) in the pouch of wild type L3 wing disc, as indicated. **D'.** Expression of wing specifying genes (red) upon CrispR-Cas9-induced loss of *Antp* in the wing disc pouch with the *MS1096-Gal4* or *Distalless (Dll)-Gal4* driver, as indicated. Yellow arrows depict sites with affected expression. The number of discs with affected expression among the total number of dissected discs from two independent experiments is indicated (n).



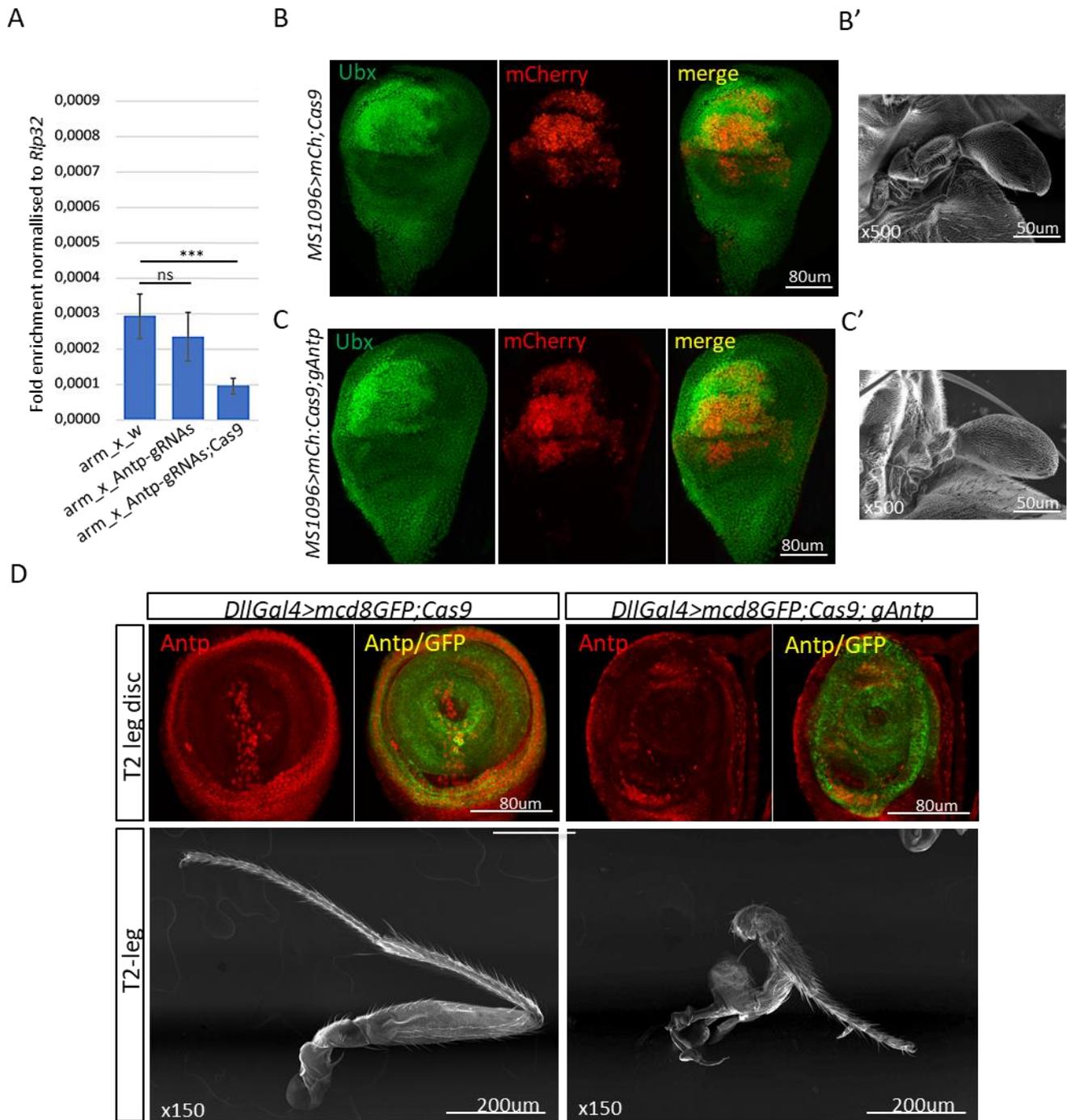
Expanded view 4. Antp expression in the wing disc pouch. **A.** Illustrative Antp staining (green) across different stacks (each stack is 0.2um) of a confocal acquisition of mid-L3 wing disc. Note the homogenous expression in the dorsal and ventral sides of the pouch (yellow dotted line) and the line of low- and few high-expressing cells along the dorsal-ventral boundary of the pouch (yellow arrows). **B.** Antp staining (green) with the historical 4C3 antibody that has previously been used for the first description of Antp expression in the wing imaginal disc ⁵. **C.** Antp staining (green) with the 8c11 antibody used in this study. Pictures on the right are 3D-plot projection made with Fiji to better highlight the zones with high and low levels of expression (the low-to-high expression level follows the cyan-white-green-yellow-red color gradient). **D.** GFP staining (green) of the mimic-modified line homozygous for endogenous *Antp-GFP*. A L2 and L3 wing disc is shown. The pouch is outlined (yellow dotted line). **E.** Expression of the *UAS-mCherry* reporter (magenta) driven by the *P1-Antp* promoter in front of *Gal4* in mid-L3 wing disc. This driver shows more intense staining across the dorsal-ventral boundary of the pouch (yellow arrow). The pouch is outlined (yellow dotted line). All profiles were observed in two independent experiments (with a minimum n=10).



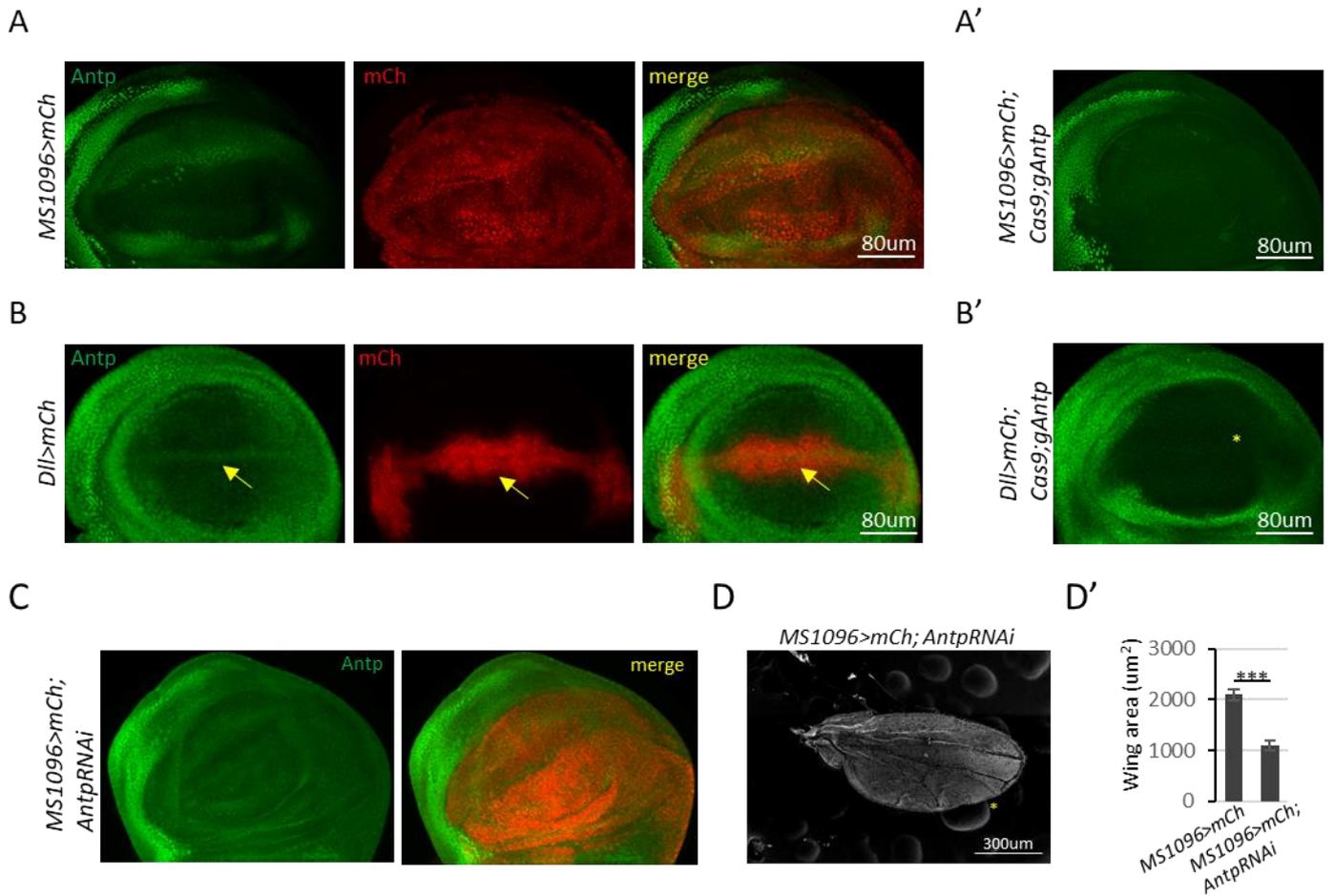
Expanded view 5. Wild-type L3 wing disc single cell RNA-seq data recapitulates the ANTP expression profile obtained from immunostaining. **A.** Virtual discs built to predict gene expression pattern of *nubbin* (*nub*), *teashirt* (*tsh*), *Antp*, and *Ultrabithorax* (*Ubx*). The yellow-to-dark red colour code symbolises the weak-to-high gradient expression level. The corresponding expression level deduced from RNA-seq in the group of wing epithelial cells is shown (with a light-to-dark red gradient symbolizing low-to-high expression levels). The normalized expression level is plotted on a UMAP projection from the whole wing disc. A small group of myoblast cells is also shown below for comparison with the group of wing epithelial cells. **B.** UMAP projections of pouch cells sub-set by marker gene *nub* and colored by the expression levels of *nub*, *tsh*, *Antp* and *Ubx*. **C.** UMAP projections of pouch cells coloured by the expression levels of *homothorax* (*hth*), *nab*, *spalt-major* (*salm*), and *wingless* (*wg*).



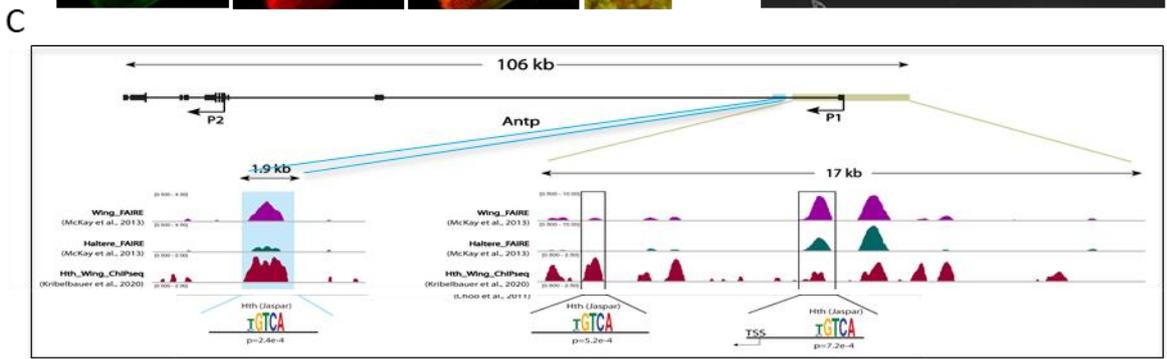
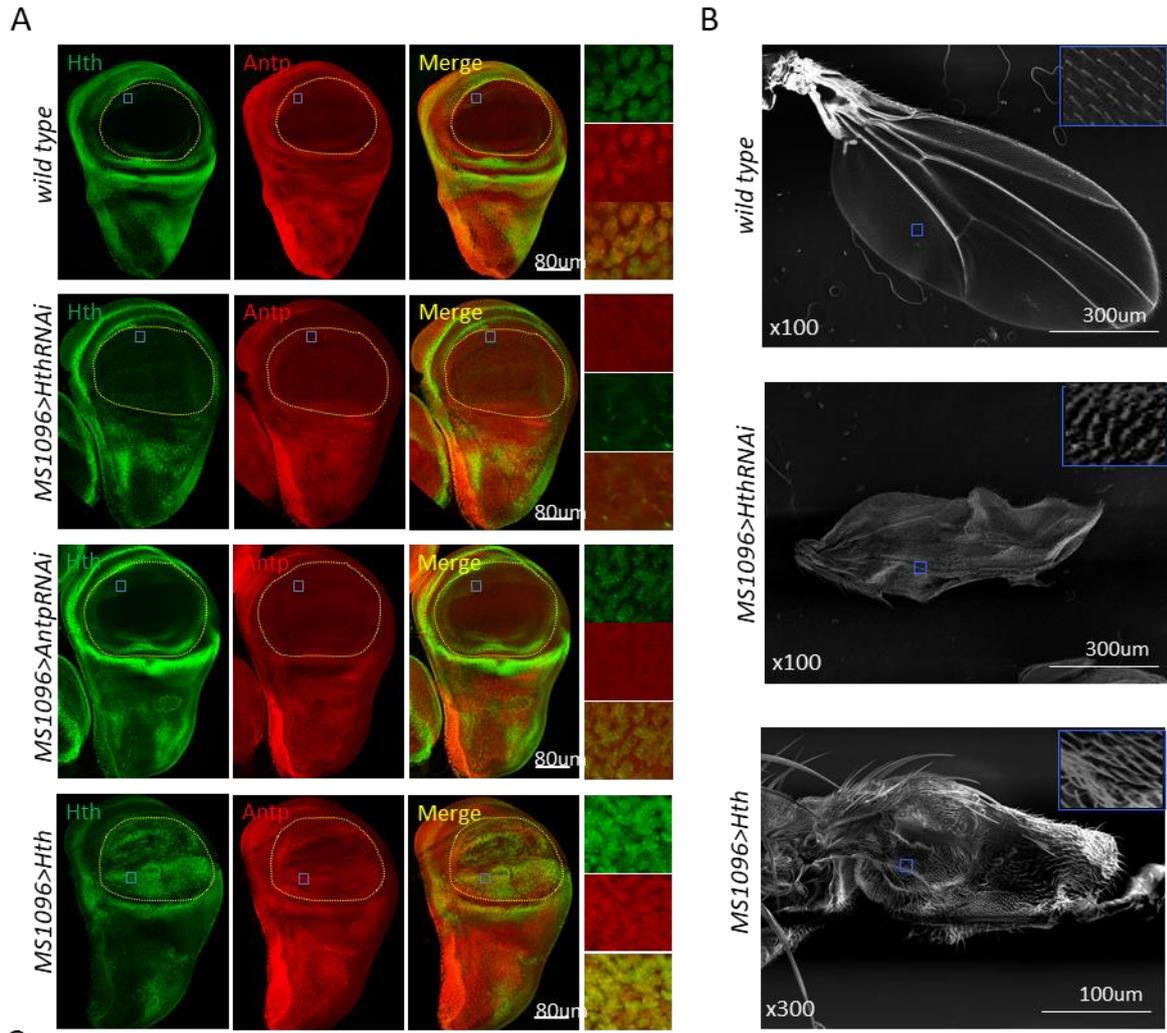
Expanded view 6. Expression of Antp and Ubx in transformed wing or haltere. **A.** Illustrative SEM picture of adult wild type haltere and expression of Ubx or Antp (green) in the wild type haltere disc. Antp is weakly expressed in a few cells of the hinge (yellow arrow) and in surrounding mesodermal cells (yellow star). **B.** Illustrative SEM picture and expression of Ubx or Antp (green) of the T2 wing-to-haltere transformed tissue in Ubx^{HM} homozygous individuals. 100% of individuals displayed the same phenotype. The transformation of the wing into a haltere correlates with the loss of Antp and the gain of Ubx expression in the pouch. **C.** Illustrative SEM picture and expression of Ubx or Antp (green) in the T3 haltere-to-wing transformed disc of $Ubx^{LDN}/abxpbbxbx$ individuals. 100% of individuals displayed the same phenotype. Note the strong decrease of Ubx and the gain of Antp expression in the pouch (yellow arrows), which is reminiscent of the normal Antp profile in the wing pouch. The pouch region is outlined in the wing and haltere disc (yellow dotted line). Laser power (LP) used for confocal acquisition is indicated. **D.** Quantification of Ubx expression level in the pouch in the different genetic backgrounds. These quantifications were calculated from discs prepared from two independent experiments (minimum n=10).



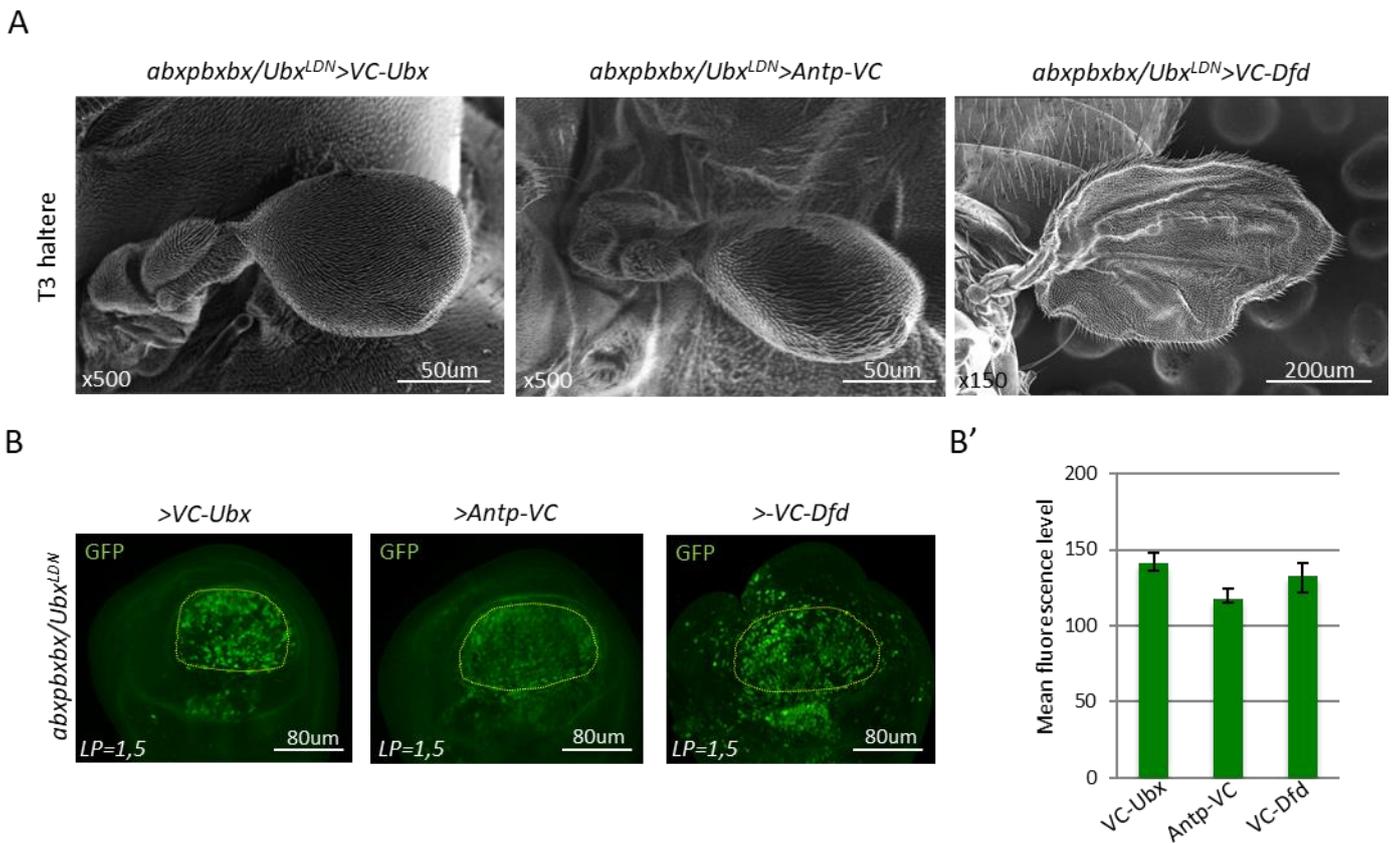
Expanded view 7. Specificity of the *gRNAs* against *Antp*. **A.** qPCR against *Antp* upon expression of *Antp-gRNAs* and *Cas9* with the ubiquitous *armadillo-Gal4* driver in the embryo. Compared to the controls (ns, non-significant), *Antp* expression is specifically affected (75% loss on average) when both *Antp-gRNAs* and *Cas9* are co-expressed (***) P value < 0,0001). Arm: armadillo-Gal4. W: white minus background. Bars represent mean \pm SD of three independent experiments. **B-B'.** Endogenous Ubx expression (green) is not affected in *MS1096*-driven mCherry (mCh, red) and *Cas9* in the haltere disc (B, n=10 from two independent experiments). Corresponding illustrative SEM acquisition of a non-affected adult haltere (B', n=15 from two independent experiments). **C-C'.** Endogenous Ubx (green) is not affected upon the co-expression of *mCherry*, *Antp-gRNA* and *Cas9* with the *MS1096-Gal4* driver (C, n=10 from two independent experiments) and no phenotype is observed in the adult haltere (C', n=15 from two independent experiments). **D.** Specificity of the *Antp-gRNAs* in the leg disc. The *Dll-Gal4* expressing cells are traced with the mcd8-GFP (green) reporter in the T2 leg disc that also expresses *Antp* (red). *Antp* is lost upon co-expression of *Antp-gRNAs* and *Cas9* (n=7 from two independent experiments), which led to adult leg phenotypes that are reminiscent of classical *Antp*-mutant phenotypes (n=15 from two independent experiments).



Expanded view 8. Using Crispr/Cas9 and RNAi to specifically abolish *Antp* expression in the wing disc pouch. **A.** The expression of the red fluorescent reporter mCherry (mCh, red) with the *MS1096-Gal4* driver does not affect the expression of *Antp* (green) in the wing pouch (n=5 from one experiment). **A'.** The expression of *gRNAs* and Crispr/Cas9 against *Antp* with *MS1096* abolished the expression of *Antp* (green) in the wing disc pouch (n=10 from two independent experiments). Note that the expression profile of *MS1096* is not restricted to the pouch. **B.** The expression of the red fluorescent reporter mCherry (mCh, red) with the *Dll-Gal4* driver does not affect the expression of *Antp* (green) in the wing pouch (n=5 from one experiment). Yellow arrow highlights *Dll-Gal4* and *Antp* co-expressing cells along the dorsal-ventral boundary of the pouch of the early L3 wing disc. **B'.** The expression of *gRNAs* and Crispr/Cas9 against *Antp* with *Dll-Gal4* specifically abolished the expression of *Antp* (green) along the dorsal-ventral boundary of the wing disc pouch (n=10 from two independent experiments). **C.** Expression of a RNAi against *Antp* with the *MS1096-Gal4* driver (red) induces a loss of *Antp* (green) expression in the wing disc pouch (n=10 from two independent experiments). **D.** Illustrative SEM acquisition of the adult wing of an individual expressing *Antp-RNAi* with *MS1096*. These individuals display wing margin phenotypes (yellow star) and wing size reduction, as previously observed when using Crispr/Cas9 (n=17). **D'.** Quantification of the wing area in RNAi individuals shows a significant reduction of the wing size when compared to control individuals (***) P value<0,0001). Bars represent mean \pm SD of two independent experiments.



Expanded view 9. Hth is a positive regulator of *Antp* in the dorsal and ventral parts of the wing disc pouch. A. Expression of Hth (green) and Antp (red) in the different genetic contexts, as indicated. Yellow dotted line highlights the pouch (wild type disc) or the *MS1096-Gal4* expression profile, which is larger than the pouch. Enlargement in the region of Hth and Antp co-expressing cells (blue box) is shown on the right for each genetic background. These observations were obtained from two independent experiments (a minimum n=10 for each different genotype). **B.** Illustrative SEM acquisitions of wild type and mutant adult wing, as indicated. Loss of *Hth* induces wing phenotypes that are reminiscent yet more pronounced than the phenotypes observed upon the loss of *Antp* (wing size reduction and margin defects). The ectopic expression of Hth induces wing-to-haltere like transformations, as assessed by the global shape and the organization of hairs (shown in the enlargement). These phenotypes were reproducibly observed from two independent experiments (n=15/17 for *HthRNAi* and n=17/20 for *UAS-Hth*). **C.** Hth binding profile on the *P1 cis*-regulatory sequences and an additional putative enhancer (highlighted in blue) of *Antp*, as deduced from Chip-seq performed in the wing disc. Hth binding sites found in the wing disc correlate with chromatin-accessible regions. These binding sites are poorly or not accessible in the haltere disc (as deduced from FAIRE analysis).



Expanded view 10. Antp can replace Ubx for haltere specification. **A.** Illustrative SEM picture of haltere rescue in the *abxpbxbx/UbxGal4^{LDN}* background upon the exogenous expression of VC-Ubx (n=16/17), Antp-VC (n=12/17) and VC-Dfd (n=10/10). **B.** Immunostaining of the VC-Ubx, Antp-VC and VC-Dfd fusion proteins²⁸ used in the rescue assay. The pouch is underlined (yellow-dotted circle). **B'.** Quantification of the expression level of Hox fusion constructs in the haltere pouch, as deduced from the GFP immunostaining against the VC fragment⁴². Quantification was obtained from at least four different individuals (8-10 discs on average), and took into account the laser power (LP). Bars represent mean \pm SD of two independent experiments.

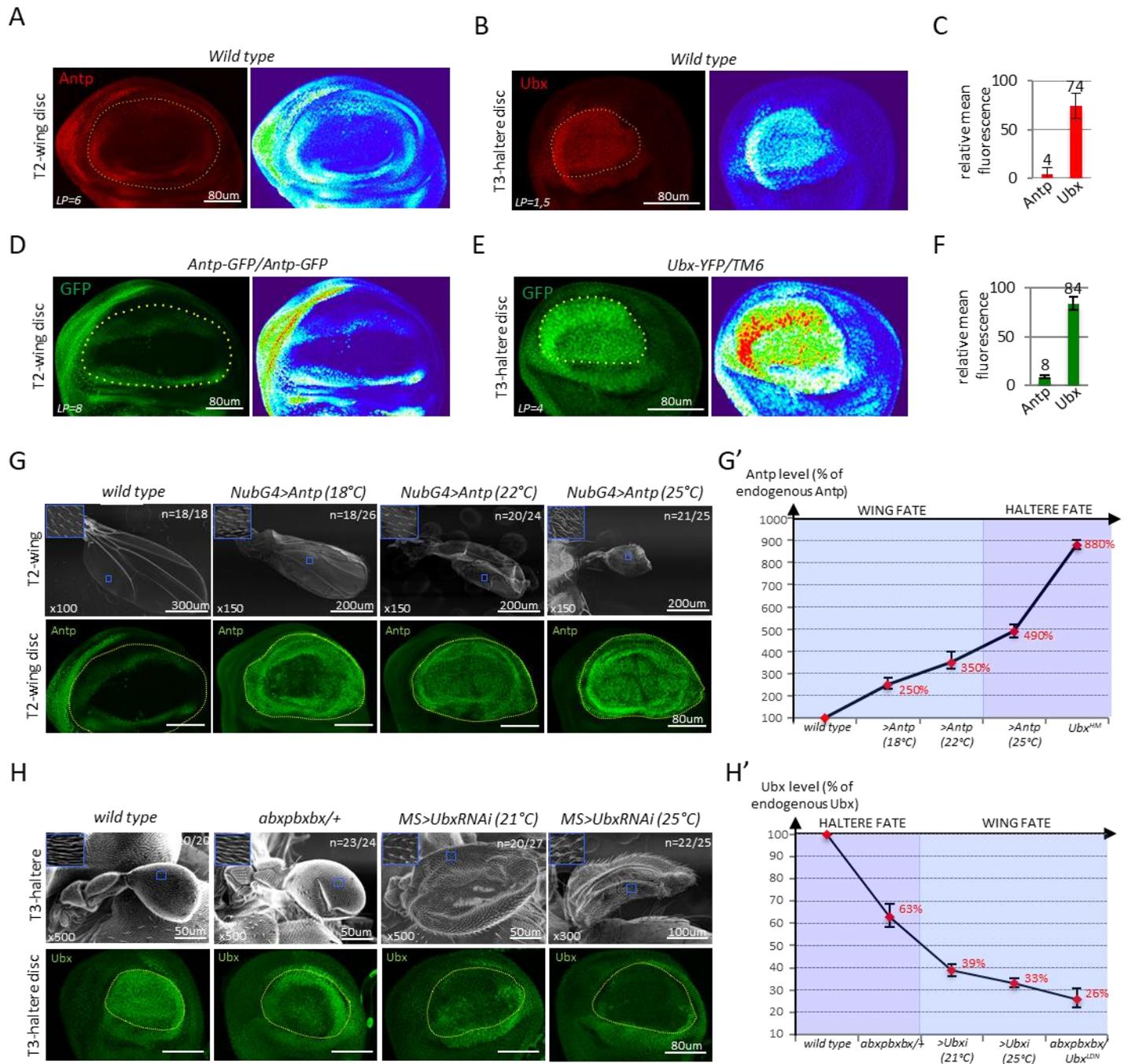


Figure 3

Figure 3. Role of the Hox dose for flight appendage specification in *Drosophila*. **A.** Antp immunostaining (red) in the wing pouch of late L3 larva. **B.** Ubx immunostaining (red) in the haltere pouch of late L3 larva. A 3D surface plot profile is shown for each staining to better highlight the various levels of expression (using the Fiji thermal LUT colour code). **C.** Graph showing the quantification of the mean fluorescence intensity when considering all Antp and Ubx expressing cells in the wing and haltere pouch, respectively. Values are indicated above each column and were obtained from discs dissected from at least 5 different individuals in two independent experiments (n=20 discs). The final quantification takes into account the laser power (LP) used for confocal acquisitions (which is 4 times less strong for Ubx immunostaining). The ratio between Ubx and Antp immunostaining (74/4) shows a fold change of 18,5. **D.** Illustrative confocal picture of GFP staining (green) in the T2 wing disc of homozygous *Antp-GFP* individuals. **E.** Illustrative confocal picture of a GFP staining (green) in the T3 haltere disc of heterozygous *Ubx-YFP* individuals. A 3D surface plot profile is shown for each staining. **F.** Graph showing the quantification of the mean fluorescence intensity when considering all GFP positive cells in the wing and haltere pouch, respectively. Values are indicated above each column and were obtained from discs dissected from at least 5 different individuals in two independent experiments (n=20 discs). The final quantification takes into account the laser power (LP) used for confocal acquisitions (which is 2 times less strong for GFP immunostaining in the haltere pouch) and the genotype (two copies for *Antp-GFP* and one copy for *Ubx-YFP*). The ratio between the haltere and wing disc pouch (84/8) shows that Ubx is 10,5 times more highly expressed than Antp. Considering that the GFP antibody has the same affinity in the wing and haltere disc pouch, we conclude that the Antp antibody is 1,85 times less affine than the Ubx antibody. **G.** Increasing the dose of *Antp* in the wing disc pouch led to progressive wing-to-haltere transformation phenotypes. Over-expression of Antp was performed with the *Nub-Gal4* driver at different temperatures. Effects were observed in two independent experiments and fluctuate from 68% (18°C, n=18) to 75% (25°C, n=15) and 81% (22°C, n=18) of the total number of dissected wings. Enlargements on SEM pictures show hairs' shape and organization, which look like in the haltere at the highest dose. Bottom panels show the immunostaining of Antp in each condition (a minimum n=10 from two independent experiments). **H.** Decreasing the dose of *Ubx* in the haltere disc pouch led to progressive haltere-to-wing transformations. Ubx expression was affected by using the *abxpbxbx* heterozygous allele, and by expressing RNAi against *Ubx* with the *MS1096-Gal4* driver at two different temperatures. These effects were robustly observed in two independent experiments and fluctuate from 72% (21°C, n=20) to 81% (25°C, n=18) and 92% (*abxpbxbx/+*, n=24) of the

total number of dissected halteres. Enlargements on SEM pictures show hairs' shape and organization, which look like in the wing at the lowest Ubx doses. Bottom panels show the immunostaining against Ubx in each condition (a minimum n=10 from two independent experiments). **G'-H'**. Curves showing the relationship between the wing or haltere fate and the level of Antp or Ubx (given as a percentage of the corresponding endogenous expression level in wild type condition, and deduced from the fluorescent immunostaining in the pouch). Wing and haltere fates were deduced from SEM acquisitions, taking into account the size, the presence or not of veins, and the organization of hairs. Bars represent mean \pm SD of two independent experiments.

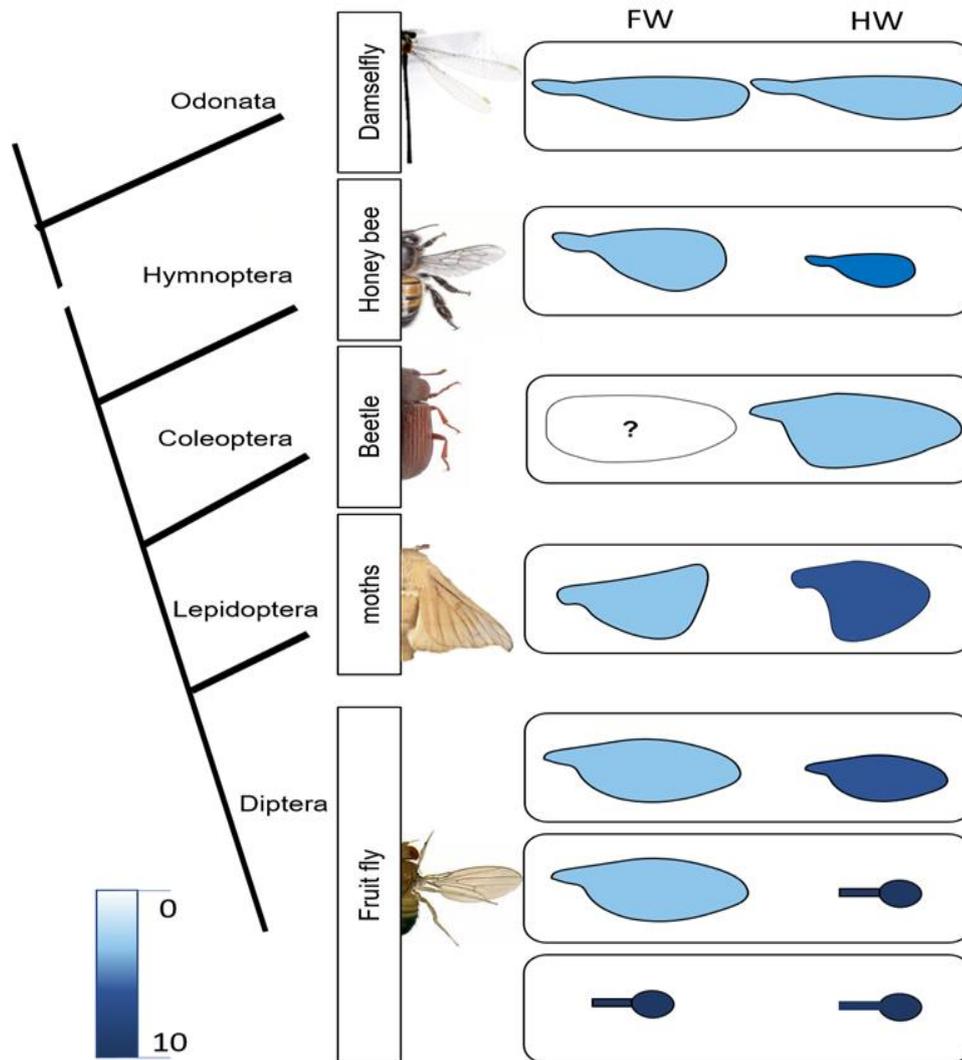


Figure 4

Figure 4. Hox dosage variation and the evolution of flight appendages in insects. The model is based on the total Hox (Antp + Ubx) expression level in the forewing (FW) and hindwing (HW) primordia, as measured in this study. Graded blue colour depicts the Hox level (from light blue/low dose to dark blue/high dose). Genetic experiments in *Drosophila* showed that modifying the Hox dose could transform the haltere or the wing into a wing or a haltere, respectively (lower and upper panels). Work in the beetle *Tribolium castaneum* showed that the FW formation was Hox-independent (Tomoyasu et al. 2005), indicating that alternative strategies could also be used to diversify flight appendages in insects.

Partie 2 : Identification de cofacteurs de Ubx nécessaires lors du développement des haltères à l'aide d'un crible par interférence ARN

Introduction

Les gènes Hox fascinent les biologistes depuis la découverte de leurs rôles essentiels quant au développement des différentes structures du corps le long de l'axe antéro-postérieur (Durstun 2020). Ils codent pour des facteurs de transcription à homéodomaine (HD) pouvant médier des fonctions extrêmement spécifiques au sein des différents tissus où ils sont produits. Cependant, les HD des différentes protéines Hox sont très similaires, et présentent *in vitro* une affinité similaire pour des motifs courts identiques (Mann et al. 2009). Il est donc considéré que la spécificité fonctionnelle des protéines Hox *in vivo* puisse reposer sur : (i) des profils d'expression spécifiques (Casares et al. 1996 ; Hirth et al. 2001) ; (ii) des concentrations différentes (Smolik-Utlaut 1990 ; Refki et al. 2014 et Paul et al.) ; (iii) des interactions avec des cofacteurs différents pouvant aider les protéines Hox à réguler des gènes cibles différents (Merabet et Mann 2016). Cependant, peu de cofacteurs sont décrits pour agir sur la spécificité transcriptionnelle des protéines Hox.

Identifier ces cofacteurs nécessite de mettre en place une approche de crible lors d'un processus développemental contrôlé spécifiquement par une protéine Hox. Un tel contexte est retrouvé lors du développement des haltères chez la drosophile, qui repose sur l'activité de la protéine Ubx (Lewis 1982). Ubx agit à différents niveaux pour à la fois inhiber le programme développemental des ailes et promouvoir le programme développemental des haltères (Pavlopoulos et Akam 2011). Ce contexte développemental bien décrit est ainsi approprié pour poser la question des partenaires transcriptionnels d'une protéine Hox.

Lors de ce projet, nous avons développé une approche de crible fonctionnel par interférence ARN (RNAi) afin de déterminer quels gènes pouvaient potentiellement être nécessaires à Ubx afin d'orchestrer correctement le développement de l'haltère. Nous avons testé la fonction de liste de 187 candidats sélectionnés à partir de données bibliographiques. Le système Gal4 employé induisant l'interférence ARN dans les primordia des haltères et des ailes, nous pouvons comparer l'effet de la perte de fonction d'un même candidat sur ces deux organes homologues en série.

Les phénotypes produits lors de l'interférence ARN médiée par le système UAS/Gal4 dans les primordia d'ailes et d'haltères a permis de confirmer la similarité des gènes impliqués dans le développement de ces deux organes homologues en série. Ce crible a permis de mettre en évidence plusieurs cofacteurs potentiels, incluant des cofacteurs de protéines Hox déjà décrits comme Homothorax, ou de nouveaux candidats comme Grain, mais aussi de probables régulateurs de Ubx.

L'utilisation d'un contexte génétique sensibilisé facilite l'analyse des phénotypes provoqués lors du crible fonctionnel par ARNi

Chez la drosophile, le système UAS-Gal4 est un outil très pratique permettant de diriger l'expression d'un transgène de manière spatio-temporellement spécifique. Ce système peut donc être utilisé pour la recherche de gènes impliqués dans le développement de l'haltère, et donc collaborant potentiellement avec Ubx. Un tel crible peut être réalisé par une approche de gain ou de perte de fonction des gènes candidats, par exemple en utilisant respectivement des transgènes portant des séquences codantes ou des ARN interférents sous le contrôle de séquences UAS. Nous avons choisi de nous focaliser sur une approche par perte de fonction, considérant que la sur-expression ou l'expression ectopique d'un gène provoquant un phénotype ne reflète pas systématiquement sa nécessité lors du processus biologique normal.

Notre crible fonctionnel par ARNi est basé sur la banque de lignées générées par le Transgenic RNAi Project (TRiP), permettant d'induire l'interférence ARN pour près de 12 000 gènes chez la drosophile (Perkins et al. 2015). Afin de diriger spécifiquement l'ARNi au sein des primordia d'haltères, nous avons choisi d'utiliser l'allèle *MS1096-Gal4*. *MS1096-Gal4* permet d'induire l'expression de Gal4 spécifiquement au niveau du pouch des disques imaginaux d'haltères, la zone présomptive de la partie la plus distale de l'haltère, le capitellum, où la dose de Ubx est la plus élevée (**Figure S1A**). *MS1096-Gal4* médie également l'expression de Gal4 au sein du pouch des disques d'ailes, ce qui explique que cet allèle ait été auparavant utilisé lors de cribles fonctionnels afin d'identifier des gènes impliqués lors du développement de l'aile (Schertel et al. 2015). Dans notre contexte, cela permet de comparer l'impact de l'ARNi de gènes candidats dans ces deux contextes développementaux homologues (**Figure S1B**).

En dehors de l'étude du rôle homéotique de Ubx, les régulateurs du développement de l'haltère sont peu décrits. La sélection des gènes candidats s'est donc principalement basée sur l'idée que le développement des ailes et des haltères puisse reposer sur des mécanismes homologues. En effet, Ubx est décrit pour modifier à plusieurs niveaux le programme développemental de l'aile pour induire le développement de l'haltère, suggérant une base moléculaire commune. Cette idée est renforcée par l'observation du fait que l'activation ectopique de Ubx dans le primordium d'aile suffit pour transformer les ailes en haltères : tous les cofacteurs potentiellement nécessaires à la fonction de Ubx doivent donc se trouver dans le primordium d'aile. Ainsi notre liste de candidats inclut des gènes codant pour des facteurs de transcription rapportés pour être impliqués lors du développement de l'aile (Schertel et al. 2015), et a été élargie à certains gènes exprimés dans les primordia d'aile et/ou d'haltère, et codant pour des protéines nucléaires, rapportés comme pouvant provoquer des phénotypes de l'haltère ou de l'aile en cas de mutations. La liste finale comprend 276 gènes candidats (**Table 1**).

	Category	FlyORF	W/H phenotpe	RNA ₁ line
ab	Zinc Finger	HA/CC/VN	Wing	32378
ac	bHLH	HA/VN/CC	Wing	51834
achi	HD	HA/CC	Wing (over)	
Adf-1	MADF-BESS		Wing (over)	28680 and 31500
Al	HD	HA/CC/VN	Wing	26747
Alh	Zinc Finger	HA/VN	Wing vein	39057
Antp	HD	HA/VN/CC	Wing	64926
ap	HD	HA/CC/VN	Wing	26748
Apc2	Wingless regulator	HA	Wing	
apt	SANT-MYB	HA/VN	Wing/Haltere (over)	26236
ara	HD (TALE)	HA/CC/VN	Wing	27060
arm	Beta-catenin	HA	Wing	31305
ase	bHLH	HA	Wing (over)	
ash1	Histone modif		Wing/Haltere	36803
ash2	TrxG	HA/CC	Wing/Haltere	64942
Asx	ETP		Wing/Haltere	31192
Axud1	Tumor suppressor		Wing	
bab2	HD-like	HA/VN	Wing/Haltere (over)	57419
bap	Homeobox	HA/CC	Wing (over)	
bbg	PDZ-domain		Imaginal discs	
bcd	HD	HA	Wing (over)	
bi	T-box		Wing	28341
bin	Forkhead box	CC/Vnshort		
Blimp-1	Zinc Finger		Wing (over)	
bowl	Zinc Finger	HA/Vnshort	Wing (over)	
brk	Brinker-DBD	HA/VN	Wing (over)	51789
brm	Brahma		Haltere/Wing (over)	35211
bs	MADS-Box	HA/VN/CC	Wing	26755
bsk	MAPK	HA	Wing (over)	
btd	Zinc Finger	HA/VN/CC	Wing	29453
Bx	Zinc Finger		Wing/Haltere	29454 and 57465
cad	HD	HA/VN	Wing (over)	57546
caup	HD	HA	Wing	44002
cbt	Zinc Finger	HA	Wing (over)	38276
cg	Zinc Finger	HA/VN	Wing	34668
CG10947				
CG15784	zinc finger		Mesothoracic tergum	
CG3008				
CG6841	RNA processing			
chinmo	Zinc Finger	HA/VN	Wing (over)	26777
ci	Zinc Finger		Wing	64928 and 28984
cic	HMG-box	HA/CC/VN	Wing	25995
Clamp	Zinc Finger	HA/VN	Wing (over)	57163
Clp	Zinc Finger	HA/VN		57154
cnc	leucine-zipper	HA/VN	Wing (over)	32863 and 40854
Coop	MADF-BESS	HA	T2	29350
CoRest	SANT-MYB	HA/CC/VN	Wing (over)	31743
corto	ETP		Haltere/Wing	42629
crc	leucine-zipper	HA/VN	Wing/Haltere	25985
crol	Zinc Finger	HA/CC	Wing	41669
crp	bHLH	HA/VN	Wing	31896
ct	HD	CC	Wing	33967
CTCF	Insulator/Zn Finger	HA/VN	Wing	35354
cyck	cyclin	HA		
Cyp1	cyclophilin-like			
D	HMG-box	HA/CC/VN	Wing/Haltere	34672
D1	AT-Hook	HA	Wing (over)	28616 and 33655
d4	Histone modif	HA/CC	Wing (over)	43186 and 35665
da	bHLH	HA/VN	Wing	38382 and 35686
dac	TF		Wing (over)	35022 and 26758
Deaf1	SAND-Domain	HA/VN	Wing (over)	32512
Dfd	HD	HA/CC/VN	Wing (over)	
Diap1	ubiquitin ligase		Wing	
did			Imaginal discs	
DIP1	RNA processing	HA/VN	Wing/Haltere (over)	35226
Dis3	RNA processing		Wing (over)	
disco	Zinc Finger			28659
discro-r	Zinc Finger		Wing	41683
Dll	HD	HA/CC/VN	Haltere/Wing	29337 and KK VDRC
Doa	RNA maturation	HA	Wing	
Doc3	T-Box	HA	Wing	62493
Dr	HD		Wing	42891
Drak	Protein Kinase		Wing	36655
Dref	Zinc Finger	HA/VN/CC	Wing (over)	31941

ds	cadherin		Wing	32964
dsh	winged helix	ORF	Wing	
Dsp1	HMG-box	HA	Wing/Haltere	31960
dve	HD	HA/VN	Wing	26225
E(spl)m4-BFM	B helix	HA	Wing (over)	
E(spl)mGamma-HLH	bHLH	HA/CC	Wing (over)	
E(z)	PcG	HA	Haltere/wing	36068
ebd1	Homeobox-like			
ecd	RNA processing	CC	Wing	
EcR	Nuclear receptor	HA/VN	Wing	50712
eIa			Haltere and wing	
elav	RNA processing		Wing	28371
eIB	Zinc Finger	HA	Wing	41960
emc	bHLH	HA/CC/VN	Wing	26738
en	HD		Wing/Haltere(over)	33715 and 26752
erm	Zinc Finger	HA/VN	Wing (over)	50661
esc	PcG	HA/CC/VN	Wing	31618
esg	Zinc Finger	HA/CC/VN	Wing	34063 and 57148
exd	HD	HA/CC/VN	T2/T3/discs	34897 and 29338
ey	HD	HA/CC	Haltere/Wing (over)	32486
eyg	HD	HA	Wing (over)	26226
Fhos	arm like		Wing	
Flacc	RNA processing	HA/CC	Wing	67898
fo			Haltere and wing	
foxo	Forkhead-box	HA/VN	Wing	32427
ftz	HD	HA/CC	Haltere/wing	33761
Gatad	Zinc Finger	HA/VN	Wing (over)	33747
geminin	DNA replication	ORF/HA	Wing (over)	
grh	PcG recruiter	HA/CC/VN	Wing	34578
Gsc	HD	HA/CC/VN	Wing (over)	50894
H	Notch regulator		Haltere/Wing (over)	34703
h	bHLH	HA/VN	Wing	34326
H2O	HD	HA/VN	Wing (over)	
hb	Zinc Finger	HA/VN	Wing (over)	34704
HDAC1	Histone modif		Wing	36800
HDAC3	Histone modif		Wing (over)	
Hexim	RNA binding		Wing (over)	
Hfp	splicing		Wing (ectopic)	
hh	Hedgehog		Wing	32489
hl			Haltere	
hmg-2	HMG-box	HA/CC	Wing (over)	
hng1	MADF-BESS	HA/CC	Wing (over)	
hng2	chromatin modification	HA/CC	Wing (over)	
HP1b	Chromatin binding	HA/VN/CC	Wing (over)	32401
Hr83	Nuclear receptor	HA/CC/VN	Wing (over)	65077
Hsc70-4	Heat Shock protein	HA	Wing	
hth	HD	HA/VN/CC	Wing/Haltere	34637
hyd	ubiquitin ligase		Haltere disc and wing	
insv	DNA binding TF	HA	Wing (over)	
inv	HD	HA/VN	Wing	41675
Jgr1	chromatin modification		Wing (over)	
jumu	Forkhead domain	HA/CC	Wing	35438 and 44117
klu	Zinc Finger	HA/VN	Wing (over)	60469
kn	bHLH	HA/VN/CC	Wing	31916
Larp7	RNA/DNA binding		mesothoracic tergum	
lgs	Wnt enhanceosome		Wing	
Lin29	Zinc Finger	HA/CC	Wing (over)	26711
lin-52	TF			
lola	Zinc Finger	HA	Wing (over)	35721 et 26714
lolal	POZ-BTB	HA/VN		31632 et 35722
luna	Zinc Finger	HA/VN	Wing (over)	27084
Mad	MAD domain	HA/CC	Wing	31315
mam	Mastermind family	VN	Wing	63601
mamo	Zinc Finger	HA/VN	Wing (over)	51770
mars	Microtubule associated			
mats	MOB1/phocein family		Wing	
Max	bHLH	HA/VN	Wing (over)	40851
mbl	RNA processing		Wing (over)	29585
mcd			Haltere	
Med	MAD domain	HA/VN/CC	Wing	31928
MED31	Mediator		Haltere	34574
MEP-1	zinc finger	HA	Wing (over)	62180
Mes2	MADF-BESS		Wing/Haltere (over)	32460
Mi-2	nucleosome remodeler		Wing (over)	
mid	T-BOX	VN		

mirr	HD	HA/VN	Haltere/Wing	31907
Mnt	bHLH	HA	Wing	42552
mod	RNA processing	HA/CC	Wing	35664
mor	TrxG	VN	Wing	34919 and 35662
mrn	TF	HA	Wing (over)	
mwg			Haltere/Wing	
mxc	Histone locus body		Haltere disc/Wing	
Myb	SANT-Myb	HA	Wing/Haltere	35053
Myc	bHLH		Wing	51454
N	Notch		Wing	
nab	NAB-domain		Wing	64557
nkd	NKD family		Wing/Haltere (over)	
nmo	Ser/Thr kinase		Wing	
noe	lncRNA			32407
Nop60B	RNA processing		Wing (over)	
Nos	NADPH-reductase			
nub	HD	HA/VN	Wing/Haltere	55305 and 28338
Oaz	Zinc Finger	HA/VN	Wing (over)	25923
Oda	ODC antizyme family		Haltere and wing	
oho31			Haltere and Wing discs	
Optix	HD	HA/VN	Wing	55306 and 31910
osa	Brahma		Wing	
OSCP1		HA		
otp	HD	HA/VN	Wing (over)	57582
ovo	Zinc Finger	HA/VN	Wing (over)	42627
p53	p53 DBD	HA/VN/CC	Wing	36814
pAbp	RNA processing		Wing	36127
pad	Zinc Finger	HA/VN	Wing (over)	31944
pan	HMG-box	HA/VN/CC	Wing (over)	26743
Pc	PcG	HA	Wing/Haltere	33964
Pcl	PcG	HA/VN	Wing	33945
Pdm2	POU domain	HA/CC	Wing (over)	50665
pdm3	POU domain	HA/VN	Wing (over)	35726
peb	Zinc Finger			33901
ph-d	PcG		Wing	63018 and 31190
pho	PcG	HA/CC/VN	Wing	42926
ph-p	PcG		Wing	33669 and 35207
pk	Zinc finger		Wing	32413
pnr	GATA	HA	Wing	33744 and 33697
pnt	ETS domain	HA/VN/CC	Wing (over)	35038
prg	Zinc Finger		Thorax	36631
PRL-1	Phosphatase		Wing	
psc	Polycomb	HA	Wing	
psq	PcG	VN	Wing	35419
ptc	HH pathway		Wing	55686
Ptx1	HD		Wing (over)	57494
px	nuclear matrix protein		Wing	
pygo	zinc finger		Haltere disc and wing	
pzg	Zinc Finger	HA/VN	Wing	57793
qrt			Haltere disc and wing	
RbFox1	RNA processing		Wing (over)	32476
ref1	RNA export			
repo	HD	HA/VNshort	ectopic	
retn	AT rich Interaction		Wing	35688
Rfx	winged helix	HA/VN/CC	Wing	61847
Rif1	DNA replication		Ectopic (wing haltere)	
Roc1a	zinc finger			
Roc1b	enzyme/ zinc finger	HA		
row	Zinc Finger	HA/VN/CC	Wing (over)	25971
Rpl1215	RNA pol II		Wing/Haltere	38537
RYBP	ETP	HA	Wing/Haltere (over)	33974
salm	Zinc Finger	VN	Wing	33714
salr	Zinc Finger		Wing (over)	29549
sav	scaffold protein		Haltere and wing	
sbb	Zinc Finger		Wing/Haltere	27049
sc	bHLH	HA/VN/CC	Haltere/Wing (over)	26206
scd				
Scr	HD		Haltere/Wing (over)	50662
scrt	Zinc Finger	HA	Wing	55309
sct			Wing	
sd	TEA Domain	HA/VN/CC	Wing/Haltere	55404 and 35481
sens	Zinc Finger		Wing	55310
Ser	Notch ligand		Wing/Haltere	28713
shn	Zinc Finger		Wing	82982
sina	ubiquitin ligase	HA	Wing	

slmb	ubiquitin ligase		Haltere and wing	
slou	HD	CC	Wing	61203
SmD3	RNA processing	HA	Haltere/Wing disc	42633
Smn	spliceosome		Wing (over)	
Smox	MAD Domain	HA/VN/CC	Wing	41670
smt3	SUMO		Haltere/Wing	36125
sna	Zinc Finger	HA/VN/CC	Wing (over)	34906 and 28679
sno			Wing	
Snr1	TrxG	HA	Wing	32378
Sox14	HMG-box	HA/VN	Wing	34794
Sox15	HMG-box	HA/VN	Wing	57264
spen	RNA processing		Wing	33398
sr	Zinc Finger		Thorax	60024
ss	bHLH		Wing (over)	33415 and 26280
Ssdp	Wnt enhanceosome		Wing	62167
stg	nuclear enzyme	ORF/HA	Haltere and wing	
Su(H)	Beta trefoil (Notch)	HA	Wing/Haltere	28900
Su(Hw)	zinc finger			
sv	HD like	HA	Wing (over)	67973
tap	bHLH	HA	Wing (over)	34985
tara	TrxG		Wing/Haltere (over)	31634
Tet	DNA binding enzyme			
tey	ubiquitin ligase		Wing (over)	
tio	zinc finger			
tna	Zinc Finger		Haltere/Wing	29372
Tnpa	importin			
toe	HD	HA/VN	Wing (over)	50660
tow			ectopic	
Trl	TrxG	HA/VN/CC	Wing	67265 and 40940
trx	TrxG		Haltere/Wing	33703
tsh	Zinc Finger	HA/VN	Haltere/Wing	35030
ttk	Zinc Finger	HA/VN	Wing (over)	36748
ttr			Haltere	
tup	HD	HA	Wing	51763
twi	bHLH	HA/VN/CC	Wing	34330
tws			Haltere disc/wing disc	
Ubx	HD	VN	Haltere	31913 et 34993
unc-4	HD	HA/CC	Wing (over)	36713
usp	nuclear receptor			
Utx	TrxG		Wing/Haltere	34076
vg	Paired domain		Wing	31970
vis	HD	HA	Wing (over)	35738
Vsp2				
Wbp2	DNA binding enzyme		wing	
x16	RNA processing			
XRP1	AT-hook/bZip	HA/VN/CC	Wing (over)	34521
yki	Hippo		Wing	34067
z	PcG recruiter	CC	Wing (over)	35208
zf30c	Zinc Finger	HA/VN	Wing (over)	63544
Zfh2	Zinc Finger/HD		Wing	50643
Zif	Zinc Finger	HA/VN/CC	Wing (over)	29360
zld	Zinc Finger		Wing (over)	42016

Table 1 : Liste des candidats. Les candidats ont été sélectionnés sur la base de leur expression décrite dans les primordia d'aile et/ou d'haltere, parmi les gènes codant pour des protéines nucléaires (FlyBase). La première colonne indique le symbole des gènes candidats. La seconde indique le type de protéine codée. La troisième colonne indique la disponibilité d'une lignée FlyORF (Bischof et al. 2018) permettant des expériences de gain de fonction et de BIFC à l'aide du système UAS/Gal4 pour ces candidats. La quatrième colonne indique si un phénotype anormal au niveau des ailes ou des haltères (« Wing » / « Haltere ») est décrit pour être causé par la dysfonction de ces gènes candidats (la mention « over » précise quand il s'agit de phénotypes anormaux provoqués par un gain de fonction). La dernière colonne indique le numéro d'identifiant des lignées TRiP utilisées (Bloomington Drosophile Stock Center). Quelques lignées KK commandées au Vienna Drosophila Resource Center (VDRC) ont également été utilisées. Case verte : Type de transcrit connu/Lignée FlyORF disponible (ORF étiquetée avec un tag -HA, -VN ou -CC, Bischof et al. 2018)/provoquant un phénotype anormal dans l'aile ou l'haltere. Case orange : candidat au transcrit peu décrit/provoquant un phénotype au niveau du thorax ou des disques imaginaux. Rouge : pas de lignée FlyORF disponible/pas de phénotype décrit au niveau des appendices de vol, les disques imaginaux ou le thorax

L'allèle *MS1096-Gal4* n'induit aucun défaut morphologique de l'haltère (**Figure 1A et B**). L'utilisation de *MS1096-Gal4* pour induire l'ARN_i dirigée contre *Ubx* provoque une transformation de l'haltère en aile, ce qui confirme le bon fonctionnement de nos outils (**Figure 1C**). La transformation des haltères en ailes se caractérise par une augmentation de la taille, un changement morphologique montrant un aplatissement, une modification de l'organisation des trichomes, l'apparition de veines, et la présence de poils sensitifs caractéristiques de la marge de l'aile (**Figure 1D**). *Ubx* est également décrit pour être nécessaire à l'organisation des sensilles campaniformes au niveau des parties les plus proximales de l'haltère, et leur désorganisation peut également être interprétée comme un signe de perte d'activité de *Ubx* (Cole et Palka 1982). Ces différents critères serviront à caractériser les phénotypes obtenus lors de l'ARN_i dirigée contre des candidats lors du crible, étant donné que la perte de fonction d'un cofacteur de *Ubx* devrait se traduire par une activité réduite de *Ubx* pour spécifier le développement de l'haltère. Cependant, l'haltère est un organe très petit ce qui rend difficile son observation précise. La détection de défauts morphologiques subtils induits lors de l'interférence par ARN de candidats pourrait donc être difficile. L'utilisation d'un contexte génétique sensibilisé permettant d'accroître la sévérité des phénotypes provoqués par l'interférence ARN des candidats pourrait donc s'avérer nécessaire. Comme nous avons pu le constater dans la partie précédente (Paul et al.), diminuer la dose de *Ubx* permet de déstabiliser le programme développemental de l'haltère. En particulier, l'allèle *abxpbxbx* provoque une perte relativement importante d'environ 40 % de la dose de *Ubx*, ce qui n'induit pourtant qu'un phénotype très léger de perte de fonction de *Ubx*, caractérisé par un haltère à la morphologie sauvage mais aussi la présence de poils sensitifs ectopiques caractéristiques de l'aile, le plus souvent localisés au niveau de la base du capitellum, suggérant une très légère transformation en aile (**Figure 1E**). La combinaison de cet allèle muté de *Ubx* avec l'interférence ARN dirigée contre *Ubx* permet d'obtenir une transformation de l'haltère en aile plus marquée (**Figure 1F**). Cela suggère que combiner la diminution de la dose de *Ubx* due à cet allèle peut rendre le processus développemental de l'haltère plus sensible à d'autres perturbations. Combiner cet allèle muté de *Ubx* à notre crible par interférence ARN pourrait donc permettre de visualiser plus facilement l'impact de la perte de fonction de cofacteurs de *Ubx*. Cela pourrait permettre de compenser l'une des limites des cribles par perte de fonction, à savoir que les phénotypes obtenus ne révèlent que la part de la fonction du gène cible qui ne peut pas être compensée par d'autres gènes (Miklos et Rubin 1996). En effet, en absence de l'allèle *abxpbxbx*, relativement peu de candidats provoquent des défauts importants de développement de l'haltère (**Figure 1G et Table 2**). Sur les 187 gènes candidats testés, incluant *Ubx*, 110 n'ont provoqué aucun phénotype anormal, 23 ont provoqué un phénotype anormal seulement au niveau de l'aile, et 54 candidats ont provoqué un phénotype anormal au niveau de l'haltère. Ces 54 candidats peuvent être répartis en 3 groupes : les candidats provoquant un phénotype au niveau de l'haltère indépendamment du contexte sensibilisé par l'allèle *abxpbxbx*, ceux dont le phénotype est visible même en absence de *abxpbxbx* mais plus sévère en contexte sensibilisé, et enfin ceux provoquant un phénotype anormal de l'haltère visible seulement en contexte sensibilisé.

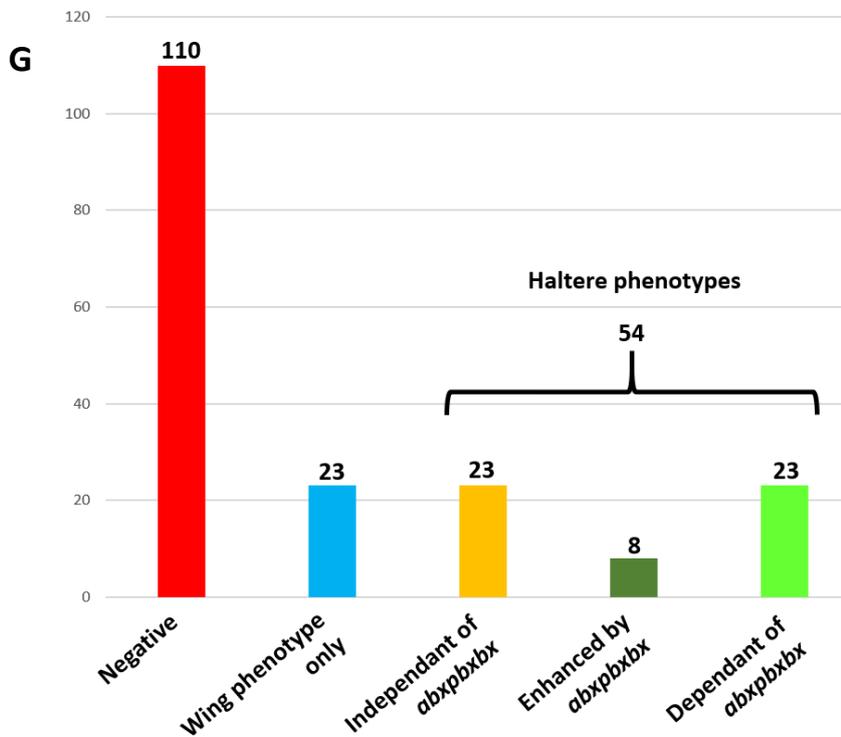
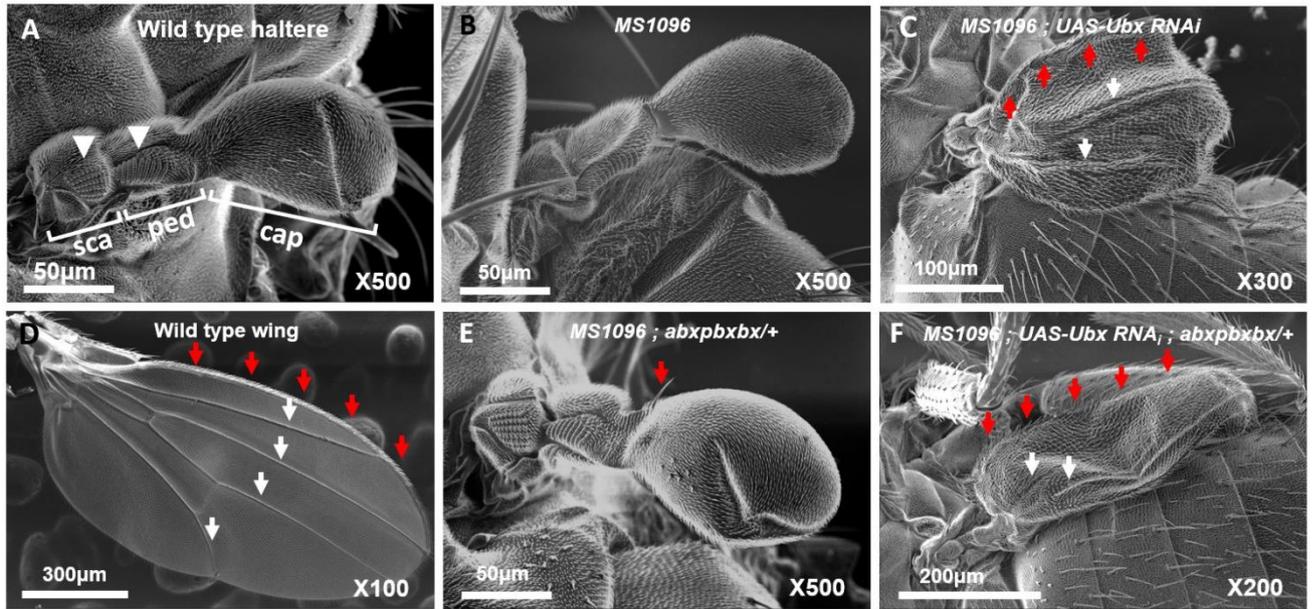


Figure 1 : Le crible fonctionnel par ARNi permet de mettre en évidence plusieurs catégories de candidats. A : l'haltere sauvage est constitué de 3 parties : le scabellum (*sca*), le pedicellus (*ped*) et le capitellum (*cap*). Le scabellum et le pedicellus sont les parties les plus distales et présentent des champs de sensilles campaniformes (pointes de flèches blanches). **B :** l'allèle *MS1096-Gal4* ne provoque aucun défaut notable de l'haltere. **C :** L'ARNi contre *Ubx* à l'aide de *MS1096-Gal4* provoque une transformation de l'haltere en aile. On observe l'apparition d'une marge présentant des poils sensitifs (flèches rouges) ainsi que des veines longitudinales (flèches blanches), qui sont caractéristiques de l'aile (**D**). **E :** l'allèle *abxpbxbx* provoque un phénotype homéotique léger, consistant en l'apparition de poil ectopiques à la base du capitellum de l'haltere. **F :** combiné à l'allèle *abxpbxbx*, l'ARNi dirigée contre *Ubx* produit une transformation plus sévère de l'haltere en aile. **G :** Vue globale des résultats du crible par interférence ARN en contexte sensibilisé. **En rouge :** 110 candidats n'ont provoqué aucun phénotype, que ce soit dans l'aile ou dans l'haltere. **En cyan :** 23 candidats ont provoqué un phénotype dans l'aile, mais pas dans l'haltere. **En jaune :** 23 candidats ont provoqué un phénotype dans l'haltere même en absence de l'allèle *abxpbxbx*. **En kaki :** 8 candidats ont provoqué un phénotype dans l'haltere dont la sévérité est drastiquement augmentée en présence de l'allèle *abxpbxbx*. **En vert clair :** 23 candidats ont provoqué un phénotype dans l'haltere seulement en présence de l'allèle *abxpbxbx*.

ab	Zinc Finger	mam	Coactivator of Notch
Al	Paired HD	mamo	Zinc Finger
Alh	Zinc Finger/leucine zipper	mbl	RNA processing
apt	SANT-MYB	Max	bHLH
ara	TALE	MED31	Mediator complex
bab2	BTB/POZ	mirr	HD
bi	T-box	mod	RNA binding
brm	Brahma/TrxG	nab	nab co-repressor
brk	repress BMP/Dpp	noe	lncRNA
btd	Zinc Finger	nub	POU HD
cad	HD Hox-like	Oaz	zinc finger
caup	TALE	otp	Paired HD
cbt	Zinc Finger	ovo	zinc finger
cg	PcG recruiter	p53	TF
chinmo	BTB/Zinc finger	pAbp	RNA processing
cic	HMG	pad	Zinc Finger
Clamp	Zinc finger	Pdm2	POU domain 2
Coop	MAD domain	peb	Zinc Finger
CoRest	SANT-MYB	ph-d	PcG
cnc	Leucine Zipper	pnt	ETS Domain
corto	ETP	prg	Zinc Finger
crp	bHLH	psq	PcG
CTCF	Zinc finger/Insulator	ptc	hh pathway
da	bHLH	Ptx1	Paired HD
dac	TF	RbFox1	RNA binding
Dfd	HD (Hox)	retn	ARID
DIP1	dsRNA binding	Rfx	Winged Helix
discro-r	Zinc Finger	row	Zinc Finger
Doc3	T-box	Rpl1215	RNA polIII
Drak	Protein kinase	RYBP	Ubiquitin interacting prot
Dsp1	PcG recruiter/HMG	salm	Zinc Finger
dve	HD	sbb	Zinc Finger
EcR	Nuclear receptor	sc	bHLH
elav	RNA binding	scrt	Zinc Finger
emc	bHLH	Scr	HD
erm	Zinc Finger	Ser	Notch ligand
esc	PcG	sna	Zinc Finger
esg	Zinc Finger	Smox	MAD domain
ey	Paired HD	smt3	SUMO
eyg	Paired HD	Snr1	TrxG
foxo	forkhead box	Sox14	HMG
ftz	HD	sr	Zinc Finger
Gatad	GATA	ss	bHLH
Gsc	Paired HD	Ssdp	Wnt enhanceosome
h	bHLH	tap	bHLH
H2O	NK like HD	toe	Paired HD
HDAC1	nucleosome deacetylase	ttk	Zinc Finger
hb	Zinc Finger	twi	bHLH
HP1b	chromatin regulator	unc-4	Paired HD
Hr83	Zinc Finger	vis	TALE HD
inv	NK like HD	XRP1	AT-Hook/bZip
jumu	fork head	yki	Hippo
klu	Zinc Finger	z	PcG recruiter
Lin29	Zinc Finger	Zif	Zinc Finger
lola	Zinc Finger	zld	Zinc Finger

ac	bHLH
Antp	HD
ash1	Zinc Finger
bs	MADS-Box
Dll	HD
Flacc	Zinc Finger
hh	morphogen ligand
luna	Zinc Finger
Myc	bHLH
Pcl	PcG
ph-p	PcG
pho	PcG
pnr	GATA
pzg	Zinc Finger
senseless	Zinc Finger
shn	Zinc Finger
SmD3	RNA processing
Sox15	HMG
Su(H)	beta-trefoil (Notch)
sv	paired domain
tsh	Zinc Finger
tup	HD (LIM)
vg	paired domain

Adf-1	MADF-BESS	Sd2 M1
ci	Zinc Finger	Si1 T1
Clp	Zinc Finger	Sd1 M1
crc	leu Zipper	Si2
ct	HD	Si1 M1
D	HMG	Si1
D1	TF (AT hook)	Si2
d4	Zinc Finger	Si1C1
disco	Zinc Finger	Si2
Dref	Zinc Finger	Sd1 M1
ds	Cadherin (Hippo)	Si1
E(z)	PcG	M2 Sd1
elB	Zinc Finger	Sd1
grh	TF / PcG recruiter	Sd1 M1
Mad	MAD domain	M2
Mes2	MADF-BESS	Si1
Med	MAD domain	Si1
Myb	SANT-MYB	Si1
Optix	HD	Si1 N1
Pc	PcG	Sd2 M1
pk	LIM	M1
sd	TF (Wg/Hippo)	Sd2 M1
zf30c	Zinc Finger	T2 C1

arm	beta-cat (Wg)	Sd3 T1
Bx	HD (Wg)	Sd1 L C1
grn	GATA	Si3 T3 M2
H	Notch repressor	Si1 M1
hmg-2	HMG	M1
hth	HD	T2 M2 Si2 C2
Ubx	HD	T3 M3 Si3
slou	HD	N1 T1

ap	HD (Wg)	T1 Si1
ash2	Zinc Finger/TrxG	Si1 T1
Asx	TrxG	Si1 T2
crol	Zinc Finger (Wg)	T1
Deaf1	SAND	Sd3
Dr	HD	T1
en	HD	Si2 C1
exd	HD	C2
kn	HLH	T2
lolal	TrxG	Sd1
MEP-1	Zinc Finger	Si2 T2
Mnt	bHLH	M1 Si1
mor	TrxG	T2 Si1
pan	HMG (Wg)	M1 Si1 C1
pdm3	POU domain	M1 Si1
salr	Zinc Finger	M2
spen	RNA maturation	M1 Sd1 T1
tara	TrxG	T2 C1
tna	Brahma	M1 T1
trx	TrxG	M1 T2
Trl	TrxG	M1 Sd1
Utx	TrxG like	Si1
Zfh2	Zinc Finger	L C2

Table 2 : Résultats du crible par interférence ARN. Pour chaque catégorie est donnée le symbole du gène codant pour le candidat, ainsi que la classe de FT à laquelle il appartient, ou une brève description du processus biologique dans lequel il est impliqué. Le code couleur symbolisant les différentes catégories est similaire à celui de la figure précédente. Une colonne supplémentaire fournit une description du phénotype dans l'haltère provoqué par les différents candidats. Les lettres définissent la nature du phénotype provoqué, et le nombre associé signifie l'intensité relative de ce phénotype. **Si** : augmentation de la taille (« size increase »). **Sd** : diminution de la taille (« size decrease »). **M** : défaut morphologique. **T** : présence de poils sensitifs ectopiques (la manifestation la plus probablement associée à une transformation d'haltère en aile). **L** : Disparition (« loss ») d'une partie de l'haltère. **C** : désorganisation des sensilles campaniformes. **N** : nécrose/sclérose.

Le crible fonctionnel en contexte sensibilisé révèle différentes catégories de cofacteurs candidats

La plupart des phénotypes observés en l'absence du contexte sensibilisé par *abxpbx* sont des gains ou des diminutions mineurs de la taille de l'haltère (**Figure 2A**) ou des anomalies morphologiques (**Figure 2B**) ne suggérant pas clairement une modification de l'identité de l'organe. Dans de rares cas cependant on observe l'apparition de quelques poils sensitifs ectopiques, ou encore la désorganisation des sensilles campaniformes, suggérant davantage un léger effet homéotique (**Figure 2C**). Un certain nombre de gènes candidats testés codent pour des protéines membres des groupes Trithorax (TrxG) et Polycomb (PcG), des modificateurs épigénétiques décrits pour être respectivement impliqués dans l'activation et la répression des gènes Hox (Geisler et Paro 2015). D'autres candidats sont à l'interface entre ces deux groupes, appartenant à la catégorie des « enhancer of Trithorax and Polycomb » (ETP), pouvant être impliqués à la fois dans des processus de répression comme d'activation épigénétique (Tsukiyama et al. 1994 ; Hagstrom et al. 1997 ; Mishra et al. 2003 ; Bejarano et Busturia 2004). Les TrxG, PcG et ETP sont indifféremment représentés parmi les candidats n'ayant induit aucun phénotype dans l'haltère. En revanche, seul des PcG provoquent des phénotypes touchant les ailes mais pas les haltères, ou bien touchant les haltères en absence de contexte sensibilisé. C'est notamment le cas de Polycomb (Pc), qui provoque une diminution de la taille de l'haltère (**Figure 2D**) ainsi qu'une diminution et une morphologie plus sphérique de l'aile (**Figure 2E**), ce qui suggère une dé-répression de Ubx. En revanche, seul des TrxG provoquent des phénotypes dans l'haltère observés uniquement en contexte sensibilisé. De plus, ces phénotypes sont très souvent caractérisés par la présence de poils sensitifs ectopiques, suggérant une perte d'activation de Ubx (**Figure 2F**). Tout cela est cohérent avec l'effet dose-dépendent de Ubx lors du développement de l'haltère, et avec l'effet de l'allèle *abxpbx*. La diminution de la dose de Ubx provoquée par le contexte sensibilisé entre théoriquement en synergie avec la perte de fonction des TrxG chargés de l'activation de Ubx, ce qui explique que ces candidats soient plus facilement mis en évidence en contexte sensibilisé. En revanche, la perte de fonction des PcG a théoriquement une action antagoniste par rapport au contexte sensibilisé, ce qui suggère que seul les PcG ayant une influence assez forte sur la régulation de Ubx soient mis en évidence lors de ce crible, en l'absence de l'allèle *abxpbx*. Les régulateurs épigénétiques (TrxG ou PcG) ne provoquant pas

de phénotype ont probablement une influence trop minime sur la régulation de *Ubx* pour que cela soit visible lors de notre crible (**Table 3**). Ce manque de visibilité peut effectivement être dû à la contribution minime ou nulle de ces candidats à la régulation de *Ubx*, mais aussi à l'efficacité trop limitée de l'interférence ARN à médier une perte de fonction suffisante.

D'autres candidats comme *armadillo* (*arm*), un gène codant pour un homologue de la bêta-caténine impliqué dans la voie Wingless, essentielle lors du développement de l'axe dorso-ventral des ailes, présentent un phénotype de diminution de la taille de l'organe en l'absence de contexte sensibilisé (**Figure 2G**), qui se trouve amplifié en contexte sensibilisé (**Figure 2H**). Le contexte sensibilisé permet donc de faciliter le repérage de phénotypes. Enfin, le contexte sensibilisé permet de révéler des phénotypes drastiques, telle que la perte totale d'un segment de l'haltère, le pédicelle, comme par exemple lors de la perte de fonction de *zfh2*, connu pour son rôle lors du développement des parties proximales de l'aile (**Figure 2I**). Ce phénotype n'est jamais observé hors du contexte sensibilisé. Une liste des candidats ayant provoqué les phénotypes les plus prometteurs est fournie (**Table supplémentaire 2**).

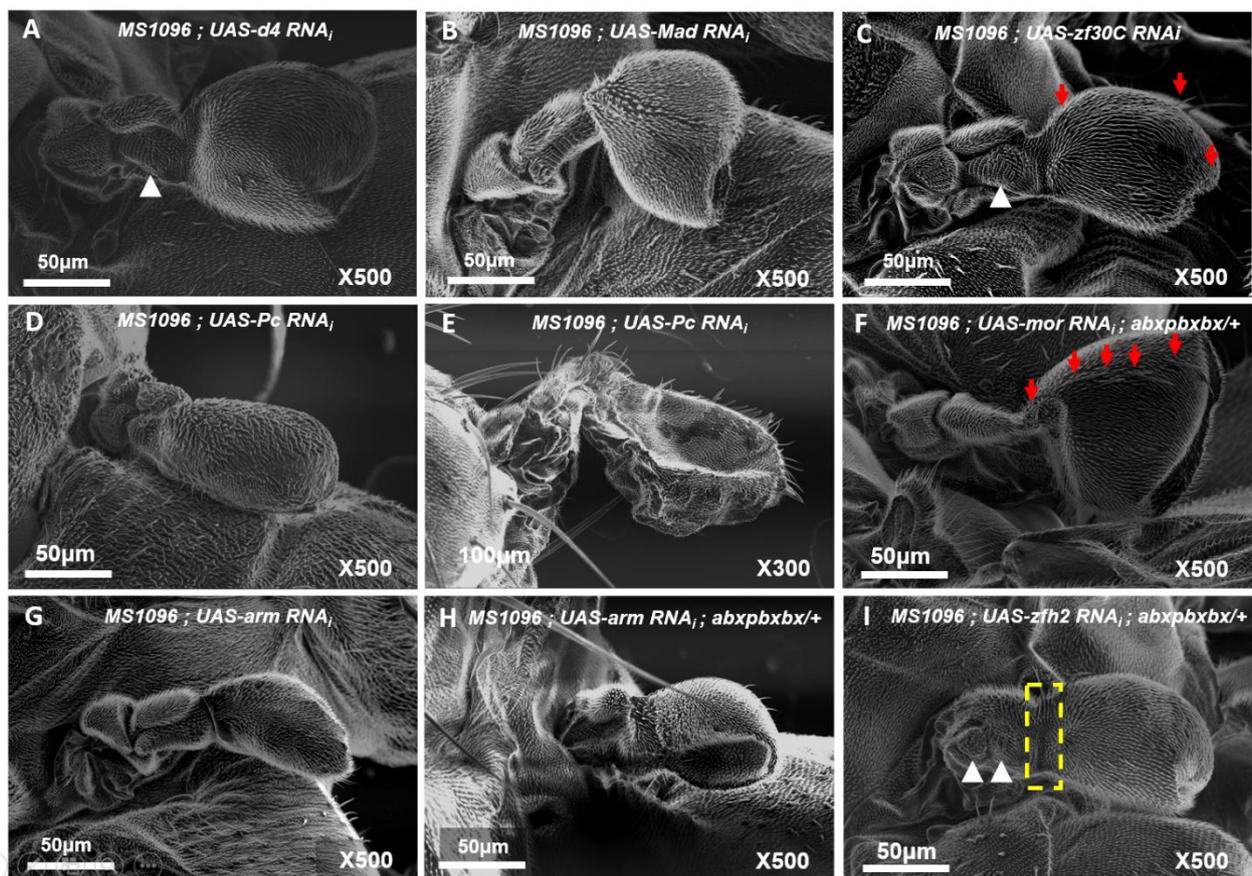


Figure 2 : Illustration des différents types de candidats révélés par le crible fonctionnel. **A** : l'ARN_i dirigée contre *d4* provoque une augmentation de la taille du capitellum, ainsi qu'une désorganisation des sensilles campaniformes du pedicellus (pointe de flèche blanche). **B** : l'ARN_i dirigée contre *Mad* provoque une déformation caractérisée par une excroissance au niveau du capitellum. **C** : l'ARN_i dirigée contre *zf30C* provoque l'apparition de poils sensitifs ectopiques au niveau du capitellum ainsi qu'une désorganisation des sensilles campaniformes du pedicellus. **D** : l'ARN_i dirigée

contre *Pc* provoque une diminution de la taille de l'haltère ainsi que le développement d'un capitellum plus fin. **E** : l'ARN_i dirigée contre *Pc* provoque également une diminution de la taille de l'aile, ainsi qu'une morphologie plus sphérique, suggérant une transformation partielle de l'aile en haltère. **F** : l'ARN_i dirigée contre *mor* provoque une augmentation de la taille du capitellum, ainsi que l'apparition de poils sensitifs ectopiques disposés de manière alignée (ce qui rappelle leur organisation au niveau de la marge de l'aile). **G** : l'ARN_i dirigée contre *arm* provoque une diminution globale de la taille de l'haltère. **H** : combiné à l'allèle *abxpbbx*, l'ARN_i dirigée contre *arm* provoque une diminution encore plus drastique de la taille de l'haltère. **I** : combinée à l'allèle *abxpbbx*, l'ARN_i dirigée contre *zfh2* provoque une désorganisation des sensilles campaniformes des parties proximales de l'haltère, mais aussi la disparition de l'organisation en 3 parties de l'haltère. La présence de deux champs de sensilles campaniformes suggère que cela résulte probablement de la fusion du scabellum et du pedicellus, ou bien de la perte d'une de ces deux parties sans impacter la spécification de la présence de deux champs distincts de sensilles campaniformes le long de l'axe proximo-distal.

brm	Brahma/TrxG	Pcl	PcG	E(z)	PcG	M2 Sd1	Asx	TrxG/ETP	Si1 T3
cg	PcG recruter	ph-p	PcG	grh	PcG recruter	Sd1 M1	ash2	TrxG	Si1 T1
corto	ETP	pho	PcG	Pc	PcG	Sd2 M1	lolal	TrxG	Sd1
Dsp1	PcG recruter						mor	TrxG	T2 Si1
esc	PcG						tara	TrxG	T2
ph-d	PcG						tna	Brahma	M1 T1
psq	PcG						trx	TrxG	M1 T2
RYBP	ETP						Trl	TrxG/ETP	M1 Sd1
Snr1	TrxG						Utx	TrxG like	Si1
z	PcG recruter								

Table 3 : Résultat du crible RNAi focalisé sur les régulateurs épigénétiques. En rouge : candidats impliqués dans la répression (PcG), l'activation (TrxG/Brahma) ou à l'interface entre ces deux phénomènes (« enhancer of TrxG and PcG » ou « ETP ») ne provoquant aucun phénotype notable dans les ailes et les haltères. En cyan : seul des PcG provoquent des phénotypes touchant l'aile mais pas l'haltère. En jaune : seul des PcG provoquent des phénotypes en absence de contexte sensibilisé. En vert : seul des TrxG, Brahma et des ETP provoquent des phénotypes uniquement observables en contexte sensibilisé.

Homothorax (Hth) présente un rôle ambivalent de régulateur et de cofacteurs de Ubx

Notre crible fait ressortir l'importance de deux cofacteurs déjà connus des protéines Hox, les protéines à homéodomaine de la famille TALE que sont Homothorax (Hth) et Extradenticle (Exd), des homologues des protéines MEIS et PBC (Merabet et Galliot 2015). Les protéines MEIS, PBC et HOX sont connues pour former des complexes multi-protéiques de manière extrêmement variable, ce qui peut contribuer à moduler la spécificité de liaison à l'ADN des protéines HOX *in vivo* (Dard et al. 2019). La perte de fonction de *Hth* en absence de l'allèle *abxpbbx* provoque un phénotype de transformation de l'haltère en aile restreint à la zone dorso-proximale du capitellum (**Figure 3A**). Ce phénotype correspond exactement à celui obtenu dans le contexte similaire d'interférence ARN de *Hth* dirigée par *MS1096-Gal4* par Agrawal et al. en 2011. Cependant, en contexte sensibilisé, on observe que le phénotype de transformation s'étend à l'intégralité du capitellum, suggérant la nécessité de Hth dans le maintien de l'identité « haltère » même au niveau des zones les plus distales de l'organe

(**Figure 3B**). La perte de fonction de *Exd* ne provoque pas de phénotype anormal notable de l'haltère en absence de l'allèle *abxpbxbx* (**Figure 3C**). En revanche, en contexte sensibilisé, on observe une désorganisation des champs de sensilles campaniformes (**Figure 3D**). Nos efforts se sont focalisés sur Hth du fait de l'intensité respective de ces phénotypes, ainsi que du rôle déjà décrit de Hth lors du développement de l'haltère (Agrawal et al. 2011). Afin de savoir si Hth et Ubx pouvaient physiquement interagir, nous avons procédé à un immunomarquage contre les deux protéines dans le disque imaginal d'haltère sauvage de stade L3 (**Figure 3E**). On observe alors que les territoires occupés par Ubx et Hth sont plutôt complémentaires. La dose de Ubx est inégalement répartie le long de l'axe proximo-distal du primordium d'haltère. On observe une forte dose de Ubx au niveau du pouch, et une dose plus faible de Ubx au niveau du reste du disque imaginal, qui donneront les portions plus proximales de l'haltère et du thorax. Hth est présent au niveau du territoire présomptif de la zone proximo-dorsale du capitellum, mais semble absent du reste du pouch. Hth est présent dans l'ensemble des autres territoires du disque imaginal d'haltère, notamment au niveau de deux cercles concentriques circonscrivant le pouch où une dose plus forte de Hth est observable. Cela est cohérent avec le rôle décrit de Hth dans la régulation de la dose de Ubx le long de l'axe proximo-distal du disque imaginal d'haltère (Delker et al. 2019). Hth est décrit comme aidant *Ubx* à maintenir son propre niveau d'activation modéré à l'extérieur du pouch. Cela est cohérent avec ce qui est observé lors de la perte de fonction de Hth par ARNi (**Figure 3F**). *MS1096-Gal4* médie la perte de Hth au niveau de la zone dorsale du pouch et de sa périphérie, ce qui permet alors l'apparition d'une forte dose de Ubx. Cette zone du disque imaginal est la zone présomptive de la partie dorso-proximale du capitellum, où l'on observe l'apparition de poils sensitifs ectopiques traduisant alors une transformation de l'haltère en aile. Cela semble contradictoire avec l'augmentation de la dose de Ubx. Cette observation suggère que malgré la dé-répression de *Ubx*, l'identité du tissu tend vers celle de l'aile. Même à forte dose, Ubx nécessiterait donc ici la présence de Hth pour spécifier le développement correct de l'haltère. Le gain de fonction de Hth au niveau du pouch de l'haltère en utilisant *MS1096=4* pour activer UAS-Hth provoque bien une réduction de la dose de Ubx, similaire à celle observée dans les zones périphériques du disque imaginal (**Figure 3 G**). Cependant, le phénotype que cela induit est encore une fois incohérent avec une simple perte de Ubx, qui devrait se traduire par une transformation du capitellum en aile par une augmentation de la taille, un aplatissement et l'apparition de poils sensitifs ectopiques. On observe au contraire une réduction de la taille de l'haltère. Cela correspond au phénotype que l'on pourrait attendre de l'augmentation de la dose de Ubx, que ce soit directement ou via la perte de fonction d'un répresseur de Ubx comme Pc (voir **figure 2D**). Si au stade L3 Ubx et Hth sont peu colocalisés dans le pouch, donnant les parties les plus distales de l'haltère au cours de la métamorphose, les domaines occupés par ces deux protéines sont davantage chevauchants au stade L2, suggérant que le profil dynamique de l'expression de Ubx et Hth au cours du développement pourrait expliquer l'influence de Hth au niveau des parties distales de l'haltère malgré l'apparente absence de cette protéine dans le pouch du disque imaginal aux stades plus tardifs (**Figure supplémentaire 2B**). Nos résultats confirment donc le rôle de Hth dans la répression de Ubx le long de l'axe proximo-distal au

cours du disque imaginal d'haltère, mais suggère également un rôle de cofacteur nécessaire à Ubx pour correctement orchestrer le développement de l'haltère.

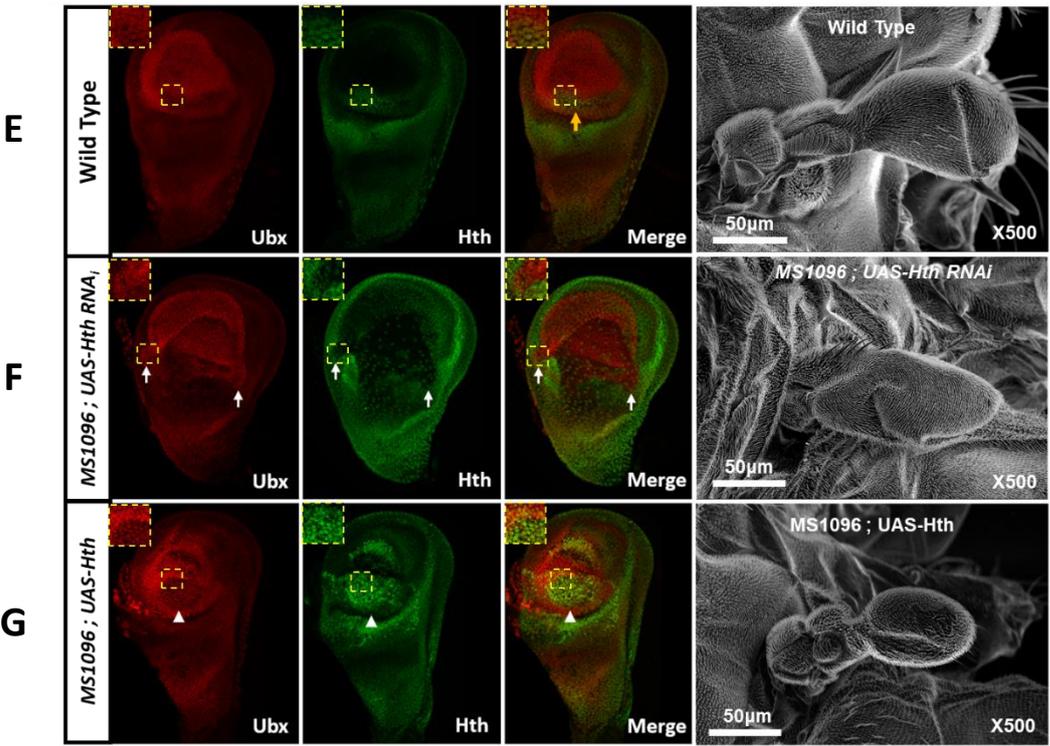
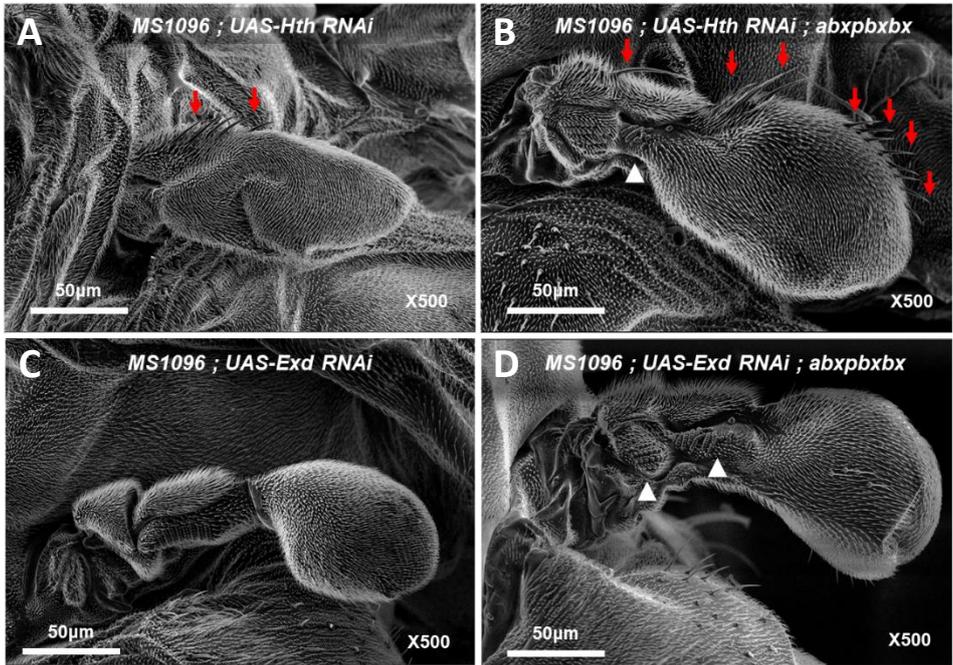


Figure 3 : Rôle de Homothorax dans lors du développement de l'haltère. **A** : La perte de fonction de *Hth* en l'absence de l'allèle *abxpbxbx* provoque l'apparition de poils ectopiques au niveau proximo-dorsal du capitellum (flèche rouge). La zone proximale du capitellum semble également être déformée. **B** : En contexte sensibilisé, l'ARN_i dirigé contre *Hth* provoque un phénotype sévère de transformation de l'haltère en aile, caractérisé par la présence de poils sensitifs ectopiques sur toute la longueur de l'haltère, dessinant une marge rappelant celle observée sur l'aile. L'haltère est également plus grand et de forme plus plate. On observe une désorganisation des sensilles campaniformes. **C** : La perte de fonction de *Exd* par ARN_i ne provoque aucun défaut notable au niveau de l'haltère en dehors du contexte sensibilisé. **D** : combiné à *abxpbxbx*, la perte de fonction de *Exd* provoque une désorganisation des sensilles campaniformes. **E** : Immunomarquage de *Ubx* (en rouge) et *Hth* (en vert) dans le disque imaginal d'haltère sauvage. *Ubx* et *Hth* sont très peu colocalisés au niveau du pouch, à l'exception du territoire présomptif de la partie proximo-dorsale du capitellum (flèche jaune). **F** : La perte de fonction de *Hth* par ARN_i à l'aide de *MS1096-Gal4* provoque la dé-répression de *Ubx* au niveau du territoire présomptif de la zone proximo-dorsale de l'haltère (flèches blanches). Les points verts au niveau du pouch correspondent aux noyaux de cellules de la membrane péripodiale entourant le disque imaginal, et ne contribuant pas directement au développement de l'haltère. **G** : le gain de fonction de *Hth* au niveau du pouch provoque une diminution de la dose de *Ubx*. Cela se traduit par le développement d'un haltère plus petit.

Un nouveau cofacteur candidat de *Ubx* : Grain (*Grn*)

Un autre candidat a provoqué un phénotype particulièrement intéressant. Il s'agit de Grain (*Grn*), un facteur de transcription GATA connu pour son implication dans le développement des pattes et de motoneurones chez la drosophile (Brown et Hombria 2000 ; Garces et Thor 2006). En dehors du contexte sensibilisé, sa perte de fonction par interférence ARN provoque une légère augmentation de la taille de l'haltère, accompagnée parfois de la présence de quelques poils sensitifs ectopiques (**Figure 4A et B**). Cependant, combinée à l'allèle *abxpbxbx*, la perte de fonction de *grn* provoque le phénotype de transformation de l'haltère en aile le plus sévère observé lors de ce crible, derrière la perte de fonction de *Ubx* lui-même, avec une pénétrance de 4,9 % (**Figure 4C**). Nous avons donc procédé à un immunomarquage de *Grn* et *Ubx* afin de déterminer dans quelles conditions ces deux protéines pourraient interagir au sein du disque imaginal d'haltère. *Grn* se localise principalement au niveau de deux bandes de cellules, celles de la zone présomptive de la partie dorsale du capitellum ainsi que celles de régions plus proximales (**Figure 4D**). La perte de fonction de *grn* par ARN_i en employant *MS1096-Gal4*, une fois combinée à l'allèle *abxpbxbx*, provoque la perte de la présence de *Grn* au niveau de la bande de cellules de la zone dorsale du pouch, ce qui provoque la transformation de l'haltère en aile (**Figure 4E**). À l'inverse, le gain de fonction de *grn* dans le pouch du disque imaginal d'haltère ne semble pas affecter le profil d'expression de *Ubx* mais provoque une diminution drastique de la taille du capitellum, suggérant une augmentation de l'activité de *Ubx*. *Grn* pourrait donc contribuer à augmenter l'influence de la régulation de *Ubx* sur le programme moléculaire de développement de l'haltère (**Figure 3F**). Cependant, si tout cela suggère bien un rôle de *Grn* lors du développement de l'haltère, et un rôle de cofacteur de *Ubx*, colocalisation entre *Ubx* et *Grn* au niveau du pouch de l'haltère, même aux stades plus précoces du développement, reste difficile à mettre en évidence (**Figure supplémentaire 2B**).

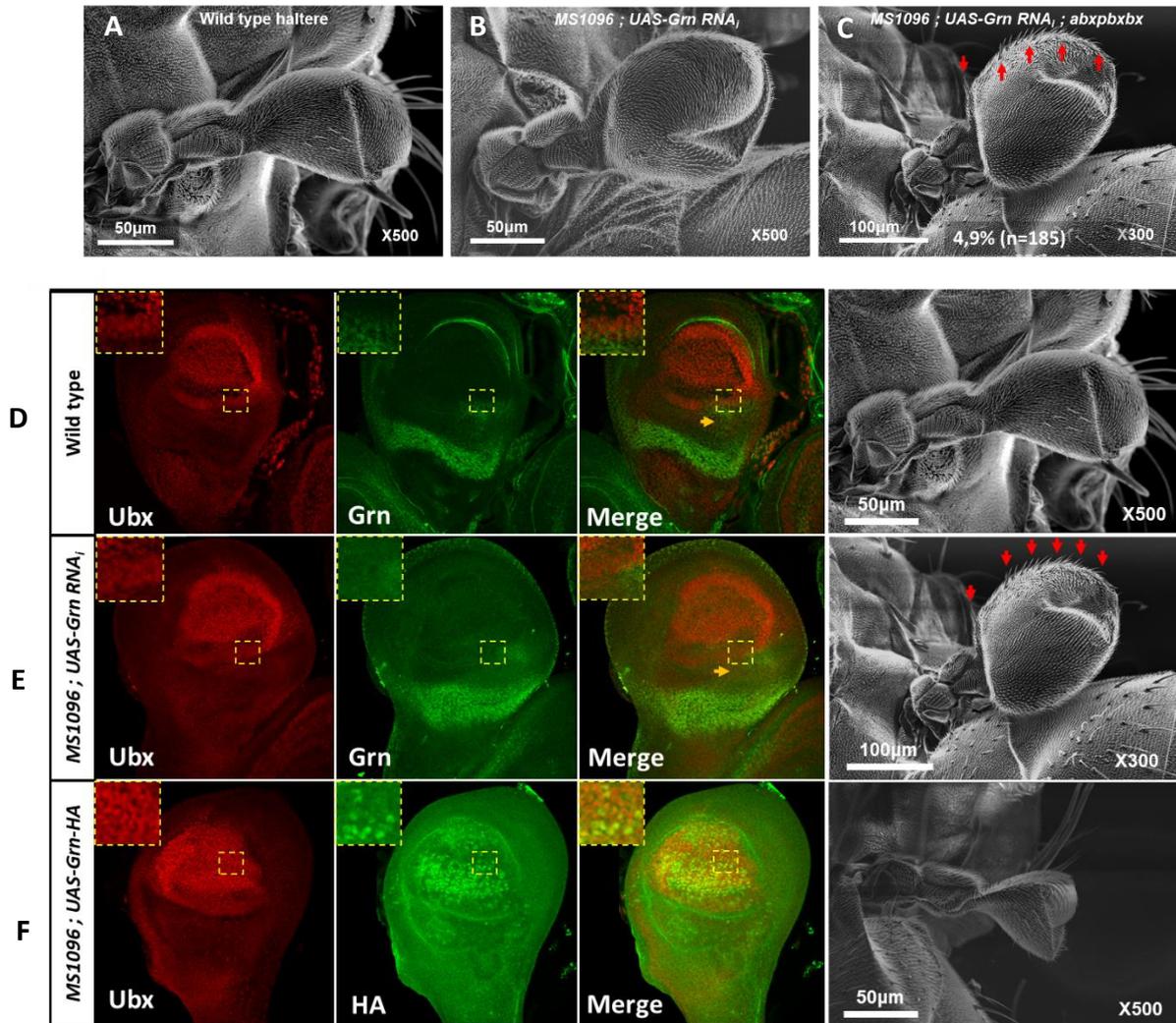


Figure 4 : Rôle de Grain lors du développement de l'haltère. A : Haltère sauvage. **B :** La perte de fonction de *grn* par ARN_i provoque une augmentation sensible de la taille de l'haltère. **C :** combiné à l'allèle *abxpbx*, la perte de fonction de *grn* provoque une transformation sévère de l'haltère en aile, caractérisée par un important gain de taille, la présence de nombreux poils sensitifs ectopiques formant une marge similaire à celle observée sur l'aile (flèches rouges) avec une pénétrance de 4,9 %. **D :** *Grn* est présent au niveau de deux bandes de cellules, respectivement au niveau du territoire présomptif de la partie proximo-dorsale de l'haltère, et de parties plus proximales de l'haltère (têtes de flèches jaunes). **E :** l'ARN_i dirigée contre *grn* médiée par *MS1096-Gal4* provoque la perte de la bande la plus distale de cellules exprimant *grn* (flèche jaune). **F :** Le gain de fonction de *grn* au niveau du pouch de l'haltère provoque une réduction sévère du capitellum de l'haltère. **G :** Les domaines occupés par *Grn* et *Ubx* dans le disque d'haltère sont très peu chevauchants, même au stade L2.

Figures supplémentaires

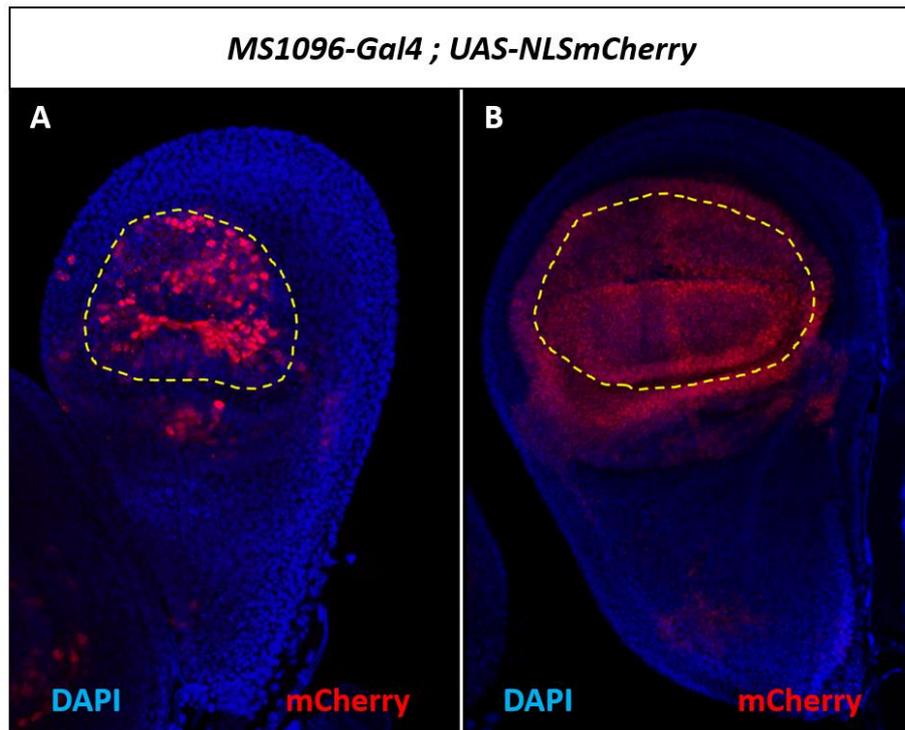


Figure supplémentaire 1 : profil d'expression de *MS1096-Gal4*. **A** : *MS1096-Gal4* dirige l'expression de transgènes sous le contrôle de séquences UAS au niveau du pouch du disque d'haltère, ainsi que dans les parties dorsales de territoires présomptifs de régions plus proximales de l'haltère. **B** : *MS1096-Gal4* présente une activité très similaire dans le disque imaginal d'aile.

arm	beta-cat (Wg)	Sd3 T1
Bx	HD (Wg)	Sd1 L C1
ci	Zinc Finger	Si1 T1
Deaf1	SAND	Sd3
en	HD	Si2 C1
grn	GATA	Si3 T3 M2
hth	HD	T2 M2 Si2 C2
kn	HLH	T2
MEP-1	Zinc Finger	Si2 T2
pan	HMG (Wg)	M1 Si1 C1
sd	TF (Wg/Hippo)	Sd2 M1
spen	RNA maturation	M1 Sd1 T1
Zfh2	Zinc Finger	L C2

Table supplémentaire 2 : Liste des cofacteurs candidats les plus intéressants. Cette liste exclut les régulateurs épigénétiques et comprend les candidats dont la perte de fonction provoque les phénotypes les plus sévères, mais aussi les candidats provoquant des phénotypes modérés mais décrits pour jouer un rôle important lors du développement de l'aile, tels que *ci* et *en*, impliqués dans le développement de l'axe antéro-postérieur de l'aile, ou encore *kn* essentiel à la formation des veines de l'aile. Il est aussi intéressant de noter que *Spen* a récemment été identifié comme un interacteur de *Ubx* dans le mésoderme embryonnaire (Carnesecchi et al. 2020).

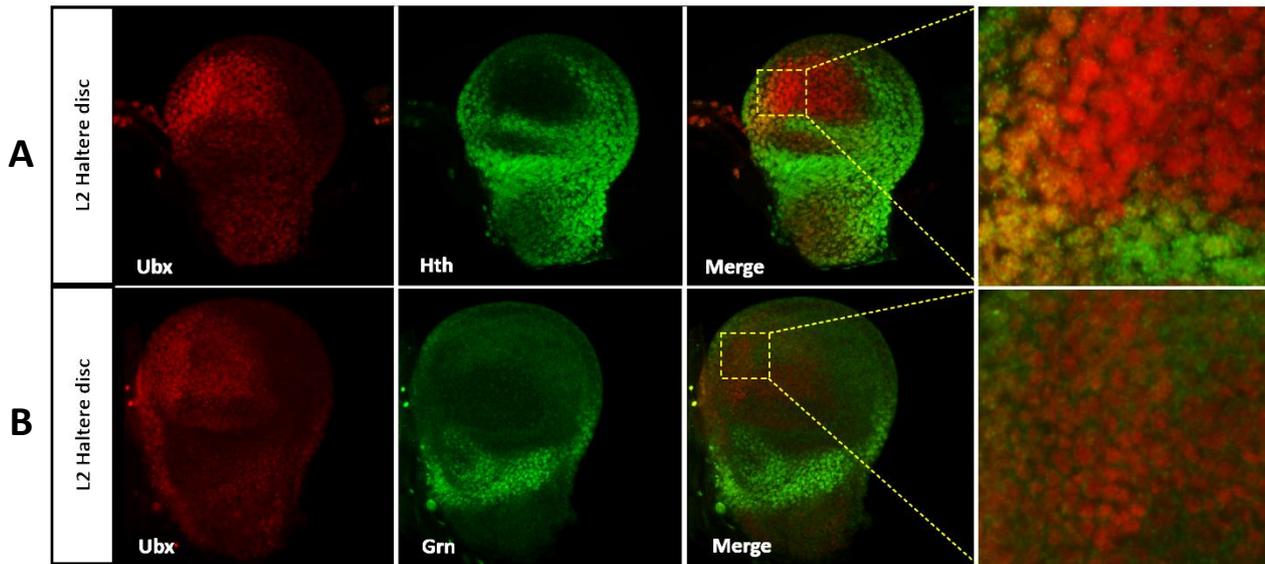


Figure supplémentaire 2 : Immunomarquage de Ubx et Hth ou Grn dans le disque imaginal d'haltere de second stade larvaire. A : Les territoires où l'on trouve Ubx et Homothorax sont analogues à ceux observés aux stades plus tardifs. Hth colocalise avec Ubx au niveau du territoire où Ubx est le plus concentré, présumptif des parties distales de l'haltere (voir le zoom) **B :** Les territoires où l'on trouve Ubx et Grain sont analogues à ceux observés aux stades plus tardifs. On observe très peu de chevauchement entre ceux-ci. Un faible marquage de Grn est cependant observable au niveau d'une zone présentant un fort marquage de Ubx (voir le zoom).

Chapitre III : Discussion et perspectives

1. Identification de cofacteurs candidats de Ubx pour le développement correct de l'haltère

1.1 Un crible en contexte génétique sensibilisé

Les gènes Hox fascinent les biologistes depuis des décennies par les spectaculaires effets que peuvent provoquer leurs mutations, illustrant bien leurs fonctions essentielles au cours du développement chez les animaux bilatériens et les cnidaires (He et al. 2018). Chez les bilatériens, les protéines Hox agissent de manière spécifique afin de spécifier l'identité des différents segments le long de l'axe AP. Cependant, les différentes protéines Hox présentent une forte affinité pour des séquences nucléotidiques très similaires *in vitro*. Cette observation est paradoxale en regard de leur grande spécificité de liaison avec le génome observée *in vivo* (Sánchez-Higueras et al. 2019). L'une des hypothèses permettant d'expliquer ce paradoxe repose sur l'interaction entre les protéines Hox et d'autres protéines, permettant de former des complexes multi-protéiques capables de reconnaître des motifs nucléotidiques plus complexes de manière spécifique. Cependant, le peu de cofacteurs bien décrits pour collaborer avec les protéines Hox sont des cofacteurs génériques interagissant avec toutes les protéines Hox et présents de manière ubiquitaire. L'implication de cofacteurs spécifiques pour moduler l'activité des protéines Hox de manière contexte-spécifique est donc très peu documentée. Cela souligne la nécessité d'identifier de tels partenaires des protéines Hox dans un contexte développemental *in vivo*.

Le développement de l'haltère chez la drosophile est un contexte développemental bien décrit impliquant la fonction spécifique de la protéine Hox Ubx (Weatherbee et al. 1998). C'est donc dans ce contexte développemental particulier que nous avons choisi de rechercher des partenaires nécessaires à Ubx pour médier sa fonction spécifique d'orchestration du développement d'un organe. Pour cela, nous avons mis en place une approche de crible fonctionnel dans l'haltère par interférence ARN (RNAi) afin d'identifier des cofacteurs potentiellement nécessaires à l'activité de Ubx pour le développement de l'haltère. Nous avons décidé d'utiliser le système UAS-Gal4 afin de diriger la perte d'expression d'une liste de gènes candidats dans le primordium d'haltère. Notre système Gal4 repose sur l'utilisation de *MS1096-Gal4*, induisant également l'expression de transgènes dans les primordia d'ailes. Le développement de l'haltère est en soi assez peu décrit, considéré comme une modification par Ubx du programme développemental de l'aile qui est, lui, extrêmement bien décrit. De plus, l'expression ectopique de Ubx au sein des primordia d'ailes suffit à transformer les ailes en haltères, ce qui suggère que les cofacteurs nécessaires à Ubx pour spécifier le développement de l'haltère sont présents dans les primordia d'ailes (Pavlopoulos et Akam 2011). Nous avons donc choisi les gènes candidats à tester sur la base de données de la littérature du développement de l'aile, ainsi que sur les gènes décrits comme pouvant induire

des défauts de développement de l'haltère en cas de mutation. Il est cependant rapidement apparu que révéler des anomalies dues à la perte de fonction par RNA_i d'un candidat était difficile, à la fois du fait de l'étonnante stabilité du programme développemental de l'haltère, mais aussi de la petite taille de l'organe rendant difficile l'observation à la loupe binoculaire de défauts développementaux subtils. Nous avons donc combiné la perte de fonction par RNA_i à un contexte génétique sensibilisé, en utilisant un allèle hypomorphe de *Ubx*, l'allèle *abxpbxbx*. En effet, la stabilité du programme développemental de l'haltère étant directement lié à la dose de *Ubx* (voir l'article Paul et al.) nous avons fait l'hypothèse qu'une diminution de 40% de ce niveau pouvait sensibiliser le contexte et donc permettre de révéler plus facilement le rôle de partenaires transcriptionnels. En accord avec nos observations (Paul et al.) l'allèle *abxpbxbx* provoque un léger phénotype de transformation de l'haltère en aile, avec l'apparition sporadique de rares poils sensitifs ectopiques. Ce phénotype permet de révéler potentiellement des phénotypes plus sévères de malformation et/ou transformation, et est donc compatible avec le crible par RNA_i envisagé.

Un total de 187 gènes candidats ont été testé par RNA_i dans ce contexte sensibilisé. 74 candidats ont provoqué un défaut de développement des ailes lors de leur perte de fonction. On observe une anomalie du développement de l'haltère après la perte de fonction de 54 candidats. Cependant, on observe un défaut de formation de l'haltère indépendant du contexte sensibilisé seulement pour 23 de ces candidats. On constate un défaut dont la sévérité augmente en contexte sensibilisé pour 8 candidats, tandis que la perte de fonction de 23 candidats ne provoque un phénotype anormal qu'en contexte sensibilisé. Cela souligne l'intérêt d'effectuer un crible fonctionnel en contexte sensibilisé (Bach et al. 2003 ; Matera et al. 2008). Ce crible a permis d'identifier comme cofacteurs potentiels de *Ubx* des partenaires connus des protéines *Hox*, tels que *Hth* et *Exd*, mais aussi *Deaf1* ou encore *Engrailed*, décrit pour interagir avec les protéines *Hox* dans d'autres contextes (Gross et McGinnis 1996 ; Gebelein et al. 2004). Cependant des candidats encore peu étudiés dans le contexte du développement des appendices de vol ou en tant que cofacteurs de protéines *Hox* ressortent aussi de ce crible, tels que *Grn*.

L'approche de perte de fonction par interférence ARN présente des biais intrinsèques, tels que la possibilité de la perte de fonction collatérale d'un autre gène cible de manière aspécifique (« off-target »), provoquant des faux positifs (Dietzl et al. 2007) L'utilisation du contexte sensibilisé compense probablement en partie le fait que la perte de fonction des gènes cibles médiés par RNA_i soit partielle ou puisse être compensée par d'autres gènes (Miklos et Rubin 1996). Cependant, des faux-négatifs dus à ces phénomènes restent possibles. De plus, différentes lignées de drosophiles pour un même RNA_i peuvent être utilisée, et leurs efficacité respective semble extrêmement variable. Cela peut provenir de la variabilité du site d'insertion des transgènes codant pour les ARN interférant, ou de la séquence de ceux-ci, pouvant cibler des portions différentes de l'ARNm contre lesquels ils sont dirigés, ou encore du fond génétique de chaque lignée. La comparaison des résultats obtenu dans les ailes lors de notre crible avec ceux obtenus lors du crible de Schertel et al. (2015) illustre bien cette

variabilité. Schertel et al. ont en effet procédé à un crible fonctionnel par perte et gain de fonction dans les ailes de drosophile à l'aide de *MS1096-Gal4*. Les deux cribles ont testé par interférence ARN 58 gènes cibles en commun. Cependant, alors que notre crible utilise les lignées TRiP (Dietzl et al. 2007), Schertel et al. ont choisi d'utiliser les lignées KK. Cela explique probablement en grande partie pourquoi sur ces 58 candidats en commun, seul 32 (55%) sont cohérents (présentant un phénotype sauvage ou anormal lors des deux cribles) (**Table 1**). Les expériences de gain de fonction ne permettent pas nécessairement de confirmer les résultats obtenus lors d'expériences de perte de fonction. Schertel et al. ont également eu massivement recours au gain de fonction lors de leur crible dans l'aile de drosophile. Cependant, ils ont observé que les résultats obtenus lors de la perte et du gain de fonction d'un même candidat n'étaient pas corrélés. Ils ont observé qu'environ la moitié des candidats provoquant un phénotype anormal en cas de perte de fonction provoquaient également un phénotype anormal en cas de gain de fonction, et inversement. En revanche, le fait que *MS1096-Gal4* induise l'expression de transgènes de manière très similaire dans les primordia d'ailes et d'haltères, et le fait que ces deux organes soient des homologues en série (dont le développement découle de la modification d'un programme développemental ancestral partagé par deux segments répétés) suggère que nous pouvons comparer les effets de la perte de fonction des différents candidats entre l'aile et l'haltère, et conclure quant à la robustesse relative du programme développemental de ces deux organes. En effet, en dehors du contexte sensibilisé, seul 23 candidats provoquent un phénotype de développement anormal de l'haltère notable. La plupart des 54 candidats dont la perte de fonction provoque un défaut de développement de l'haltère quel que soit le contexte génétique provoquent également un défaut de développement de l'aile. Les rares exceptions à cela sont *grn*, *crol* et *Ubx*. Cela porte le nombre de candidats dont la perte de fonction provoque un phénotype anormal de l'aile à 74. Le développement de l'haltère semble présenter une plus grande stabilité que celui des ailes. Le fait que la perte de fonction d'un même candidat induise un défaut de développement des ailes, mais pas de l'haltère, suggère soit que le candidat n'est nécessaire que lors du développement de l'aile, soit que la perte de fonction de ce candidat médiée par l'interférence ARN est suffisante pour déstabiliser le développement de l'aile, mais pas celui de l'haltère. Cela pourrait être dû à la forte dose de *Ubx* présente dans le primordium d'haltère, permettant un contrôle robuste du niveau d'activité de ses gènes cibles et de l'identité de l'organe, tandis que la dose de protéine Hox dans le primordium d'aile est bien plus faible. Une autre explication complémentaire pourrait résider dans la difficulté à observer les phénotypes anormaux au niveau d'un organe aussi petit que l'haltère, et ce même en contexte sensibilisé. Des défauts minimes, notamment ceux touchant l'organisation des sensilles campaniformes, sont difficiles à observer à la loupe binoculaire. Le constat du fait qu'il est très difficile de provoquer un phénotype anormal sévère de l'haltère à part en affectant *Ubx* suggère que de nombreux partenaires aux rôles subtils et potentiellement redondants permettent à *Ubx* d'orchestrer le développement de cet organe.

ab	red	blue
ac	green	
Adf-1	green	+
Al	red	+
Alh	red	
Antp	green	yellow
ap	green	++
apt	red	++
ara	red	+
arm	green	
ash1	green	
ash2	green	
Asx	green	
bab2	red	
bi	red	blue
brm	red	
brk	red	+
bs	green	yellow
btd	red	
Bx	red	
cad	red	
caup	red	blue
cbt	red	
cg	red	
chinmo	red	
ci	green	
cic	red	+/++
Clamp	red	
Clp	green	
Coop	red	
CoRest	red	
cnc	red	blue
corto	red	
CTCF	red	
crc	green	
crol	green	
crp	green	
ct	red	
D	green	no/+
D1	green	
d4	green	yellow
da	red	
dac	red	
Deaf1	green	
Dfd	red	
DIP1	red	
disco	green	
discro-r	red	
Dll	green	++
Doc3	red	+++/+
Dref	green	++
Drak	red	
Dr	green	+
ds	green	
Dsp1	red	
dve	red	
E(z)	green	
EcR	red	+
elav	red	
elB	green	
emc	red	+
en	green	+
erm	red	
esc	red	
esg	red	+
exd	green	
ey	red	+/no
eyg	green	
Flacc	green	
foxo	red	+/++
ftz	red	
Gatad	red	
grh	green	+++
grn	green	
Gsc	green	
H	green	
h	red	
H2O	red	
HDAC1	red	
hb	red	blue
hh	green	
hmg-2	green	yellow
HP1b	red	
Hr83	red	
hth	green	+
inv	red	
klu	red	
kn	green	yellow
kn	green	yellow
jumu	red	blue
Lin29	red	blue
lola	red	blue
lolal	green	
luna	green	++
Mad	green	++
mam	red	
mamo	red	
Max	red	
mbl	red	
Med	green	++
MED31	red	
Mes2	green	
MEP-1	green	
mirr	red	
Mnt	green	
mod	red	
mor	green	+++/**
Myb	green	+
Myc	green	
nab	red	
noe	red	
nub	red	+
Oaz	red	
Optix	green	+
otp	red	
ovo	red	+
p53	red	blue
pAbp	red	
pad	red	
pan	green	yellow
Pc	green	
Pcl	green	
Pdm2	green	yellow
pdm3	red	
peb	red	
ph-d	red	
pho	green	yellow
ph-p	green	
pk	green	
pnr	green	
pnt	red	
prg	red	
psq	red	
ptc	red	
Ptx1	red	
pzg	green	
RbFox1	red	
retn	red	
Rfx	red	
row	red	
Rpl121	red	
RYBP	red	
salm	red	+
salr	green	++/lethal
sbb	red	
sens	green	++
sc	red	blue
Scr	red	
scrt	red	
sd	green	+++
Ser	red	
shn	green	yellow
slou	green	
Smd3	green	
Smox	red	blue
smt3	red	
sna	red	
Snr1	red	
Sox14	red	
Sox15	green	+
spen	green	
sr	red	
ss	red	
Ssdp	red	
Su(H)	green	
sv	green	++
tap	red	
tara	green	
tna	red	
toe	red	+
trx	green	
tsh	green	
ttk	red	
tup	green	
Trl	green	blue
twi	red	
Ubx	red	
unc-4	red	+
Utx	red	
vis	red	no/+
vg	green	
XRP1	red	
yki	red	
z	red	++/+
Zfh2	green	+
Zif	red	+++/lethal
zf30c	green	blue
zld	red	

Table 1 : comparaison des phénotypes obtenus dans l'aile entre ce crible par interférence ARN et celui de Schertel et al. 2015. En rouge : les candidats n'ayant pas provoqué de phénotype anormal dans l'aile. **En vert :** les candidats ayant provoqué un phénotype anormal dans l'aile. **En bleu :** les candidats ayant donné un résultat similaire (phénotype normal/anormal) dans les deux cribles. **En jaune :** les candidats ayant provoqué des résultats différents entre les deux cribles.

1.2 Le crible fonctionnel a révélé un certain nombre de régulateurs épigénétiques, confirmant l'importance d'une régulation fine du niveau d'expression de *Ubx* pour la formation correcte des haltères

Parmi les candidats testés, on trouve de nombreux régulateurs épigénétiques comme les PcG (impliqués dans des processus de répression), des TrxG (impliqués dans l'activation transcriptionnelle) et des « enhancer of TrxG and PcG » (ETP) capables de fonctionner avec les protéines de l'un ou l'autre des deux autres groupes selon le contexte biologique (Fisher et al. 2010 ; Kuroda et al. 2020). Ces protéines sont connues pour réguler l'expression des gènes Hox (Schuettengruber et al. 2017). Cette fonction est cohérente avec l'observation que les PcG provoquant des phénotypes dans l'haltère en cas de perte de fonction le font systématiquement indépendamment du contexte sensibilisé, tandis que les TrxG ne le font qu'en contexte sensibilisé. En effet, la diminution de la dose de *Ubx* induite par *abxpbx* agit à l'encontre de la perte d'un répresseur de *Ubx*, tandis que la perte d'un activateur de *Ubx* aura un effet plus visible si la dose de *Ubx* est déjà réduite. Notre crible a donc permis de mettre en évidence des régulateurs potentiels de *Ubx* lors du développement de l'haltère. Si de tels régulateurs peuvent aussi théoriquement constituer des cofacteurs pouvant permettre à *Ubx* d'induire la répression ou l'activation de gènes cibles, il est probablement difficile de séparer les effets épistatiques qu'ils auraient sur *Ubx* des effets dus à la collaboration comme cofacteur potentiel de *Ubx*. Notre attention s'est donc plutôt portée sur des candidats pouvant affecter la fonction de *Ubx* indépendamment d'un rôle additionnel de régulateur en amont.

1.3 *Trl* et *Lolal* : à la frontière entre régulateur en amont et cofacteurs

Les pertes de fonction par RNAi de *Trl* et *lolal* provoquent des phénotypes légers de diminution de la taille et de déformation de la forme de l'haltère (**Figure 1A et B**). Ces gènes ont déjà été décrits pour être impliqués dans le contexte du développement de l'haltère, en lien avec *Ubx* (Fauchaux et al. 2003). Fauchaux et al. montrent que des allèles mutants (létaux à l'état homozygote) de *Ubx* (*Ubx¹³⁰*), *Trl* (*Trl^{13C}*) et *lolal* (*lolal^{KO2515}*), ne provoquant séparément pas de phénotypes anormaux sévères de l'haltère, provoquent une transformation de l'haltère en aile une fois combinés ensemble. Connaissant le rôle de *Trl* dans la régulation épigénétique des gènes Hox, ils suggèrent que *Trl* et *Lolal* jouent un rôle d'activateurs de *Ubx* lors du développement de l'haltère, sans toutefois proposer de preuve directe. Afin de tester cette idée, nous avons procédé à un immunomarquage de *Ubx* et *Trl* en contexte sauvage et lors de la perte de fonction de *Trl*. *Trl* est ubiquitaire dans le disque d'haltère sauvage (**Figure 1C**), mais sa perte de fonction ne provoque pas d'anomalie du profil d'expression de *Ubx* (**Figure 1D**). Cela peut signifier que *Trl* n'est pas un activateur de *Ubx* mais pourrait être un cofacteur. Cela pourrait aussi suggérer que la perte de fonction médiée par RNAi en utilisant *MS1096-Gal4* intervient trop tardivement, après l'activation de *Ubx*, suggérant que *Trl* est nécessaire à l'activation mais pas à la maintenance de l'expression de *Ubx*. Nous avons donc reproduit la

combinaison d'allèles de *lolal*, *Trl* et *Ubx*. Nous n'avons alors constaté aucun défaut notable de l'expression de *Ubx*, malgré la reproduction du phénotype de transformation de l'haltère en aile observé par Faucheux et al. (Figure 1E-H). Cependant, alors que Faucheux et al. obtenaient une telle transformation chez 18% des individus combinant ces trois mutations, nous ne l'avons observée que chez 5,6% des individus, et toujours au niveau d'un seul des deux haltères sans prévalence particulière pour le côté gauche ou droit. Cet ensemble de données suggèrent cependant que *Trl* n'est pas un activateur de *Ubx* dans le disque d'haltère.

Lolal est également un candidat intéressant par son interaction génétique déjà décrite avec *Trl* et *Ubx*. Il s'agit d'une petite protéine de 127aa constituée uniquement d'un domaine POZ/BTB, très conservé et spécialisé dans les interactions protéine-protéine. Une telle protéine est donc un candidat tout à fait crédible pour participer à la formation d'un complexe multi-protéique permettant de moduler la fonction de *Ubx*. Aucun anticorps anti-*Lolal* n'est malheureusement disponible, mais les données transcriptomiques dans le disque d'aile montrent que *lolal* serait exprimé de manière plutôt uniforme dans le disque d'aile (Figure 2). En supposant que ce profil d'expression soit reproduit dans le disque d'haltère, cela pourrait signifier que *Lolal* est colocalisé avec *Ubx*, avec donc un rôle potentiel de cofacteur. Ce type de candidat, une petite protéine spécialisée dans les interactions protéine-protéine, rappelle l'importance que les petites protéines peuvent avoir lors de divers processus biologiques (Samandi et al. 2017 ; Leslie 2019). En effet, les petites protéines ont été peu étudiées malgré leur rôle essentiel, des bactéries (Storz, Wolf, et Ramamurthi 2014) aux mammifères (Frith et al. 2006 ; Plaza, Menschaert, et Payre 2017). Cela est en partie dû à la difficulté technique de leur étude, mais aussi à la considération arbitraire que les ORF (« Open reading frame », ou cadre ouvert de lecture de l'ADN) courts, de moins de 100 amino-acides, ne produiraient pas des protéines fonctionnelles (Harrison et al. 2002).

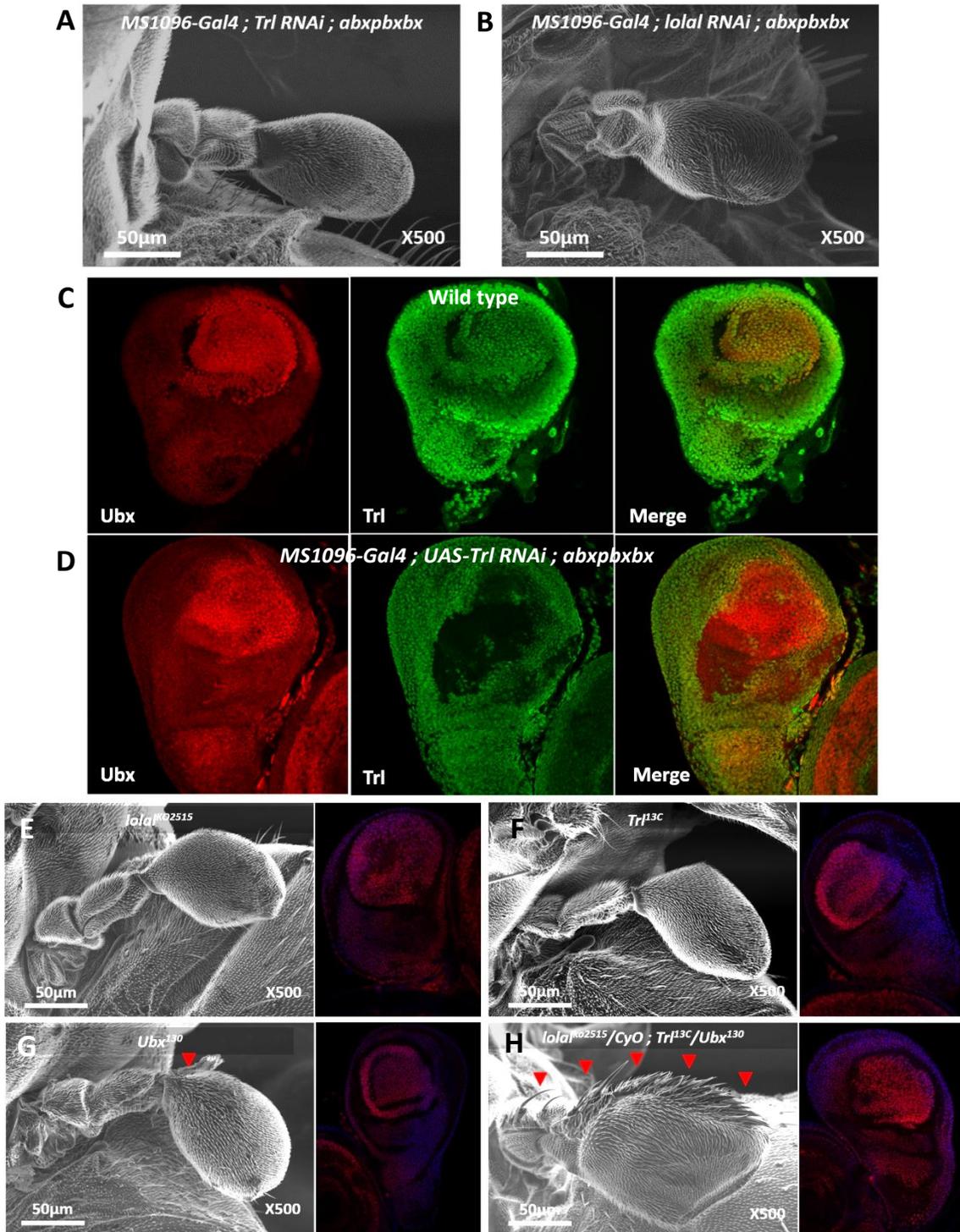


Figure 1 : Rôle de Trithorax-like et Lola-like lors du développement de l'haltère. **A** : la perte de fonction de *Trl* par RNA_i provoque une légère diminution de la taille de l'haltère ainsi que le développement d'un capitellum sensiblement plus fin. **B** : La perte de fonction de *lolal* par RNA_i provoque la diminution de la taille de l'haltère. **C** : *Trl* est présent de manière ubiquitaire dans les noyaux des cellules du disque imaginal d'haltère sauvage, et colocalise donc avec *Ubx*. **D** : La perte de fonction de *Trl* par RNA_i ne provoque pas de modification du profil d'expression de *Ubx*. **E-F** : les mutants *lolal*^{K02515} et *Trl*^{13C} ne provoquent pas de phénotype anormal notable de développement de l'haltère, ni de défaut

notable du profil d'expression de Ubx. **G** : l'allèle *Ubx*¹³⁰ provoque une légère transformation de l'haltère en aile, caractérisée par l'apparition sporadique de quelques poils sensitifs ectopiques au niveau du capitellum de l'haltère. **H** : La combinaison de ces trois allèles provoque une transformation sévère de l'haltère en aile avec une pénétrance d'un haltère sur deux chez 5,6 % des individus (n=231), caractérisé par l'augmentation de la taille de l'haltère et de nombreuses rangées de poils ectopiques organisés le long d'une marge, suggérant une perte d'activité de Ubx, principalement au niveau de la frontière dorso-ventrale du pouch du disque d'haltère. Cependant, le profil d'expression de Ubx ne semble pas affecté.

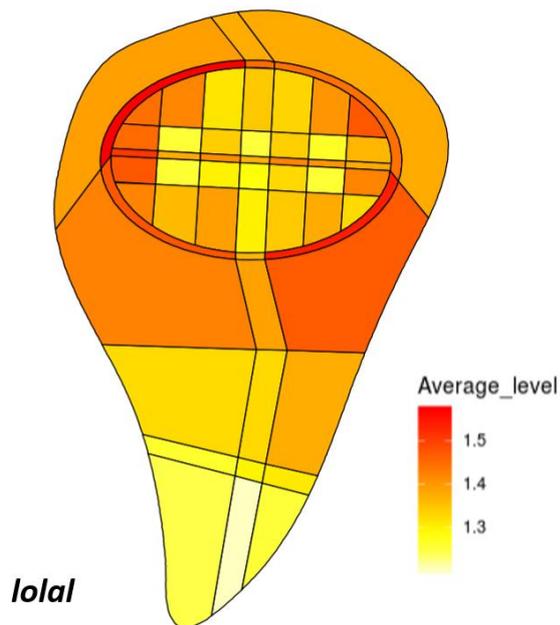


Figure 2 : Marquage *in situ* virtuel de *lolal* dans le disque imaginal d'aile à partir de données transcriptomiques. Le gène *lolal* est actif de manière ubiquitaire dans l'ensemble du disque imaginal d'aile, y compris dans le pouch, et particulièrement au niveau de la frontière dorso-ventrale.

1.4 Hth, régulateur en amont et cofacteur pour la formation des haltères

Le gène *Hth* est apparu comme un des candidats les plus intéressants : sa perte par RNAi entraînait un phénotype sévère et la protéine était déjà décrite dans la littérature comme cofacteur des protéines Hox dans de nombreux contextes développementaux. Cependant, *Hth* a récemment été décrit comme un répresseur de *Ubx* dans le disque imaginal d'haltère, permettant à *Ubx* de réprimer sa propre expression afin de maintenir une dose relativement faible dans les territoires présomptifs des parties proximales de l'haltère (Delker et al. 2019). Malgré ce rôle de régulateur, les phénotypes provoqués par la perte et le gain de fonction de *Hth* suggèrent aussi un rôle de cofacteur de Ubx. L'analyse de données de CHIP-seq de *Hth* et de *Ubx* au niveau des disques imaginaux d'haltère montre que les deux protéines reconnaissent des sites à proximité l'une de l'autre au niveau de régions promotrices de nombreux gènes cibles, illustrant donc une coopération possible au cours du développement de l'haltère (Choo et al. 2011).

1.5 Grn, nouveau cofacteur indispensable à la fonction de Ubx dans le disque d'haltère.

Le second cofacteur candidat ayant retenu notre attention est Grn. En contexte sensibilisé, la perte de fonction de *grn* provoque en effet la transformation de l'haltère en aile la plus sévère que nous ayons observée (après la perte de fonction du gène *Ubx* lui-même). De plus, Grn ne semble pas être un régulateur de *Ubx* puisque ni sa perte, ni son gain de fonction n'affectent le profil d'expression de *Ubx* dans le disque imaginal d'haltère. Cependant, comme pour Hth, la colocalisation avec Ubx dans les territoires présomptifs des parties les plus distales de l'haltère n'est visible qu'au niveau de quelques cellules. Comme l'a montré l'étude de *Antp* (Paul. et al), les profils d'expression de gènes impliqués dans le développement des appendices de vol peuvent être très dynamiques, et un rôle plus précoce de Grn (au stade L1 par exemple) pour le développement des parties distales de l'haltère peut être envisagé. Il serait intéressant de disposer de données de transcriptome des cellules exprimant Grn dans le disque d'haltère afin de connaître le niveau d'expression de Ubx.

Des données récentes de transcriptomes des cellules isolées (« single-cell transcriptomic approach ») dans les disques imaginaux d'aile permettent de nuancer les observations issues des immunomarquages, limitées par le rapport signal/bruit de fond lors des acquisitions au microscope confocal et l'affinité des anticorps. Les gènes *Hth* et *Grn* semblent en effet exprimés au niveau du pouch des disques d'ailes, à des niveaux plus faibles qu'en périphérie du pouch. Au niveau des zones de plus forte expression, les marquages *in situ* virtuels générés à partir de ces données de transcriptomiques reproduisent bien les territoires occupés par Hth et Grn observés en immunomarquages dans les disques imaginaux d'aile (**Figure 3**) (Deng et al. 2019). Les territoires occupés par Hth et Grn semblent extrêmement homologues entre les disques d'ailes et d'haltères. Bien que le niveau de traduction des protéines ne soit pas nécessairement directement corrélé au niveau de transcription du gène correspondant, et à moins que des régulations spécifiques au niveau du pouch de l'haltère ne modifie le profil d'expression observé dans l'aile, ces données suggèrent que Hth et Grn pourraient être présents à faible dose dans le pouch du disque d'haltère. Cela pourrait expliquer l'effet de la perte et du gain de fonction de ces gènes dans les parties distales de l'haltère, et appuyer l'hypothèse d'un rôle de cofacteur de Ubx.

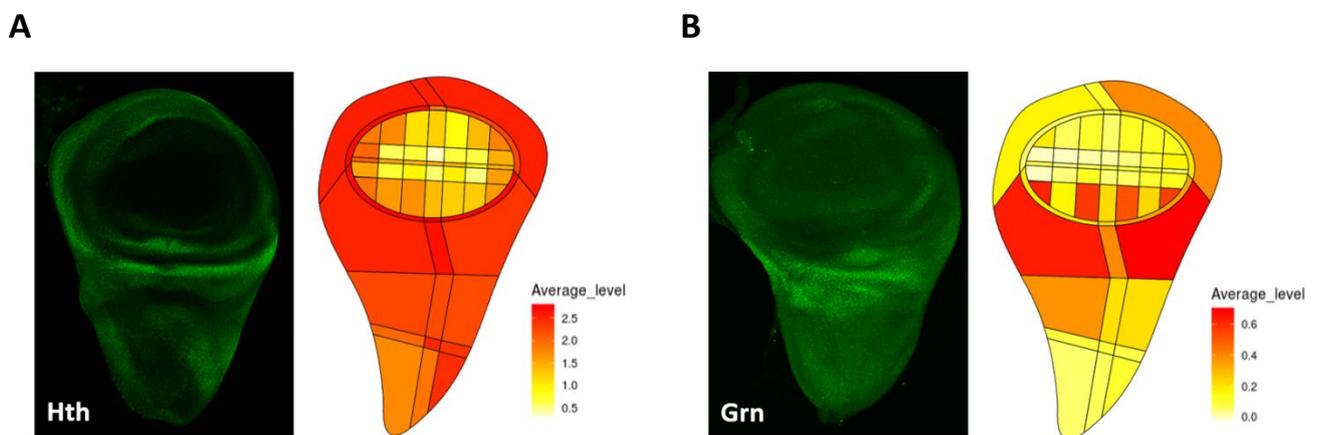


Figure 3 : Profil d'expression de Hth et Grn dans les disques imaginaux d'aile. **A** : Les territoires occupés par Hth dans le disque d'aile observés en immunomarquage (à gauche) correspondent aux territoires où *Hth* s'exprime fortement d'après des données de transcriptomique (à droite). **B** : Les territoires occupés par Grn dans le disque d'aile observé en immunomarquage (à gauche) correspondent aux territoires où *Grn* s'exprime fortement d'après des données de transcriptomique (à droite). Dans les deux cas, les données de transcriptomique suggèrent une expression dans le pouch du disque d'aile, malgré un niveau d'activité plus faible que dans les territoires périphériques. La coloration des marquages *in situ* virtuels varie selon l'intensité moyenne de l'expression du gène considéré au sein des différents compartiments, du rouge (plus élevé) au jaune pâle (plus faible).

Une collaboration avec l'équipe du professeur Lingadahalli Subrahmanya Shashidhara (Pune, Inde) ayant accès à des données de CHIP-seq de Ubx dans le disque d'haltère, ainsi qu'aux transcriptomes comparés des disques imaginaux d'ailes et d'haltère permet d'identifier les sites de liaison de Ubx au niveau de gènes différentiellement exprimés entre l'aile et l'haltère. Ces gènes sont donc probablement des gènes cibles directs de Ubx. Il est alors possible de rechercher des motifs nucléotidiques reconnus par d'autres FT à proximité de ces sites liés par Ubx. Un enrichissement de sites pour des FT spécifiques à proximité des sites liés par Ubx peut alors suggérer une coopération entre ces protéines pour la régulation transcriptionnelle. Le motif reconnu par Grn (**Figure 4A**) est retrouvé enrichi à proximité de sites de liaison au niveau de gènes cibles réprimés par Ubx (**Figure 4B**). Parmi ces gènes, on retrouve plusieurs gènes connus pour être impliqués dans le développement des ailes et/ou réprimés par Ubx (**Figure 4C**). Ces données suggèrent encore que Grn peut être un cofacteur de Ubx.

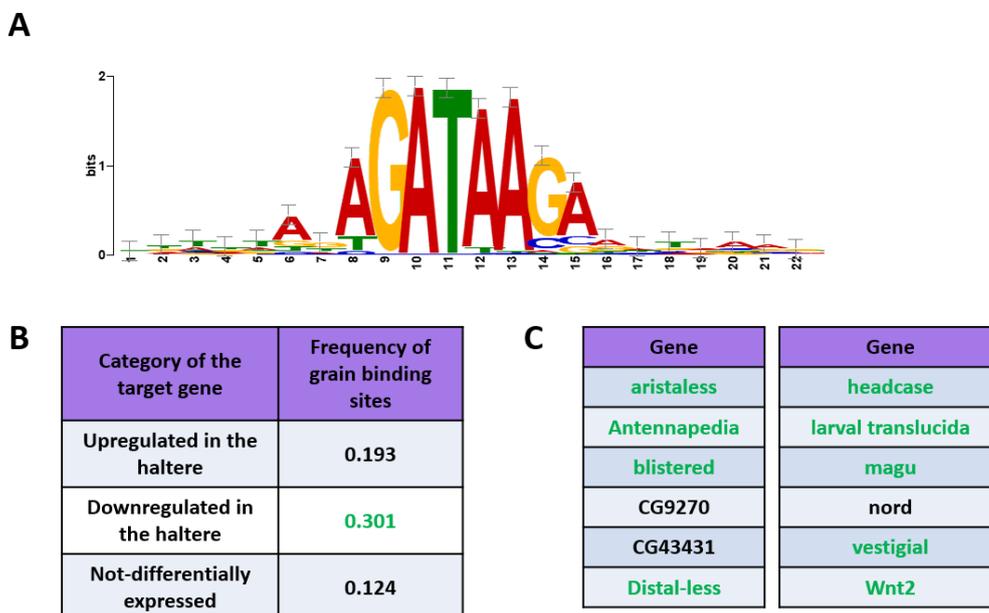


Figure 4 : Le motif nucléotidique reconnu par Grain (Grn) est enrichi au niveau des gènes cibles de Ubx dans l'haltère. **A** : Motif nucléotidique reconnu par Grn. **B** : Le motif nucléotidique reconnu par Grn est enrichi à proximité des sites liés par Ubx au niveau de gènes réprimés dans l'haltère. **C** : Parmi ces gènes, on retrouve de nombreux gènes impliqués dans le développement de l'aile et /ou connus pour être une cible de Ubx (*aristalless* : Campbell et Tomlinson 1998 ; *Antp* : Tsubota, Saigo, et Kojima 2008 ; *blistered* : Fristrom et al. 1994 ; *Distal-less* : Gebelein et al. 2002 ; *headcase* : Weaver et White 1995 ; *larval translucida* : Szuperák et al. 2011 ; *magu* : Hamaratoglu et al. 2011 ; *vestigial* : Baena-López et García-Bellido 2003 ; *Wnt2* : Kozopas, Samos, et Nusse 1998).

1.6 Capacité d'interaction entre les cofacteurs candidats identifiés et les protéines Hox

Afin de savoir si les cofacteurs candidats identifiés par notre approche ont effectivement la capacité d'interagir physiquement avec Ubx dans le disque imaginal d'haltère, nous avons utilisé le système UAS/Gal4 pour co-exprimer des protéines Hox fusionnées au fragment C-terminal de la protéine fluorescente Venus (VC) et ces cofacteurs fusionnés au fragment N-terminal de Venus (VN). Afin de savoir si cette éventuelle capacité d'interaction est spécifique de Ubx ou partagée par des protéines Hox incapables de sauver le développement de l'haltère, nous avons fait de même avec la protéine Scr fusionnée avec VC (**Figure 5**). Les protéines Hth, Trl, Lolal et Grn sont toutes capables d'interagir avec Ubx mais aussi avec Scr. Si cela révèle un potentiel d'interaction entre ces différentes protéines, dans ce contexte, la dose de chaque partenaire mis en jeu peut être bien supérieure à la dose à laquelle ils sont retrouvés physiologiquement au sein d'une cellule lors de processus développementaux. Ce n'est donc pas une preuve que ces couples formeront des dimères s'ils sont produits à des doses inférieures. De plus, la capacité d'interaction entre les protéines Hox et leurs partenaires ne dépend pas d'un potentiel d'interaction absolu entre les deux protéines, mais aussi du contexte dans lequel ces protéines se trouvent. En effet, les protéines Hox peuvent interagir de manière spécifique dans certains types cellulaires avec des partenaires pourtant ubiquitaires (Carnesecci et al. 2020).

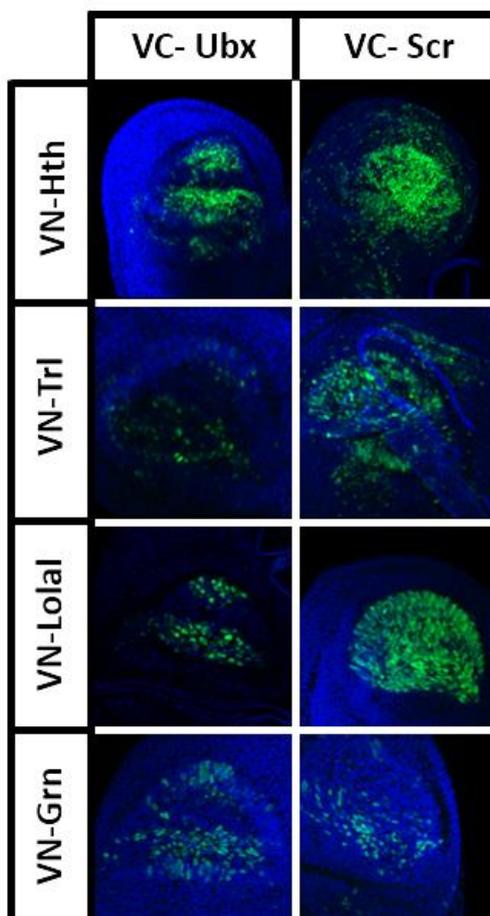


Figure 5 : Analyse par BiFC du potentiel d'interaction entre les cofacteurs candidats identifiés et les protéines Hox Ubx et Scr. Des couples de cofacteurs candidats identifiés par notre approche sont fusionnés à VN, et de protéines Hox (Ubx ou Scr) fusionnées à VC sont produits dans les disques imaginaux d'haltère de drosophile à l'aide du système UAS/Gal4. L'apparition d'un signal fluorescent vert signifie que les deux protéines de fusion en présence se sont suffisamment rapprochées (à moins de 40nm) pour permettre la formation d'un complexe fluorescent entre les deux fragments de la Venus, suggérant un potentiel d'interaction entre les deux protéines testées.

1.7 Vers une approche par BioID complémentaire de l'approche génétique pour identifier les cofacteurs de Ubx dans le disque d'haltère

Le crible fonctionnel a permis de révéler de nombreux autres cofacteurs potentiels de Ubx. Croiser ces données fonctionnelles avec des données issues d'autres approches est un excellent moyen de diriger nos efforts de recherche vers les candidats les plus susceptibles de constituer un réel cofacteur de Ubx. C'est la raison pour laquelle mon projet principal était de combiner le crible fonctionnel par RNAi avec une approche biochimique, permettant de révéler les protéines interagissant physiquement avec Ubx dans le disque imaginal d'haltère. J'ai donc consacré une grande partie de mon temps de recherche à adapter la méthode de BioID au contexte développemental de l'haltère (**voir Annexe**). Pour cela, nous avons généré des lignées transgéniques de drosophiles pouvant exprimer à l'aide du système UAS/Gal4 des protéines Hox fusionnées à l'enzyme BirA*, notamment Ubx. Nous avons choisi d'utiliser l'allèle *UbxGal4^{LDN}* (De Navas, Garaulet, et Sánchez-Herrero 2006), une insertion de Gal4 au niveau du locus de *Ubx*, afin de diriger l'expression de ces transgènes de manière très similaire à celui de *Ubx* endogène dans les disques imaginaires d'haltère. Afin de nous assurer que la fraction des protéines biotinylées par BirA*-Ubx était enrichie en partenaires nécessaires au développement de l'haltère Ubx-dépendant, nous avons choisi de combiner les allèles *UbxGal4^{LDN}* et *UAS-BirA*-HA-Ubx* à l'allèle *abxpbx*. Les deux allèles *UbxGal4^{LDN}* et *abxpbx* sont des hypomorphes de *Ubx* et leur combinaison provoque une transformation de l'haltère en aile. Dans ce contexte, c'est la protéine BirA*-HA-Ubx qui sauve le développement de l'haltère (**voir annexe**). Cela permet également d'éviter la titration des cofacteurs pertinents par la protéine Ubx endogène. Afin de discriminer ces partenaires de protéines capables d'interagir avec les protéines Hox indépendamment de leur capacité à spécifier l'haltère, nous avons généré une lignée transgénique capable de produire l'enzyme BirA* fusionnée à Dfd, une protéine Hox qui n'est pas capable de sauver la perte de fonction de Ubx lors du développement de l'haltère.

Nous avons ensuite mis au point le protocole biochimique permettant de purifier les protéines biotinylées à partir des extraits protéiques issus de cellules exprimant BirA*-HA-Ubx. La principale difficulté réside alors dans l'obtention d'une quantité initiale importante d'extraits de protéines afin de purifier suffisamment de protéines biotinylées pour effectuer des analyses qualitatives par spectrométrie de masse (LC-MS). En effet, la faible taille des disques d'haltères (entre 8 000 et 10 000 cellules, Martin 1982) nécessite la dissection de très nombreuses larves pour obtenir assez de protéines pour réaliser une telle analyse, contrairement aux approches de culture cellulaire, qui permettent facilement d'obtenir suffisamment de protéines pour réaliser des analyses de spectrométrie de masse quantitative. Cette limitation à des approches de spectrométrie qualitative implique la nécessité d'utiliser des contrôles pertinents, comme l'usage de BirA*-HA-Dfd, mais aussi éventuellement BirA*-HA-NLS (« Nuclear Localisation Signal », une séquence peptidique permettant d'adresser

l'enzyme BirA* au noyau) afin de connaître le bruit de fond de la biotinylation par BirA* dans le compartiment nucléaire. Le grand investissement en temps de dissection de larves nécessaire pour effectuer chaque condition en triplicat biologique limite également le nombre de conditions réalisables. En effet, il aurait été aussi intéressant de reproduire l'expérience avec d'autres protéines Hox capables de sauver le développement de l'haltère, telles que AbdA ou Antp, afin de savoir si ces protéines utilisent les mêmes partenaires que Ubx pour accomplir la même fonction.

La mise au point des différentes étapes de cette approche a pris plus de temps que prévu, si bien qu'un financement pour une quatrième année de thèse aurait été nécessaire afin de mener à bien les étapes lourdes de dissections, et les analyses des données de spectrométrie de masse. Malheureusement ce financement n'a pas été obtenu, et la fermeture de l'institut pendant plusieurs mois, due à la crise sanitaire du Covid-19, a compromis encore un peu plus la finalisation de ce projet dans le temps restant. Aussi j'ai pu mettre au point des outils dédiés au contexte développemental de l'haltère, mais les expériences en triplicat restent désormais à réaliser. Cette approche aurait pu fournir des données qui auraient été comparées à celles du crible fonctionnel par RNA_i et permettre ainsi d'identifier les candidats les plus solides. De manière générale, la comparaison de deux approches à large échelle dans un même contexte, l'une génétique et l'autre biochimique, aurait été intéressante car encore jamais réalisée.

2. Rôle de sites à faible affinité pour Ubx lors du développement de l'haltère

L'équipe du professeur Shashidhara a également étudié la fonction des orthologues de Ubx chez différentes espèces d'insectes, comme le papillon *Bombyx mori*, ou l'abeille *Apis mellifera*. Nos collaborateurs ont constaté que les orthologues de Ubx issus de ces deux espèces, impliqués dans le développement des ailes dans leurs contextes biologiques natifs, sont capables de réprimer le développement des ailes une fois ces orthologues produits chez la drosophile, en réprimant des gènes tels que ceux impliqués dans la voie Wingless, comme le ferait Ubx de drosophile (Prasad et al. 2016). Cette différence de fonction d'une même protéine selon le contexte biologique dans lequel elle se trouve pourrait être due à des différences dans les partenaires avec lesquels elle interagit, et/ou à des différences au niveau des gènes cibles. Pour connaître les différences dans la liaison de Ubx au niveau des génomes selon le contexte biologique, les auteurs ont généré des données de CHIP-seq de Ubx dans le disque imaginal d'haltère de drosophile, mais également dans le primordium d'aile de l'abeille. L'analyse de ces données révèle notamment que Ubx se lie principalement à des motifs consensus TAAT bien décrits pour être liés par les protéines Hox chez l'abeille. Étonnamment, Ubx se lie préférentiellement à des motifs non-canoniques ATTTA chez la drosophile (**Figure 6**). Nous avons exploré plus en aval quelle pouvait être la pertinence de ces motifs atypiques dans le contexte de la fonction de Ubx.

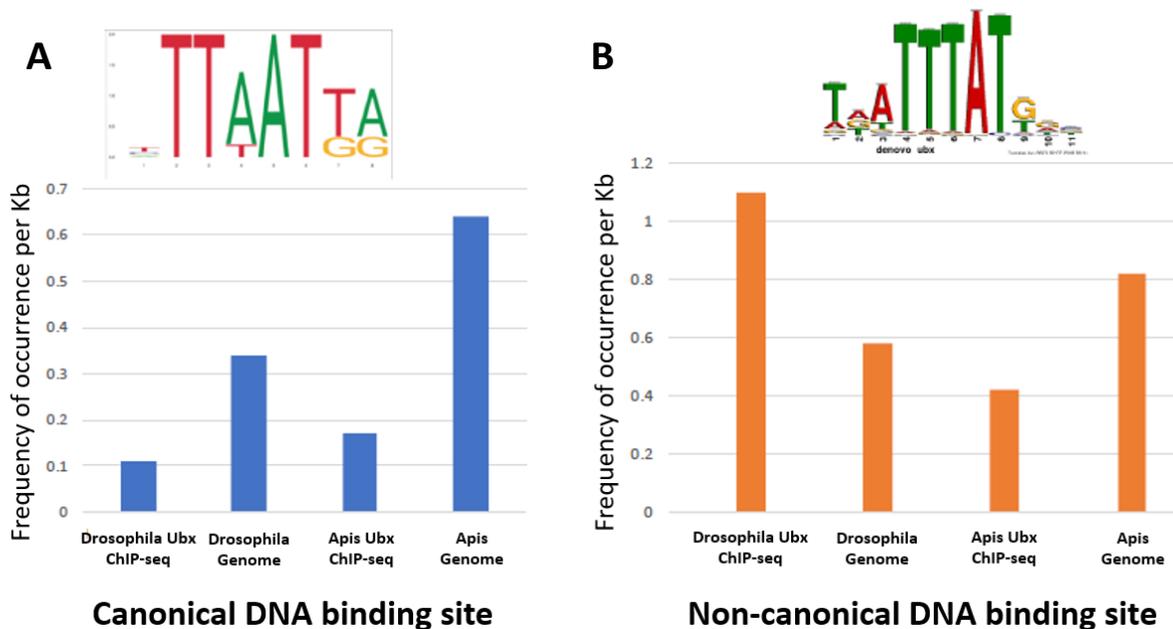


Figure 6 : Variation de la préférence de liaison à l'ADN dans les primordia d'appendices de vol entre les orthologues de Ubx issus de la drosophile et de l'abeille. Cette analyse compare la fréquence/Kb des site de liaison par Ubx de type canonique (TAAT) et non-canonique (ATTTA) dans le génome de la drosophile et au niveau des séquences d'environ 150 paires de bases précipitées avec Ubx lors du ChIP-seq dans le primordium d'haltère chez la drosophile ou d'aile chez l'abeille. **A** : Chez la drosophile comme chez l'abeille, on n'observe que la fréquence de liaison de Ubx aux sites canoniques est similaire entre le primordium d'haltère chez la drosophile et d'aile chez l'abeille. On observe cependant une plus grande fréquence des sites canoniques dans le génome de l'abeille que dans le génome de la drosophile. **B** : Au niveau du ChIP-seq de Ubx chez la drosophile, on observe une haute fréquence de sites de liaison non-canoniques TAAAT, supérieure à la fréquence à laquelle on retrouve ce type de motifs dans le génome complet. Chez l'abeille, la liaison de Ubx aux sites non-canoniques est similaire à celle observée pour les sites canoniques.

L'élément cis-régulateur « edge » du gène *CG13222* est déjà bien décrit pour être une cible directement activée par Ubx lors du développement de l'haltère. Cet enhancer présente des motifs canoniques (TAAT) et non canoniques (ATTTA). Cependant, les analyses de cet élément réalisées jusqu'à aujourd'hui ne permettent pas de savoir si ces différents sites sont effectivement liés par Ubx, puisque les motifs non-canoniques de ce type n'étaient pas particulièrement considérés comme pouvant être liés par Ubx. En effet des expériences *in vitro* de retard sur gel montrent que Ubx peut se lier à la séquence de cet élément. Le remplacement des nucléotides TAAT des sites canoniques par des guanines induit la perte d'affinité de Ubx pour cet élément. Cependant, ces mutations touchent également les sites non-canoniques puisqu'ils chevauchent parfois les sites canoniques (TAAATTA, Hersh et al. 2007) (**Figure 7**). Nous avons donc reproduit ces expériences de retard sur gel en ne mutant que les nucléotides impliqués seulement dans les sites non-canoniques ou canoniques (TAAATTA, **Figure 8A et B**). Ces expériences suggèrent que les deux types de motifs, canoniques et non-canoniques, sont responsables de la liaison de Ubx à cet élément *in vitro*. Nous avons également testé deux autres protéines Hox, Antp qui est capable de sauver le

d'haltère ne contient que deux sites de liaison par Ubx (TAAT/ATTA), localisés à 20 paires de bases l'un de l'autre. **D** : La mutation des deux sites (M1M2) élimine l'expression du rapporteur GFP à de la limite postérieure du disque d'haltère, maintenant l'expression dans le groupe de cellules de la région présomptive du hinge. **E** : La mutation du site 1 (M1) seule élimine l'expression du rapporteur GFP. **F** : La mutation du site 2 (M2) seul n'a pas d'effet détectable sur l'activité cis-régulatrice. À partir de Hersh et al. 2007.

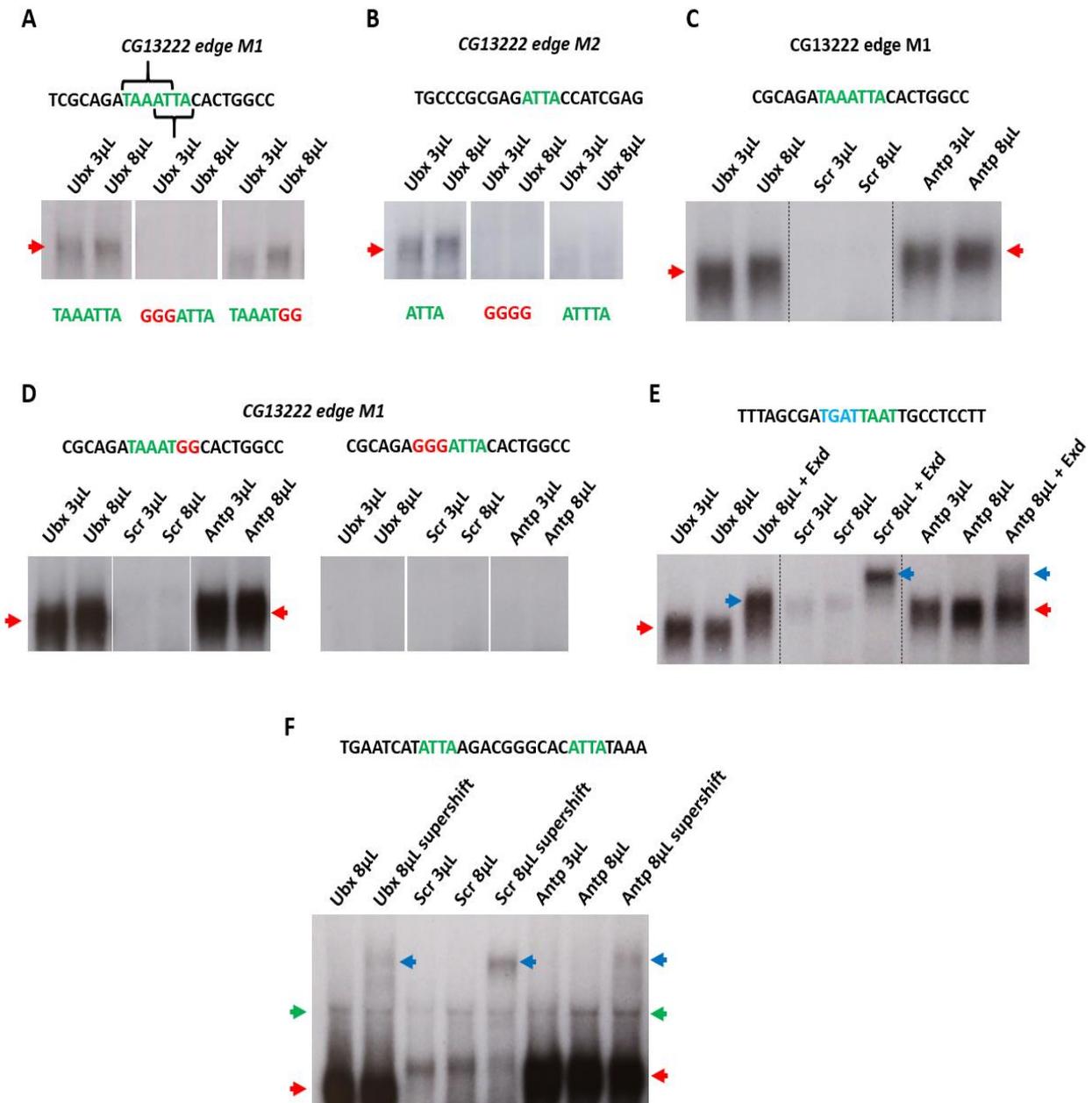


Figure 8 : Ubx et Antp présentent des capacités de liaison aux sites canoniques et non-canoniques très similaires. Les monomères de protéines Hox liées aux sondes sont indiquées par des flèches rouges. Les dimères Hox/Exd ou Hox/anticorps sont indiqués par une flèche bleue. La liaison de deux protéines Hox sur la sonde Spalt 6/6 est indiquée par une flèche verte. **A** : Ubx peut se lier à la sonde CG13222 M1 sauvage. La mutation du site non-canonique abolit la liaison de Ubx, tandis que la mutation du site non-canonique n'affecte pas l'affinité de Ubx à la sonde. **B** : Ubx peut se lier à la sonde CG13222 M2 sauvage. La mutation du site canonique abolit la liaison de Ubx à la sonde. La conversion du site canonique en site non-canonique restaure très faiblement la liaison de Ubx. **C** : Scr n'est pas capable de lier la sonde CG13222 M1 sauvage, tandis que Antp présente une affinité très similaire à celle de Ubx. **D** : La mutation du site

canonique de la sonde CG13222 M1 n'abolit pas la liaison de Antp. **E** : La mutation du site non-canonique de la sonde CG13222 M1 n'abolit pas la liaison de Antp. Cela suggère que Antp interagit avec la sonde CG13222 M1 via le site non-canonique, comme Ubx. **E** : Ubx et Antp peuvent se lier seuls à la sonde contenant un site consensus de liaison Hox/Exd avec une grande affinité. Scr se lie à cette sonde avec une plus faible affinité. Ces trois protéines Hox peuvent se lier à cette sonde en formant un dimère avec Exd. La séquence de la sonde utilisée est tirée de Galant et Carroll 2002. **F** : Ubx et Antp présentent une forte affinité à la sonde Spalt 5/6, portant deux sites canoniques de liaison par des protéines Hox. Scr présente une affinité modérée à cette sonde. Les trois protéines Hox peuvent se lier simultanément aux deux sites présents sur la sonde, formant une bande de plus haut poids moléculaire. L'ajout d'un anticorps spécifique de chaque protéine Hox (technique dite de « supershift ») provoque l'apparition d'une bande de plus haut poids moléculaire, confirmant que les bandes observées sont spécifiquement dues aux protéines Hox considérées.

L'équipe du professeur Shashidhara a de son côté généré des lignées de drosophiles transgéniques possédant des variantes de l'élément *CG13222 edge* contrôlant l'expression d'une séquence codante pour la GFP. Alors que la version sauvage induit l'expression de la GFP au niveau de trois territoires bien définis dans le disque d'haltère (**Figure 9A**), une mutation similaire à celle effectuée par Hersh et al. au niveau du site M1 induit la perte du territoire 1, ainsi qu'une diminution de l'étendue et de l'intensité du signal fluorescent des deux autres motifs (**Figure 9B**). Le même effet est observé en convertissant un site non-canonique en site canonique du site M2 (**Figure 9C**). À l'inverse, convertir un motif canonique en motif non-canonique dans le site M2 provoque aussi la perte du territoire d'expression 1, mais induit la modification du profil des deux autres territoires (**Figure 9D**). Cela suggère que ces deux types de sites sont impliqués dans la régulation de *CG13222*, potentiellement redondants, et qu'un équilibre entre ces différents types de motifs permet d'établir précisément le profil et l'intensité de l'expression. Cependant, ces mutations touchent parfois également les deux territoires canoniques et non-canoniques superposés, de manière similaire aux mutations étudiées *in vitro* par Hersh et al. Nous attendons actuellement les résultats provenant des lignées transgéniques présentant exactement les mêmes mutations que celles que nous avons testé *in vitro*, permettant de disséquer la fonction de chaque motif séparément, afin de conclure avec d'avantage de confiance quant au rôle des différents motifs au sein de cet élément cis-régulateur.

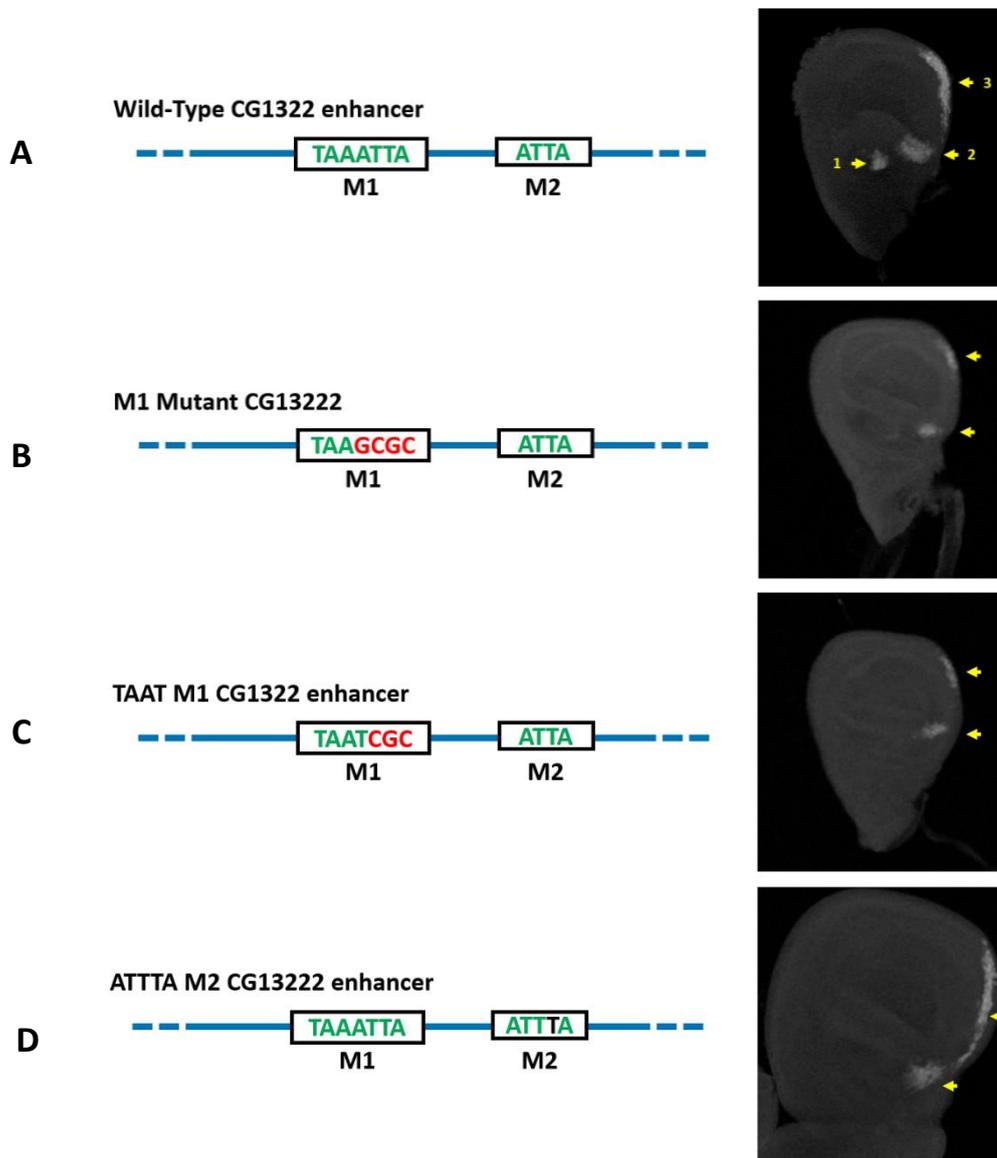


Figure 9 : Des sites de liaison pour Ubx canoniques et non-canoniques sont nécessaires pour la régulation de CG13222 *in vivo*. **A :** *CG13222 edge* sauvage induit l'expression de la GFP au niveau de trois territoires bien définis dans le disque d'haltère (flèches jaunes). **B :** Une mutation touchant les motifs canoniques et non-canoniques du site M1 induit la perte du territoire 1, ainsi qu'une diminution de l'étendue et de l'intensité du signal fluorescent dans les territoires 2 et 3. **C :** La conversion du site M1 en un unique site canonique provoque le même effet. **D :** La conversion du motif canonique en motif non-canonique du site M2 provoque la perte du territoire 1, et la modification du profil des deux autres.

Un autre élément cis-régulateur permet d'étudier l'importance de ces différents sites. Il s'agit de l'enhancer *Quadrant* du gène *vestigial (vgQ)*. Chez la drosophile, cet élément contient aussi des sites non-canoniques et canoniques reconnus par Ubx, qui le réprime dans le disque d'haltère. L'orthologue de cet enhancer de *vg* chez *Apis mellifera* ne contient en revanche qu'un site canonique. L'équipe du professeur Shashidhara a donc généré des lignées de drosophile transgénique produisant la GFP sous contrôle de variants de ces différents

éléments cis-régulateurs. Alors que *vgQ* sauvage de drosophile est bien actif dans le disque imaginal d'aile, mais réprimé dans le disque d'haltère (**Figure 10A**). En revanche, l'enhancer de *Apis* présente une expression forte dans le disque imaginal d'aile, mais aussi dans le disque imaginal d'haltère, et ce particulièrement là où Ubx est présent à forte dose, suggérant qu'il est activé par Ubx (**Figure 10B**). La conversion du motif canonique en motif non canonique ATTTA au sein de l'enhancer issu de *Apis* ne semble pas affecter l'expression dans le disque d'aile, mais augmenter l'expression dans le disque d'haltère (**Figure 10C**). Cela suggère que le site ATTTA favorise davantage la liaison de Ubx à cet élément. En revanche, ajouter un motif non-canonique à proximité du motif canonique induit une diminution de l'expression dans l'haltère. Cela peut être dû à une modification de l'affinité de liaison de Ubx, mais aussi à la perturbation trop forte de la topologie des sites de liaisons présents au niveau de cet enhancer, induite par l'ajout d'un site entier (**Figure 10D**). Si ces données suggèrent encore que les sites non-canoniques ATTTA peuvent être liés par Ubx *in vivo* et être impliqués dans des fonctions biologiques, il faut attendre les résultats provenant de lignées possédant un enhancer de drosophile *vgQ* présentant les motifs ATTTA convertis en motifs TAAT afin de confirmer la nécessité de tels motifs pour la régulation de *vg* par Ubx. Avec les résultats concernant l'élément régulateur de *CG13222*, cela pourrait montrer l'importance de sites non canonique de faible affinité pour les protéines Hox lors du développement de l'haltère, et ce au niveau de gènes activés (*CG13222*) et réprimés (*vg*) par Ubx.

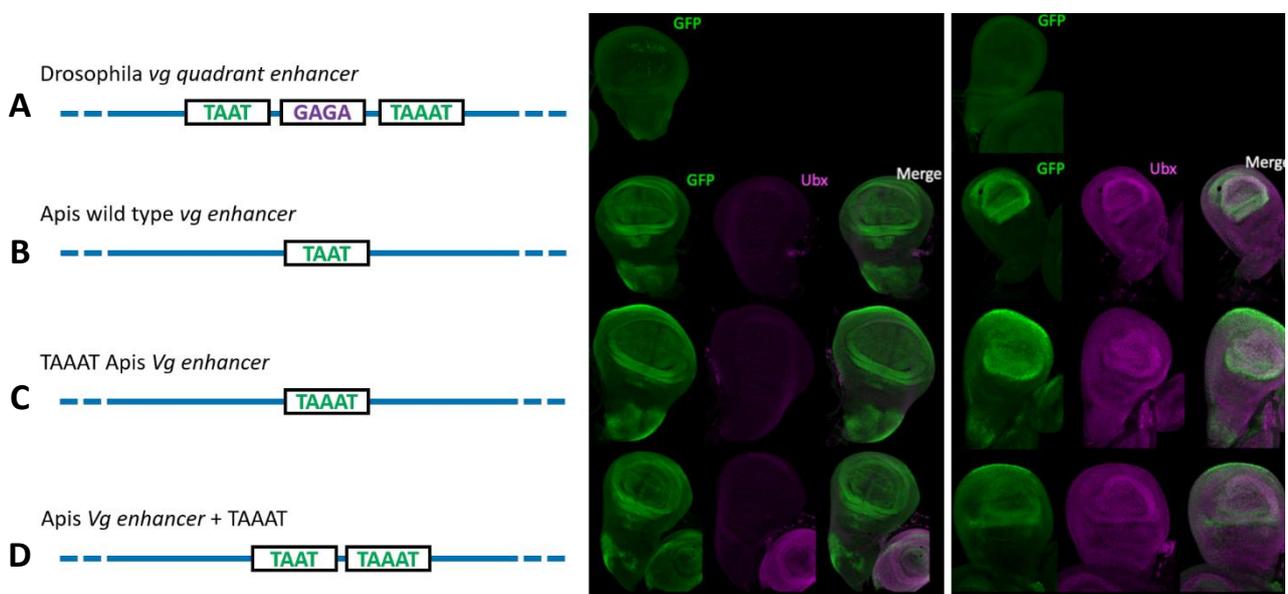


Figure 10 : Analyse des sites de liaison pour les protéines Hox au niveau d'un enhancer de *vestigial (vg)* de drosophile et d'abeille. A : L'enhancer sauvage *Quadrant* du gène *vg* de *Drosophila melanogaster* contient un site canonique et un site non-canonique de liaison par des protéines Hox, et un site pouvant être reconnu par Trl (GAGA). Il induit une expression du rapporteur GFP dans le disque d'aile mais pas dans le disque d'haltère. **B :** L'orthologue de cet enhancer chez *Apis mellifera* ne contient qu'un site canonique de liaison par les protéines Hox, et n'est pas réprimé dans le disque d'haltère mais semble être particulièrement actif au niveau du pouch, où Ubx est fortement concentré. **C :** Convertir le site TAAT de l'enhancer de *Apis* en TAAAT induit une expression plus intense dans le disque d'haltère. **D :** ajouter un site TAAAT à proximité du site TAAT de l'enhancer issu d'*Apis* provoque une diminution de l'expression du rapporteur GFP dans le disque d'haltère.

L'importance de tels sites de faible affinité a déjà été documentée pour être essentielle à la fonction spécifique de protéines Hox. C'est le cas de la régulation du gène *shavenbaby (svb)*, dont l'activation par Ubx repose sur une accumulation de motifs de faible affinité, redondants au niveau de ses séquences régulatrices (Crocker et al. 2015). Si la perte d'un de ces motifs n'affecte pas drastiquement le profil d'expression de *svb*, la conversion de ces sites en motifs de forte affinité provoque l'augmentation du niveau d'expression dans les territoires d'expression normaux, mais aussi une expression ectopique due à la capacité qu'ont alors des protéines Hox autres que Ubx à se lier à ces motifs. La régulation des gènes par des enhancers contenant des sites de faible affinité ne semble pas seulement dépendante de la nature de la protéine Hox en présence, mais aussi de la dose de cette protéine. Les enhancers de tels gènes peuvent alors se trouver au sein de micro-environnements nucléaires où l'on trouve une forte concentration de leurs protéines régulatrices (Tsai et al. 2017). Le fait que Ubx utilise préférentiellement des motifs de faible affinité pour contrôler ses gènes cibles dans le disque imaginal d'haltère de drosophile est donc cohérent avec la forte dose de Ubx observée dans le disque d'haltère, et pourrait expliquer pourquoi ce n'est qu'une forte diminution de la concentration de Ubx qui est capable de provoquer la transformation progressive de l'haltère en aile (Smolik-Utlaut 1990 et Paul et al.).

3. Fonction des gènes Hox dans le développement des ailes chez la drosophile

Si le rôle de *Ubx* lors de la formation de l'haltère est clairement établi, le développement des ailes est considéré depuis longtemps comme étant indépendant de la fonction de gènes Hox (Struhl 1982 ; Carroll et al. 1995). En effet, Carroll et al. montrent que la protéine *Antp* semble ne pas être présente au niveau du pouch des disques imaginaires d'ailes, et son expression ectopique n'a pas d'effet sur la morphologie de l'aile, ni sur l'expression du gène *vestigial*, essentiel pour la formation de l'aile (ces données ne sont pas montrées). Cependant, d'autres études montrent que *Antp* est capable de promouvoir la formation de structures de l'aile ectopiquement au niveau des yeux (Kurata et al. 2000 ; Prince et al. 2008). Ces résultats entraînent donc des conclusions opposées quant au rôle possible de *Antp* pour la formation des ailes. L'observation d'un défaut de développement des ailes lors de la perte de fonction de *Antp* au cours de notre crible par interférence ARN va également dans le sens d'un rôle possible de *Antp*.

Nous avons ainsi réalisé des immunomarquages de *Antp* pour vérifier son profil d'expression au cours du développement du disque imaginal d'aile, au stade L3 mais aussi aux stades plus précoces. Nous avons constaté que la protéine *Antp* est présente uniformément dans le disque imaginal d'aile au premier stade larvaire (stade L1), puis se restreint progressivement aux parties dorsales et ventrales du pouch, avec également un profil dynamique au niveau de quelques cellules de la frontière dorso-ventrale, la région présomptive de la marge de l'aile.

Ce profil n'a jamais été noté dans les travaux précédents. En revanche, nous retrouvons le profil de *Antp* observé précédemment au niveau des zones présomptives des parties les plus proximales de l'aile, où *Antp* est plus fortement exprimé. Ce profil n'est pas totalement nouveau ; il reproduit bien les immunomarquages de Carroll et al. à l'extérieur du pouch au stade L3. Cependant, les différences observées de la présence de *Antp* au niveau du pouch ainsi qu'aux stades plus précoces peuvent s'avérer essentielles pour comprendre le développement des ailes. Les détails de la présence de *Antp* au niveau du pouch du stade L3 ont pu passer inaperçus en 1995 pour plusieurs raisons, à cause des outils technologiques disponibles, et surtout de l'utilisation d'un anticorps monoclonal (8C11) pour marquer *Antp*, plus sensible que l'anticorps 4C3 employé par Carroll et al.

Afin de tester la fonction de *Antp* au cours du développement de l'aile, nous avons employé plusieurs techniques différentes, Crispr/Cas9 et RNAi, pour provoquer une perte de fonction spécifique et ciblée de *Antp* au niveau du pouch du disque imaginal d'aile. Ces expériences ont montré l'importance de *Antp* pour la formation de la marge de l'aile, ce qui est cohérent avec le marquage de *Antp* observé au niveau de son territoire présomptif. *Antp* semble aussi important pour déterminer la taille de l'aile. Nous avons ensuite observé l'influence que pouvait avoir la perte de fonction de *Antp* sur l'expression de gènes connus pour être essentiels au développement des ailes. Ainsi, le gène *Wingless (Wg)* impliqué dans le développement de la marge, et les gènes *Spalt (Sal)*, *Nubbin (Nub)* et *Mad (Mother against decapentaplegic)* impliqués dans la croissance de l'aile, présentent tous des profils d'expression affectés par la perte de fonction de *Antp*. Cela place donc *Antp* en amont de ces gènes essentiels au développement de l'aile. Bien que le système UAS/Gal4 nous ait permis d'affecter l'expression de *Antp* dans le pouch du disque imaginal d'aile, ce système repose souvent sur des allèles induisant l'expression de transgènes en utilisant des séquences régulatrices elles-mêmes potentiellement en aval de *Antp*. Une meilleure alternative serait de pouvoir utiliser une lignée Gal4 dont le profil d'expression serait indépendant de *Antp*. L'utilisation de clones mutants reste probablement la meilleure alternative. Cette approche a d'ailleurs été employée par Gary Struhl en 1982 et lui a permis de révéler des défauts de morphologie des poils sensitifs de l'aile au niveau de clones *Antp*, induits à l'aide de rayons X, ce que nous avons également pu constater lors de nos propres expériences de perte de fonction de *Antp*. Il a cependant aussi noté que les clones *Antp* étaient rares et de petite taille, suggérant un effet de compétition avec les cellules sauvages alentour, au cours duquel les cellules mutantes se divisant moins rapidement sont éliminées. Donner un avantage sélectif aux clones à l'aide de mutations Minutes, touchant un gène codant pour une protéine ribosomique, et ayant pour conséquence d'augmenter la vitesse de division cellulaire, permet de compenser ce phénomène de compétition clonale et d'observer plus facilement des clones mutants de taille conséquente (Moreno, Basler, et Morata 2002 ; Blair 2003). Nous avons également tenté d'utiliser cette méthode pour provoquer la perte de fonction de *Antp* dans l'aile, malheureusement sans succès, à l'aide d'un allèle *heat-shock-Gal4* et du système de recombinaison FLP/FRT.

4. Dose des protéines Hox et spécification des appendices de vol chez la drosophile

Les profils d'expression des gènes Hox *Antp* et *Ubx*, respectivement dans les disques imaginaux d'aile et d'haltère, sont très différents. Au dernier stade larvaire, *Antp* est présent en très faible quantité dans le pouch du disque d'aile, tandis que *Ubx* est présent en forte quantité dans celui du disque d'haltère. Nous avons utilisé des lignées de drosophiles chez lesquelles les protéines endogènes *Antp* ou *Ubx* sont fusionnées avec des protéines fluorescentes pouvant être reconnues par un même anticorps anti-GFP. Cet anticorps présentant la même affinité pour les deux protéines de fusion endogènes, nous avons pu l'employer pour comparer la dose de *Ubx* dans le pouch du disque d'haltère avec la dose de *Antp* dans le pouch du disque d'aile par immunomarquage. Nous avons conclu que la dose de *Ubx* dans le pouch du disque d'haltère était dix fois plus importante que la dose de *Antp* dans le pouch du disque d'aile. Afin d'étudier le rôle de la différence de dosage de ces deux protéines Hox, nous avons graduellement augmenté la dose de *Antp* dans le disque d'aile à l'aide du système UAS-Gal4, ce qui provoque une diminution graduelle de la taille des ailes. À partir d'une augmentation de 450 % de la dose de *Antp*, on observe l'apparition de caractéristiques spécifiques de l'haltère, telles que la réorganisation des trichomes, et une morphologie plus sphérique. Cela suggère que, passé un certain seuil de dose de *Antp*, l'identité de l'appendice de vol passe de « aile » à « haltère ». Cette fonction est similaire à celle de *Ubx*, dont la présence ectopique dans le primordium d'aile induit le développement d'un haltère (Pavlopoulos et Akam 2011). La diminution de la dose de *Ubx* (par interférence ARN ou combinaison d'allèles mutants) provoque une augmentation graduelle de la taille de l'organe. À partir d'une diminution de plus de 60 % de la dose de *Ubx*, des traits caractéristiques de l'aile apparaissent, tels qu'une organisation des trichomes similaires à celle trouvée sur une aile sauvage et l'aplatissement de l'organe.

Ces résultats suggèrent que les deux protéines *Ubx* et *Antp* présentent la même fonction de promouvoir le développement de l'haltère à forte dose, et celui de l'aile à faible dose. Afin de tester davantage la capacité de *Antp* à spécifier l'haltère, nous avons effectué des expériences de sauvetage de *Ubx* en exprimant artificiellement différentes protéines Hox en contexte mutant *UbxGal4^{LDN}/abxpbxbx*, provoquant la transformation des haltères en ailes. Dans ce contexte, une forte dose de *Ubx* permet la formation d'haltères présentant une morphologie sauvage. En accord avec nos données précédentes, *Antp* permet également le sauvetage de l'haltère. Le même résultat est obtenu avec *AbdA*, comme cela avait déjà été évoqué dans la littérature (Casares et al. 1996). En revanche, *Dfd* ne permet pas ce sauvetage, ce qui montre que la formation de l'haltère n'est pas une fonction générale partagée par toutes les protéines Hox (**Figure 11**). Cela montre que les protéines *Ubx* et *Antp* possèdent toutes deux la fonction d'orchestrer le développement des haltères et des ailes, et que la dose à laquelle ces protéines se trouvent dans les disques imaginaux détermine lequel de ces deux organes va effectivement se former.

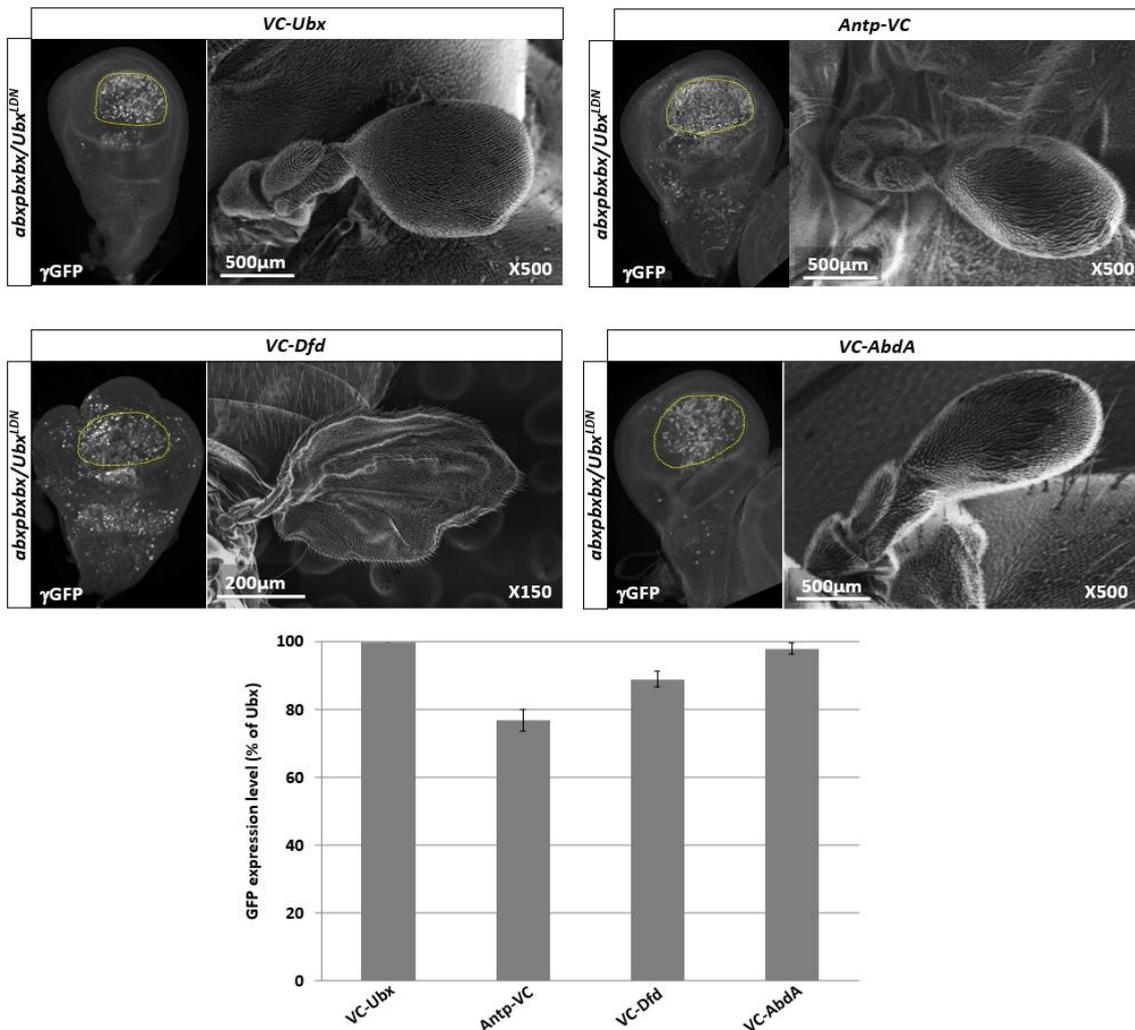


Figure 11 : Une forte dose de Antp et AbdA permet de sauver le développement de l'haltère chez la drosophile. En contexte mutant *UbxGal4^{LDN}/abxpbbx*, provoquant une perte d'expression de *Ubx* qui induit la transformation des haltères en ailes, il est possible de sauver la formation de ces organes à l'aide d'une forte dose de Ubx, Antp ou AbdA. D'autres protéines Hox, comme Dfd, ne possèdent pas cette fonction. La dose de protéine Hox produite à l'aide du système UAS/Gal4 lors des expériences de sauvetage est mesurée par la quantification du signal fluorescent émis lors d'immunomarquages utilisant un anticorps anti-GFP, reconnaissant les étiquettes VC fusionnées aux différentes protéines Hox utilisées.

En complément, une expérience intéressante aurait été de pouvoir effectuer l'expérience inverse, à savoir un sauvetage du développement de l'aile par ces différentes protéines Hox, notamment par Ubx. Cependant nous ne disposons pas des outils génétiques nécessaires, ni de lignée Gal4 reproduisant le profil d'expression faible *Antp* dans le pouch du disque imaginal d'aile.

5. Vers une fonction plus générale et encore peu étudiée de la dose des protéines Hox pour leurs fonctions de spécification

Cette forte dose de Ubx dans le disque imaginal d'haltère, le fait que même une perte de plus de 40 % de la dose de Ubx provoquée par l'allèle *abxpbxbx* ne provoque pas de modification drastique de la morphologie de l'haltère, et la forte dose de Antp et AbdA requise pour sauver la perte de Ubx, sont cohérents avec la stabilité du programme développemental de l'haltère observé lors de notre crible par interférence ARN. Cette forte dose est également cohérente avec l'idée de l'emploi de sites de faible affinité par les protéines Hox nécessaires pour réguler de nombreux gènes cibles au cours du développement de l'haltère, comme l'ont montré les expériences de ChIP-seq de Ubx dans le disque imaginal d'haltère, et la dissection des enhancers des gènes *CG13222* et *vestigial*. Ces enhancers contiennent en effet plusieurs motifs reconnus par Ubx, dont certains diffèrent des motifs canoniques et de forte affinité pour les protéines Hox.

De nombreux enhancers de gènes impliqués dans le développement de la drosophile, et de cibles de protéines Hox présentent de multiples motifs de liaison par un même facteur de transcription (Papatsenko et al. 2002 ; Lifanov et al. 2003 ; Ochoa-Espinosa et al. 2005). Ce type d'enhancers contenant des répétitions de motifs liés par un même FT est appelé « complexe homotypique de sites de liaisons de FT » (« Homotypic Cluster of Transcription Factor Binding Site », ou HCT). Il sont également retrouvés au niveau d'enhancers de nombreux organismes, des drosophiles aux vertébrés, suggérant que les mécanismes de régulation génétique reposant sur ce type d'enhancers est très conservé (Gotea et al. 2010). Cependant, la fonction de ces types d'enhancers est rarement comprise. Le morphogène Bicoid (Bcd) est un excellent exemple permettant de mieux comprendre la fonction de ce type d'enhancers. Bcd est capable d'activer ces gènes cibles lorsqu'il est présent à une dose bien spécifique (Struhl, Struhl, et Macdonald 1989). Les gènes cibles contrôlés par des enhancers présentant une forte affinité pour Bcd, comme le gène *Hunchback (Hb)* sont activés par des doses faibles de Bcd, tandis que des gènes dont les enhancers présentent une faible affinité pour Bcd ne seront activés que dans les cellules exposées à de fortes concentrations de Bcd (Driever, Thoma, et Nüsslein-Volhard 1989 ; Struhl et al. 1989). De telles réponses dose-dépendantes dues à l'accumulation de sites de faible affinité pour un FT au niveau des enhancers de gènes cibles peuvent également déterminer le sens de la régulation : activation ou répression (Ramos et Barolo 2013). Comme discuté précédemment, les protéines Hox sont aussi décrites pour acquérir parfois leur spécificité fonctionnelle de ce même type d'enhancers. C'est le cas lors de la régulation de *svb* par Ubx chez la drosophile (Crocker et al. 2015).

Dans le contexte du développement de l'haltère, l'utilisation d'enhancers contenant des sites de faible affinité (comme les sites ATTTA) par les protéines Hox pourrait donc être un mécanisme permettant la régulation de gènes de manière dose-spécifique. Cela pourrait permettre aux protéines Hox possédant des homéodomains très similaires que sont Ubx,

Antp et AbdA de promouvoir le développement des haltères si elles sont présentes à forte dose. Cependant, contrairement à ce qui peut être observé au niveau de gènes cibles de Bicoid, passant soudainement d'un état actif à inactif en fonction de la dose de Bicoid, les gènes réprimés par Ubx semblent l'être progressivement, suivant la dose de Ubx (**Figure 12**). En effet, on constate que si l'apparition de traits caractéristiques d'une transformation de l'haltère en aile apparaissent soudainement une fois que la dose de Ubx diminue en deçà d'un certain seuil, d'autres traits tels que la taille et la morphologie globale de l'organe semblent suivre la variation de la dose de Ubx. Ce type d'effet progressif de FT sur l'activité de gènes cibles peut aussi être médié par des HCT. Ces régulations sont notamment à l'œuvre au niveau de cibles de NF-κB. L'accumulation de sites de forte affinité « non-coopératifs » reconnaissables par NF-κB au niveau de la région promotrice de *NFKBIA* permet une réponse adaptée aux différentes concentrations de NF-κB (Giorgetti et al. 2010).

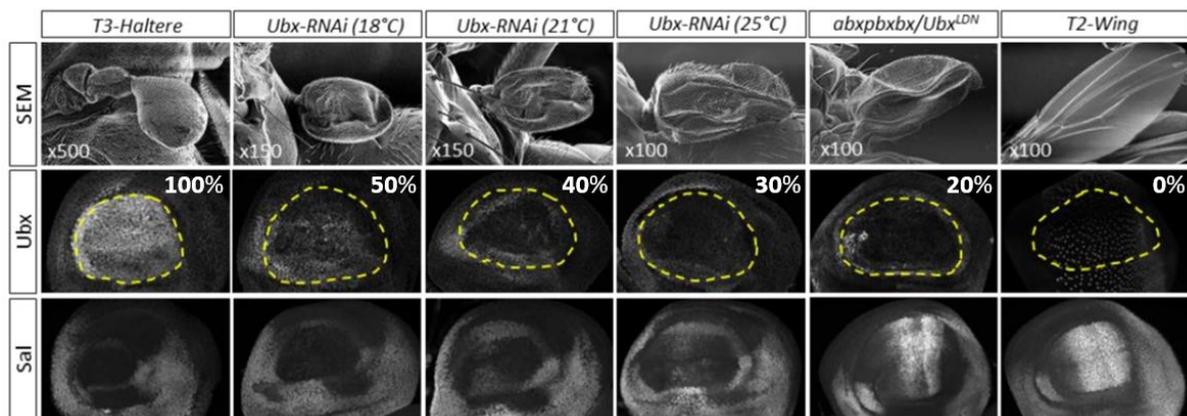


Figure 12 : Corrélation entre la diminution progressive de la dose de Ubx et la dé-répression du gène *spalt* (*sal*) en aval dans le pouch du disque d'haltère. La dose de Ubx dans le pouch du disque imaginal d'haltère est diminuée par interférence ARN ou combinaison d'allèles mutants. Une image de microscopie électronique à balayage illustre le phénotype provoqué par ces différentes diminutions de la dose de Ubx. Pour chaque condition, un immunomarquage permet de quantifier la dose de Ubx, exprimée en pourcentages. On observe qu'une diminution de 50 % de la dose de Ubx suffit à induire une augmentation subtile du niveau d'expression de *spalt*. Plus la dose de Ubx diminue, plus on observe une forte localisation de Spalt dans le pouch du disque d'haltère, caractéristique du développement de l'aile. Cela suggère qu'une forte dose de Ubx est nécessaire dans le disque imaginal d'haltère pour réprimer efficacement les effecteurs spécifiques du développement de l'aile.

Ce type d'effet de régulation très progressif dû à l'accumulation de sites reconnus par un même FT ressemble à l'effet additif des sites de liaison monomériques pour les protéines Hox retrouvés au niveau de l'enhancer de *Spalt*, médiant chacun un effet faible sur l'expression du gène (Galant et al. 2002). Cet enhancer contient sept sites TAAT permettant la liaison de Ubx. Chacun de ces sites contribue en partie à la répression de *Spalt* médié par Ubx mais est insuffisant pour sa répression totale. Ce type de sites canoniques peuvent théoriquement être utilisés de manière dose-dépendante par d'autres protéines Hox comme Scr, Antp et Ubx, ce

qui explique que ces trois protéines puissent réprimer le développement des ailes. Les motifs non-canoniques, en revanche, comme le motif ATTTA identifié en ChIP-seq, nécessitent probablement un HD plus similaire à celui de Ubx pour permettre la spécification de l'haltère, expliquant pourquoi seules Antp et AbdA sont capables de promouvoir le développement de cet organe. En effet, les séquences des HD de AbdA et Antp varient respectivement de seulement 4 et 6 aas par rapport à celle de l'HD de Ubx, tandis l'HD de Dfd diffère par exemple de 16 aas.

6. Le rôle de Homothorax lors du développement des appendices de vol chez la drosophile

Suite à l'observation du phénotype drastique induit par la perte de fonction de *Hth* lors de notre crible fonctionnel par interférence ARN, nous avons étudié plus en détail la fonction de cette protéine lors du développement des haltères. Nous avons en effet observé une transformation en aile des parties proximales du capitellum de l'haltère lors de la perte de fonction de *Hth* par RNAi, caractérisée par l'apparition de poils sensitifs ectopiques. Cela reproduit bien le résultat obtenu par Agrawal et al. en 2011. Cependant, nous avons alors noté que cela provoquait une dé-répression de *Ubx* au niveau du territoire présomptif de cette zone de l'haltère. Cette observation a été confirmée par une étude montrant que le profil d'expression particulier de *Ubx* dans le disque imaginal d'haltère, permettant la présence d'une faible dose de Ubx au niveau des territoires présomptifs des parties proximales de l'haltère, mais d'une forte dose dans le pouch, était dû à une auto-régulation de *Ubx* nécessitant Hth et Exd comme cofacteurs (Delker et al. 2019). Hth étant présent uniquement à la périphérie du pouch, c'est dans ces territoires que les complexes Ubx/Hth/Exd peuvent réprimer partiellement *Ubx* via des sites de faible affinité. L'expression de *Hth* et *Exd* n'est en revanche pas contrôlée par Ubx (Delker et al. 2019), ce qui est cohérent avec nos propres données (**Figure 13**). Cet effet de répression de *Ubx* médié par Hth explique pourquoi les territoires où Hth est présent, et où Ubx se trouve en forte dose sont si complémentaires. Cependant, l'effet phénotypique de cette dé-répression est ici en contradiction avec l'augmentation de la dose de Ubx, censée réprimer davantage l'apparition de structures spécifiques de l'aile. De plus, la combinaison de l'allèle *abxpbxbx* avec la perte de fonction de *Hth* provoque une transformation drastique de l'ensemble du capitellum de l'haltère, présentant alors de nombreux poils ectopiques disposés en formant une marge, et de morphologie plus grande et plate. À l'inverse, l'activation ectopique de *Hth* dans le pouch du disque d'haltère provoque bien la diminution de la dose de Ubx jusqu'à un niveau similaire à celui observé en périphérie du pouch, mais cela provoque la diminution de la taille de l'haltère. Cela peut être dû à la réduction de la taille du pouch en lien avec celle du territoire où Ubx est présent en forte dose, diminuant la taille du capitellum. Mais cela peut aussi suggérer une plus grande activité de Ubx pour spécifier l'haltère malgré sa dose réduite, Hth favorisant la capacité de Ubx à se lier à des sites de faible affinité au sein de micro-environnements riches en cofacteurs dans le noyau (Tsai et al. 2017). Les phénotypes provoqués par la perte et le gain de fonction de *Hth* suggèrent cependant aussi un rôle de cofacteur de Ubx, malgré son

rôle simultané de répresseur. L'analyse de données de ChIP-seq de Hth et de Ubx au niveau de l'haltère montre que Ubx et Hth se lient *in vivo* au niveau de nombreux gènes cibles, suggérant encore la coopération entre Hth et Ubx lors de régulations génétiques au cours du développement de l'haltère (Choo et al. 2011). Cela souligne la dualité des relations épistatiques entre des gènes pouvant potentiellement agir simultanément à des niveaux hiérarchiques différents, et coopérer avec leurs propres cibles. Tout cela suggère que Hth pourrait aussi être nécessaire à Ubx pour spécifier les structures de l'haltère, que ce soit en périphérie où Ubx est présent à faible dose, ou dans le capitellum. Cependant la colocalisation de Hth avec Ubx dans le pouch, même aux stades de développement plus précoces n'est pas évidente.

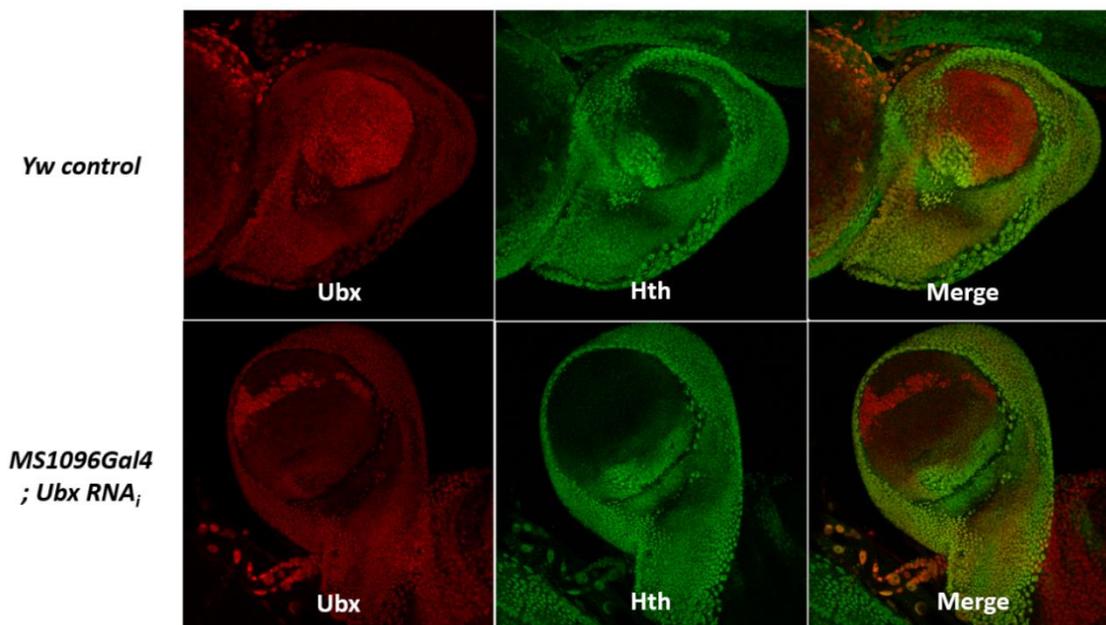


Figure 13 : Analyse complémentaire de l'épistasie entre *Ubx* et *Hth*. Lors de la perte de fonction de *Ubx* au niveau du pouch du disque imaginal d'haltère par interférence ARN, le profil d'expression de *Hth* reste principalement à la périphérie du pouch et au niveau de la partie proximo-dorsale du pouch, comme ce qui est observé au niveau d'un disque imaginal sauvage. Cela suggère que *Ubx* ne réprime pas *Hth* dans le pouch du disque d'haltère.

Dans le disque imaginal d'aile, le profil d'expression de *Hth* est très analogue à celui observé dans le disque d'haltère. En revanche, si *Ubx* présentait une localisation complémentaire avec *Hth* dans le disque imaginal d'haltère, *Antp* présente une localisation très complémentaire avec *Hth*. Nous avons alors émis l'hypothèse que *Hth* pouvait être un activateur de *Antp* dans le disque d'aile. La perte de fonction de *Hth* provoque effectivement la perte de l'activation de *Antp* dans le disque d'aile, ce qui induit une malformation des ailes (**Figure 14A**). L'activation ectopique de *Hth* dans le pouch cause l'activation de *Antp*, ce qui induit le développement d'ailes réduites et présentant des signes de transformation en haltère (**Figure 14B**). Cela montre que *Hth* est nécessaire et suffisant pour l'activation de *Antp* dans le disque imaginal d'aile.

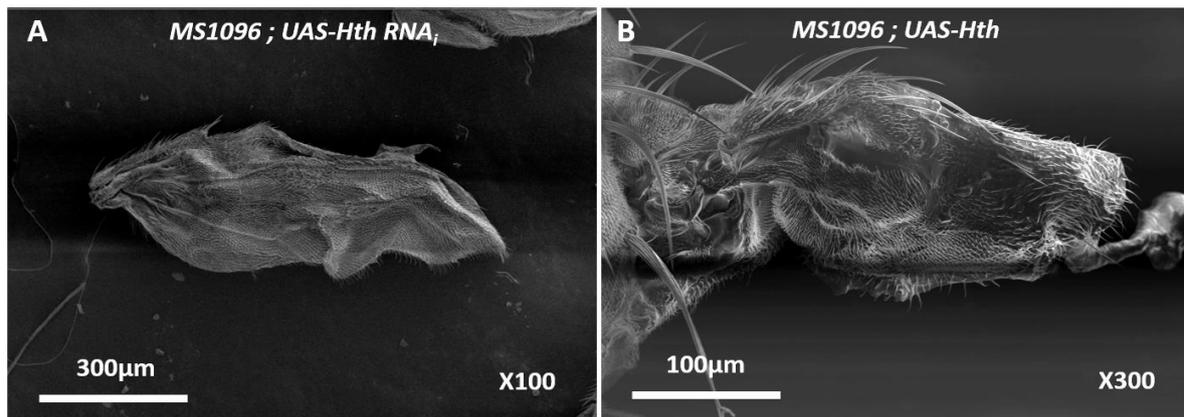


Figure 14 : Effet de la perte et du gain de fonction de Hth sur la morphologie de l'aile chez la drosophile. A : La perte de fonction de *Hth* par interférence ARN provoque une diminution de la taille de l'aile ainsi que sa malformation. Cela est probablement dû à la perte de fonction de *Antp* que cela induit (voir Paul et al.). **B :** Le gain de fonction de *Hth* dans le disque imaginal d'aile provoque une transformation de l'aile en haltère, caractérisée par la diminution de la taille de l'organe et sa morphologie plus sphérique. Cela est probablement dû à l'activation de *Antp*, augmentant la dose de protéines Hox dans le disque imaginal d'aile (voir Paul et al.).

Hth joue donc un rôle d'activateur de *Antp* dans le disque imaginal d'aile, et de répresseur de *Ubx* dans le disque imaginal d'haltère. Cette stratégie moléculaire utilisant un même régulateur exprimé selon un profil très similaire dans les primordia de deux organes homologues permet de réguler de manière opposée l'expression de deux gènes, et donc d'établir des profils et des niveaux d'activités opposés de ces deux gènes. *Hth* permet donc d'établir des doses différentes de deux protéines Hox, fonctionnellement très similaires à doses équivalentes, dans deux organes homologues en série. *Hth* serait donc le sélecteur permettant de définir lequel des deux organes, aile ou haltère, se forme chez la drosophile.

7. Rôle de *Antp* et *Ubx* lors de la formation des appendices de vol chez les insectes

Les principaux mécanismes du développement des ailes chez les insectes ont été largement étudiés chez la mouche drosophile. Cependant il était établi que la formation de leurs ailes était indépendante des gènes Hox. Nos données viennent contredire ce paradigme, proposant que les gènes Hox *Antp* et *Ubx* sont essentiels pour la formation des deux appendices de vol chez la drosophile, respectivement les haltères et les ailes. Nos données suggèrent également que la dose de ces deux protéines Hox oriente le développement de l'appendice vers l'un ou l'autre des destins. Le rôle de *Ubx* lors du développement d'appendices de vol a été très étudié au sein de divers embranchements des insectes, comme les coléoptères (Tomoyasu et al. 2005) les papillons (Weatherbee et al. 1999). Chez le fulgore, il a même été montré que *Ubx* régule la taille des ailes d'une manière dépendante de sa dose (Fu et al. 2020). Cependant, chez certaines espèces le rôle de *Antp* a également été documenté. C'est le cas chez certains papillons, où *Antp* est nécessaire pour réguler la pigmentation des ailes (Saenko, Marialva, et Beldade 2011).

Chez les insectes, l'expression de *Ubx* n'est pas systématiquement limitée au troisième segment thoracique comme chez la drosophile. Il est actif au niveau des primordia d'ailes postérieures mais aussi antérieures de *Apis mellifera* (Prasad et al. 2016). Cependant cette même étude montre que *Ubx* ne s'exprime que dans les primordia des ailes postérieures du papillon *Bombyx mori*, et pas dans ceux des ailes antérieures. En dehors de l'homéodomaine, les séquences des orthologues de *Ubx* et des autres espèces d'insectes peuvent être très différentes, cependant nos expériences de sauvetages montrent que ces différentes protéines peuvent sauver le développement de l'haltère de drosophile (**Figure 15**). L'orthologue de *Antp* issu du coléoptère *Tribolium castaneum* (*TcAntp*) parvient également à sauver le développement de l'haltère, de manière moins performante que *TcUbx* cependant, suggérant que si ces protéines partagent une certaine capacité à spécifier le développement de l'haltère, *Ubx* est davantage spécialisé dans cette fonction (**Figure 15**). Les orthologues de *Ubx* issus d'autres espèces d'insectes n'appartenant pas à l'ordre des diptères, comme *Aquarius remigis* (hémiptère) ou *Bombyx mori* (lépidoptère), présentent également la capacité de sauver la perte de fonction de *Ubx* (**Figure 15**). Le fait que ces différents orthologues de *Ubx* puissent spécifier différents organes selon le contexte développemental dans lesquels ils se trouvent suggère que leur fonction au sein de leurs espèces respectives diffère principalement à cause de facteurs extrinsèques à la protéine *Ubx* elle-même, à savoir les cofacteurs disponibles et/ou les séquences cis-régulatrices des gènes cibles.

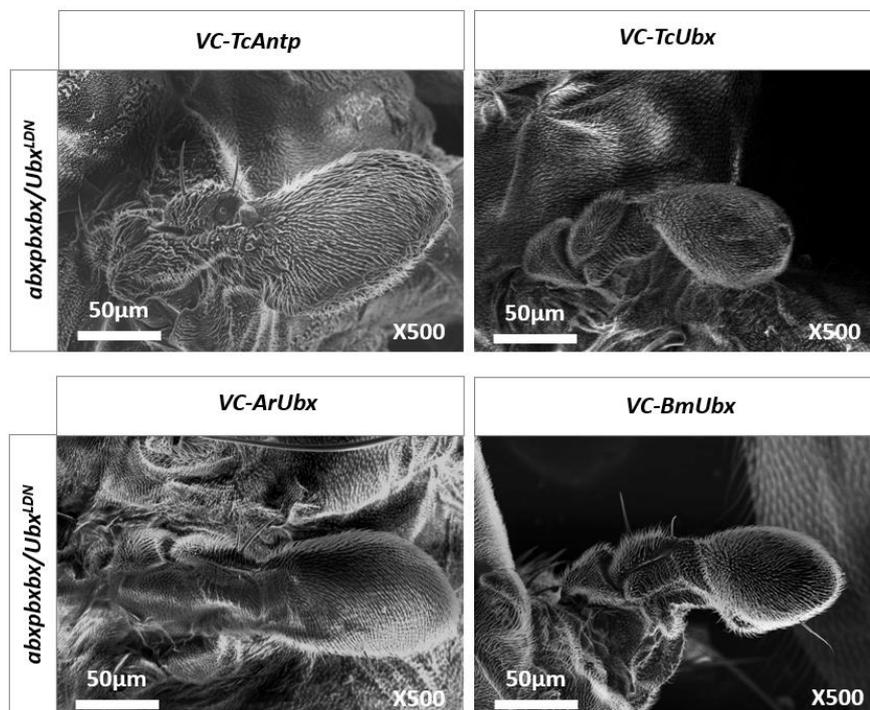


Figure 15 : Les orthologues de *Antp* et *Ubx* issus d'insectes étrangers à l'ordre des diptères peuvent sauver la perte de fonction de *Ubx* lors du développement de l'haltère. Les clichés de microscopie électronique à balayage présentent les sauvetages du développement de l'haltère chez la drosophile en contexte mutant *UbxGal4^{LDN}/abxpbxbx*. Les protéines Hox issues d'autres espèces sont fusionnées au fragment C-terminal de la protéine fluorescente Venus. Toutes ces protéines provoquent un sauvetage du développement des haltères, bien qu'elles proviennent d'espèces ne possédant pas d'haltères : *Tribolium castaneum* (Tc), *Aquarius remigis* (Ar), et *Bombyx mori* (Bm).

Ces données suggèrent une similarité fonctionnelle des protéines Hox *Antp* et *Ubx* mais aussi un rôle essentiel de leur dosage lors du développement des appendices de vol chez la drosophile. Nous avons alors cherché à savoir si l'importance du profil d'expression des protéines Hox était conservée chez d'autres espèces d'insectes. Si la grande différence de concentration des protéines Hox est nécessaire au développement d'appendices très différents chez les diptères, on peut supposer que le développement de deux paires d'appendices très similaires chez d'autres espèces ne repose pas sur des différences de dosage marquées entre les primordia d'appendices antérieurs et postérieurs. Pour cela, nous avons effectué des immunomarquages de *Ubx* et *Antp* dans les primordia d'appendices de vol antérieurs et postérieurs de l'odonate *Ischnura elegans*, chez l'hyménoptère *Apis mellifera*, et le lépidoptère *Bombyx mori*. Nous avons accompagné ces marquages de mesures du niveau d'expression de *Ubx* et *Antp* au sein des primordia de ces différents animaux par PCR quantitative, ainsi que de mesures de la taille des appendices de vol chez ces différentes espèces. Les odonates possèdent la morphologie la plus ancestrale parmi ces différents ordres d'insectes, et présentent deux paires d'ailes très similaires au niveau des segments T2 et T3, la paire d'aile postérieure mesurant 0,89 fois la surface de la paire d'aile antérieure. *Ubx* et *Antp* sont exprimés dans ces deux appendices, et la dose globale de protéine Hox est très similaire entre ces deux organes, ce qui est cohérent avec le modèle que nous proposons. L'abeille *Apis mellifera* présente quant à elle une paire d'ailes postérieures environ deux fois plus petites que l'aile antérieure, et présente une plus forte dose globale de protéine Hox dans les primordia des ailes postérieures, environ deux fois supérieure à la dose retrouvée dans les primordia des ailes antérieures. Cela suggère un rôle des protéines Hox dans la réduction de la taille des ailes, analogue à ce que nous avons pu observer chez la drosophile lors de l'augmentation artificielle de la dose de *Antp* dans le disque imaginal d'aile. Chez le papillon *Bombyx mori* en revanche, les deux paires d'ailes ont une surface très similaire, bien que de morphologies assez différentes, et *Antp* est exprimé de manière similaire dans les primordia des deux paires d'appendices. Cependant *Ubx* semble exprimé principalement dans les primordia des ailes postérieures. Cela suggère un rôle de *Antp* dans la formation des ailes, mais potentiellement un rôle de *Ubx* nécessaire pour établir la différence de morphologie entre les ailes antérieures et postérieures. Tous ces résultats montrent une expression de *Antp* dans les primordia d'ailes, appuyant encore l'idée d'un rôle conservé dans la formation des ailes. La dose globale de protéines Hox semble également être un déterminant de la différence entre ailes antérieures et ailes postérieures. Cela suggère que la variation de la dose de protéines Hox ait pu être un mécanisme de diversification et d'innovation morphologique au cours de l'évolution. *Ubx* et *Antp* semblant être fonctionnellement similaires, c'est la dose globale de protéine Hox plutôt que la contribution spécifique de chaque protéine Hox qui pourrait être essentielle dans ce phénomène. Disposer de deux gènes fonctionnellement similaires pouvant être régulé différemment entre deux organes homologues en série peut donc être un moyen d'établir des doses de protéines Hox de manière très ciblée et spécifique, comme nous avons pu l'observer par le biais de la régulation de *Antp* et *Ubx* par *Hth* chez la drosophile.

Il serait intéressant de disposer de données similaires chez les strepsiptères, une espèce énigmatique mentionnée dans l'introduction, ayant développé indépendamment des haltères au cours de l'évolution, mais au niveau du second segment thoracique contrairement aux diptères. Malgré la grande difficulté que présente l'obtention d'individus à partir de collectes saisonnières, nous avons pu réaliser des marquages pour Antp et Ubx au niveau des primordia des quelques spécimens que nous avons pu extraire de guêpes parasitées par ces insectes entomophages (**Figure 16**). Cependant malgré l'observation de marquage montrant la présence de Ubx et Antp dans les primordia d'haltères et d'ailes, nous manquons de marquages de bonne qualité pour pouvoir conclure avec confiance quant à la différence de dose de ces protéines respectives dans ces différents organes. Si notre modèle s'avère exact et transposable aux appendices de vol de la plupart des insectes, nous nous attendons à observer une plus forte dose de protéines Hox, principalement due à Antp, dans les primordia d'haltères dans le segment T2, par rapport à la dose présente dans les primordia d'ailes dans le segment T3.

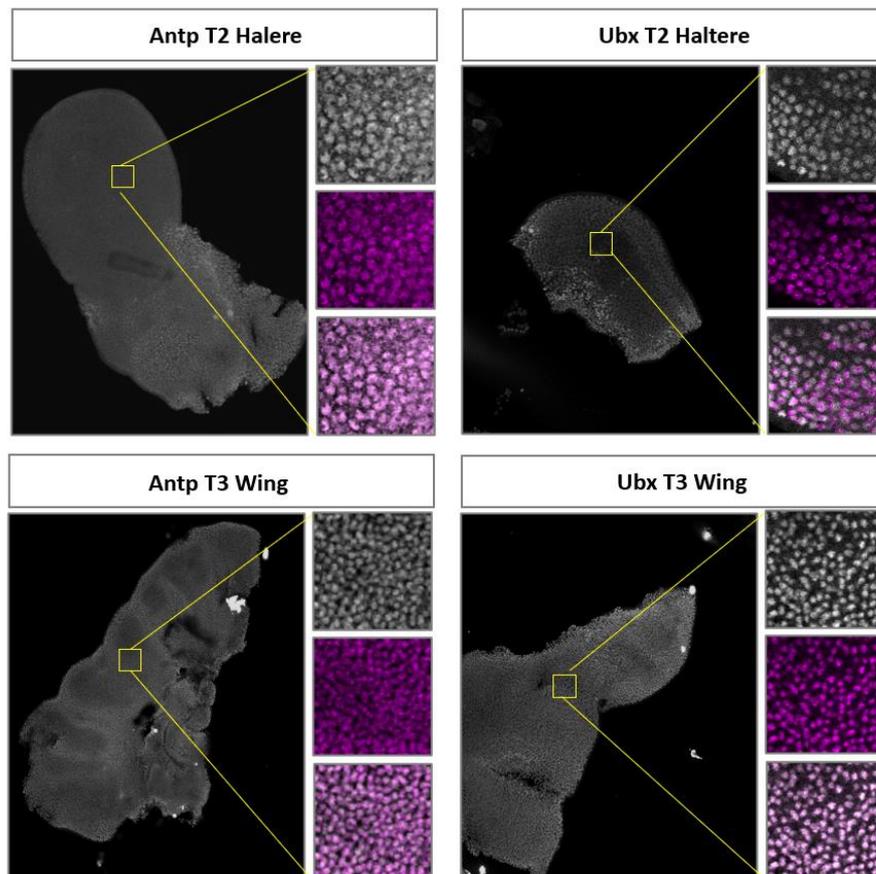


Figure 16 : Immunomarkage de Antp et Ubx dans les primordia d'altère et d'aile de Strepsiptère. Les protéines Hox Antp et Ubx sont marquées en gris, le DAPI apparaît en violet. Les primordia d'altère au niveau du second segment thoracique (T2) et d'aile au niveau du troisième segment thoracique (T3) présentent un marquage nucléaire de Ubx et Antp. Les deux protéines semblent être exprimées dans les primordia des deux organes. Il reste à savoir si la dose globale de protéines Hox varie entre les primordia des deux organes.

Si le rôle de la dose des protéines Hox lors du développement des appendices de vol repose sur l'usage ou non de sites de faible affinité au niveau des séquences cis-régulatrices de gènes cibles, il reste à savoir si les variations de la dose des protéines Hox est une cause directe de la diversification morphologique entre les appendices de vol présents chez une espèce donnée, ou bien si cette variation de la dose suit l'évolution des séquences cis-régulatrices des gènes en aval s'enrichissant progressivement en sites de faible affinité au cours de l'évolution, rendant la morphologie des appendices de vol plus sensibles à une variation de dose des protéines Hox. Un tel phénomène rappellerait ce qui est observable au niveau de l'évolution de la pigmentation des mâles de différentes espèces de drosophiles, parfois devenue insensible à la régulation par les protéines Hox en raison des changements au niveau des séquences régulatrices des gènes en aval (Liu et al. 2019). Pour le savoir, il serait intéressant de pouvoir faire varier la dose de protéines Hox au sein d'une espèce possédant des appendices de vol très similaires, et dont la spécification pourrait ne pas reposer sur la reconnaissance de sites de faible affinité.

Chapitre IV : Annexes

Identification de cofacteurs interagissant avec Ubx lors du développement des haltères par une approche basée sur la technique de BioID

Notre approche pour identifier des cofacteurs nécessaires à Ubx lors du développement de l'haltère est basée sur la combinaison de deux méthodes. La première, détaillée dans la section « Résultats », consiste en un crible fonctionnel par interférence ARN. De ce crible sont censés ressortir les candidats ayant une fonction au cours du développement de l'haltère. Cependant, cette approche souffre de deux limites : elle ne permet pas de savoir si le candidat interagit physiquement avec Ubx, et les candidats sont choisis *a priori*. C'est la raison pour laquelle nous avons décidé d'adapter la méthode de BioID au contexte du développement de l'haltère (Roux et al. 2012). Cette méthode permet d'identifier les protéines se localisant dans un rayon de 40nm autour de notre protéine d'intérêt, sans *a priori* (Kim et al. 2014). Confronter les résultats de ces deux approches indépendantes serait un excellent moyen de révéler les candidats les plus susceptibles d'être de réels cofacteurs de Ubx.

Nous avons généré des lignées transgéniques afin d'utiliser le système UAS/Gal4 pour produire la protéine Ubx fusionnée à l'enzyme BirA*. Une étiquette -HA joue le rôle de jonction entre Ubx et l'enzyme. Nous pouvons donc exprimer cette protéine de fusion au sein des disques imaginaux d'haltère de la drosophile, puis purifier les protéines biotinylées à partir de lysats de ces tissus. Cette fraction de protéine purifiée devrait être enrichie en interacteurs de Ubx. Afin de nous assurer que la fraction des protéines purifiées contienne de réels interacteurs utilisés par Ubx pour réguler ces gènes cibles, nous exprimons *BirA*-HA-Ubx* en contexte mutant de Ubx, afin que la protéine de fusion soit nécessaire pour le sauvetage de l'haltère, en absence de la protéine Ubx endogène. Pour cela nous associons deux allèles hypomorphes de Ubx ; l'allèle *abxpbx*, et l'allèle *UbxGal4^{LDN}*. Cela provoque une transformation de l'haltère en aile. On observe également que dans ce contexte, le disque imaginal d'haltère contient peu de protéines biotinylées (**Figure 1A**). La présence de l'allèle *UbxGal4^{LDN}* permet également d'activer des transgènes en reproduisant le profil d'expression normal de Ubx dans le disque imaginal d'haltère. Combiné au transgène *UAS-BirA*-HA-Ubx*, on observe que le niveau d'activation du système UAS/Gal4 doit être élevé, en plaçant les croisements à 29°C, afin de réaliser la BioID de manière optimale. En effet, à cette température on observe une forte dose du transgène *BirA*-HA-Ubx* dans le disque imaginal d'haltère, qui coïncide avec une forte biotinylation de protéines, et provoque un sauvetage du développement de l'haltère (**Figure 1B**). Exprimé à l'aide de *nabGal4*, *BirA*-HA-Ubx* provoque une diminution de la taille des ailes, ce qui confirme le fait que cette protéine fonctionne de manière similaire à Ubx (**Figure supplémentaire 1**). En revanche, à moins forte température, la dose de protéine de fusion produite dans le primordium d'haltère est plus faible, la biotinylation de protéines est très faible, et le sauvetage du développement de l'haltère est de moins bonne qualité (**Figure 1C**). Afin de différencier les partenaires de Ubx spécifiquement

impliqués dans la formation de l’haltère du bruit de fond des protéines biotinylées par l’enzyme BirA* dans le noyau, ainsi que des protéines pouvant interagir avec les protéines Hox sans que cela ne soit lié à leur capacité à orchestrer le développement de l’haltère, nous pouvons utiliser la fusion de BirA* avec Dfd. Cette protéine de fusion présente également une activité de biotinylation, mais ne parvient pas à sauver le développement de l’haltère (**Figure 1D**).

Cependant, les partenaires nécessaires à Ubx pour la formation de l’haltère peuvent aussi avoir la capacité d’interagir avec Dfd sans pour autant permettre à Dfd de sauver le développement de l’haltère. En effet, l’incapacité de Dfd à orchestrer le développement de l’haltère peut provenir de l’incapacité à interagir avec certains, mais pas tous, les cofacteurs nécessaires, mais aussi de subtiles différences au niveau de l’homéodomaine rendant par exemple Dfd incapable de se lier à des motifs de faible affinité au niveau de séquences cis-régulatrices de gènes cibles. Des cofacteurs nécessaires à Ubx peuvent donc également se trouver dans l’interactome de Dfd bien que cette protéine ne puisse pas sauver le développement de l’haltère. Afin de simplement discriminer le bruit de fond de la BirA* dans le noyau des cellules du disque imaginal d’haltère, nous pouvons également utiliser comme contrôle l’enzyme BirA* fusionnée à un signal de localisation nucléaire (« Nuclear Localisation Signal », ou NLS). Enfin, il pourrait être intéressant d’étudier l’interactome d’autres protéines capables de sauver le développement de l’haltère, comme Antp ou AbdA à dose équivalente dans ce contexte : ces protéines Hox différentes utilisent-elles les mêmes cofacteurs pour médier la même fonction ?

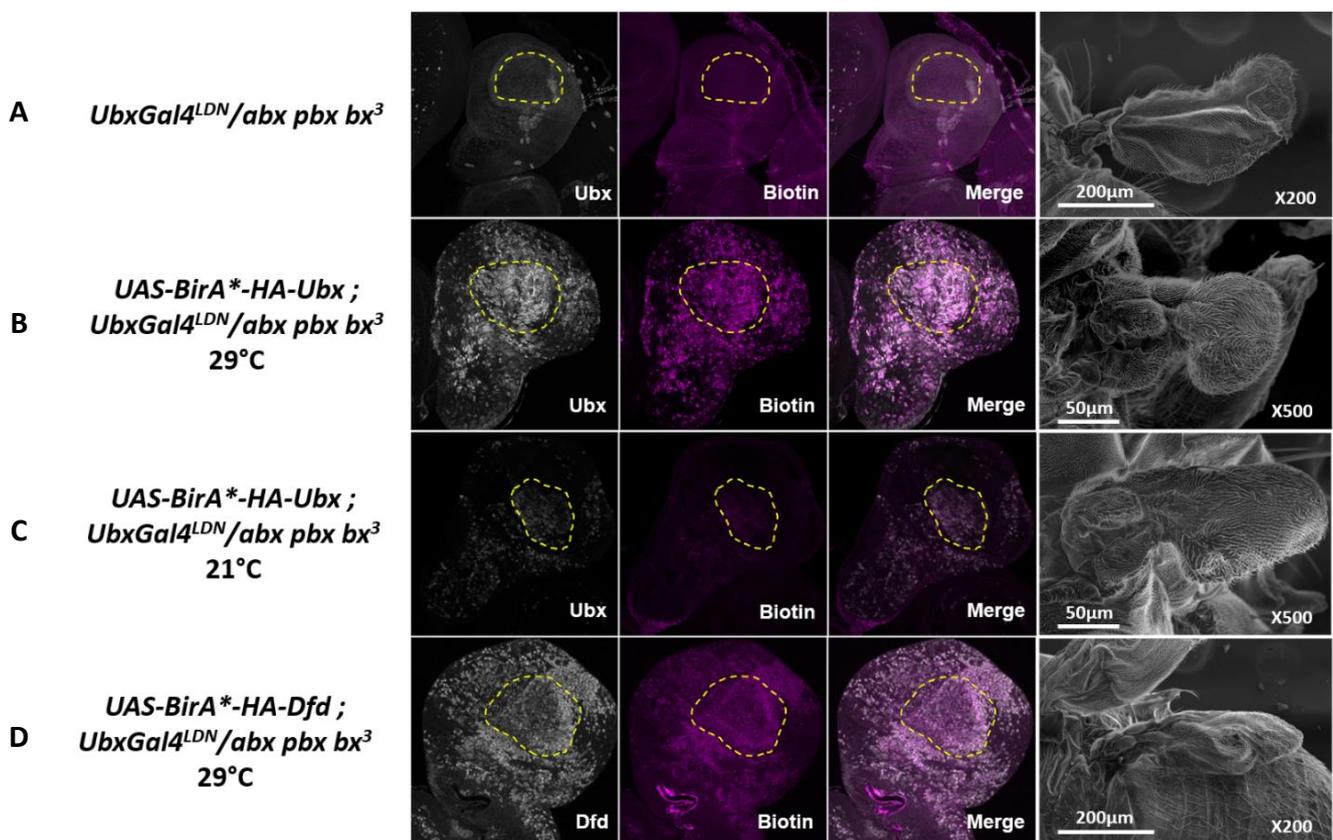


Figure 1 : Adaptation de la technique de BioID au contexte du développement de l'haltère chez la drosophile. **A** : La combinaison des allèles *abxpbxbx* et *UbxGal4LDN* provoque une perte de production de Ubx dans le disque imaginal d'haltère et une transformation des haltères en ailes. Le disque imaginal d'haltère contient peu de protéines biotinylées endogènes. **B** : L'expression à 29°C de *BirA*-HA-Ubx* provoque une forte biotinylation de protéines, ainsi qu'un sauvetage de la morphologie de l'haltère, principalement au niveau distal, le capitellum retrouvant une forme sphérique. **C** : À 21°C, la production de *BirA*-HA-Ubx* est faible, ce qui induit une très faible biotinylation et un sauvetage de la morphologie de l'haltère moins efficace. **D** : À 29°C, la production de *BirA*-HA-Dfd* induit une forte biotinylation de protéines dans le disque imaginal d'haltère, mais ne provoque pas de sauvetage du développement de l'haltère.

La méthode de BioID est originellement développée pour une utilisation en culture cellulaire. Dans ce contexte, il est possible d'obtenir facilement une grande quantité de cellules exprimant la protéine d'intérêt fusionnée à l'enzyme BirA*. Cela permet de purifier une grande quantité de protéines biotinylées, permettant d'effectuer des analyses par spectrométrie de masse quantitative. En revanche, notre approche *in vivo* nécessite la dissection de nombreux disques imaginaux d'haltères, constitué de 8 000 à 10 000 cellules (Martin 1982). La dissection de 500 disques imaginaux d'haltère nous permet d'extraire entre 0,35mg et 0,4mg de protéines. Le rendement de la BioID permet de purifier environ 0,1% des protéines de l'extrait de protéines de départ (Cheah et Yamada 2017). Cela suggère qu'à partir de 0,35mg de protéines extraites, nous pourrions purifier environ 350ng de protéines biotinylées. Cette quantité de protéines est compatible avec une analyse par spectrométrie de masse qualitative (Lubeckyj et al. 2019). Cependant, cette faible quantité de protéine est difficile à quantifier avec précision, et la présence d'agents réducteurs dans le tampon d'élution limite également les possibilités de quantification

Afin d'optimiser notre protocole de purification des protéines Biotinylées, nous avons utilisé des cellules HEK transfectées avec des vecteurs permettant l'induction de la production de BirA*-Ubx. Ce système nous a permis d'avoir accès à de grandes quantités de protéines biotinylées sans nécessité de fastidieuses dissections. Nous avons incubé des billes magnétiques couplées à de la streptavidine avec différentes concentrations d'extraits cellulaires contenant des protéines biotinylées : 1mg/mL, et 0,5mg/mL. Nous avons collecté chaque fraction au cours du protocole de purification afin de les analyser par une technique de Western Blot à l'aide de streptavidine couplée à l'enzyme HRP (Horseradish Peroxydase). Les extraits protéiques contiennent bien une grande quantité de protéines biotinylées. On observe une diminution marquée de cette quantité après l'incubation avec les billes, suggérant que de nombreuses protéines biotinylées ont été capturées. Les trois étapes successives de lavage des billes ne semblent pas induire de perte de protéines biotinylées. L'élution à l'aide de tampon Laemmli permet de purifier une grande quantité de protéines biotinylées. Cette quantité semble très similaires quelle que soit la concentration des extraits protéiques utilisés lors de l'incubation avec les billes, suggérant que même la plus faible concentration de 0,5mg/mL a suffit pour saturer les billes (**Figure 2**). Cependant, les extraits protéiques utilisés lors de cette expérience sont issus de cellules transfectées ayant produit

BirA*-HA-Ubx à 37°C, la température optimale de BirA*. A l'inverse, nous ne pouvons pas élever la température d'incubation des larves de drosophile à plus de 29°C ce qui implique que dans notre contexte de sauvetage, l'enzyme est moins active. De plus, le profil d'expression induit par *UbxGal4^{LDN}* n'induit la production de la protéine de fusion de manière intense qu'au niveau du pouch du disque imaginal d'haltère. Les cellules plus périphériques ne produisent la protéine de fusion que modérément. Cela implique que la fraction de protéines biotinylées parmi les protéines totales isolées à partir des disques imaginaux est plus faible que celle isolée à partir des cellules HEK transfectée. Cependant, la BioID a déjà été utilisée avec succès dans un contexte similaire, au sein d'embryons de drosophile n'exprimant la protéine de fusion que dans un lignage précis de cellules au cours de l'embryogenèse (Carnesecchi et al. 2020). La purification de protéine était alors effectuée à partir de 3 à 6 mg d'extraits protéiques issus d'embryons totaux (stade 13), constitués d'environ 3 000 cellules (Zalokar et Erk 1976) dont seule une faible proportion exprime le transgène. Pour cette raison nous avons décidé d'utiliser 1 000 disques imaginaux d'haltère par réplicat biologique d'expérience de BioID, ce qui devrait nous permettre d'obtenir environ 0,7mg de protéines issues de cellules exprimant au moins modérément les protéines de fusion.

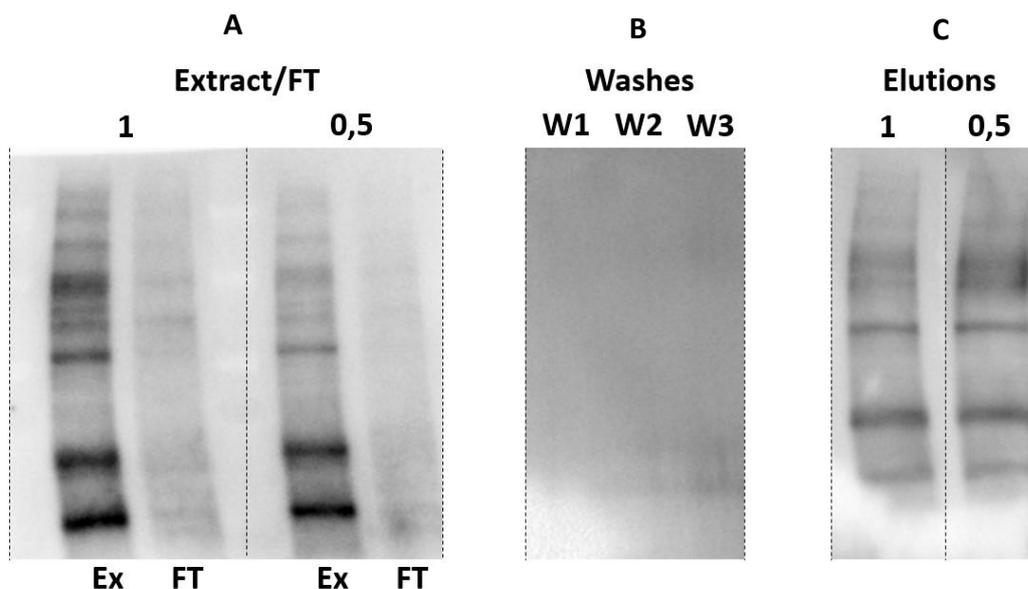


Figure 2 : Analyse par Western Blot de la purification de protéines biotinylées à partir d'extraits protéiques de différentes concentrations issus de cellules HEK transfectées. A : Des extraits protéiques (**Ex**) de différentes concentrations (1 mg/mL, et 0,5 mg/mL) issus de cellules HEK transfectées pour exprimer BirA*-HA-Ubx contiennent une grande quantité de protéines biotinylées. On observe des trainées (« smear ») montrant que de nombreuses protéines de tailles différentes sont biotinylées. L'intensité des bandes du smear semble bien proportionnelle à la concentration de l'extrait protéique. Nous avons également testé ces mêmes fractions après leur incubation avec les billes magnétiques couplées à la streptavidine (Fractions **FT**, ou « Flow through »). On observe que dans les fractions **FT**, l'intensité des bandes a fortement diminué, suggérant qu'une proportion importante des protéines biotinylées présentes dans l'extrait ont été piégées par les billes. **B :** Les trois étapes de lavages (« Washes », **W**) analysés sont ceux des billes ayant été en contact avec les extraits concentrés à 1mg/mL. **C :** Les éluats issus des billes ayant été incubées avec les différentes concentrations d'extraits protéiques présentent tous un smear d'intensité similaire.

Nous comptons reproduire ce résultat à partir d'extraits protéiques issus de disques imaginaux de drosophile produisant nos protéines de fusion, avant de commencer à envoyer nos échantillons à la plateforme de spectrométrie de masse de l'Institut de Biochimie et de Chimie des Protéines (IBCP), la Protein Science Facility (PSF). Les dissections fastidieuses que cela impliquait nous a motivé à candidater auprès de différentes fondations afin d'obtenir un financement pour une quatrième année de thèse, estimée nécessaire à la mise au point du protocole de spectrométrie de masse avec le personnel de la plateforme, à la finalisation de des dissections de disques imaginaux, à l'analyse des données et éventuellement aux tests d'autres conditions. Malheureusement aucun financement ne nous a été accordé. La crise sanitaire a également impliqué la fermeture de l'institut pendant plusieurs mois, ce qui a rendu impossible la finalisation de ce projet avant la fin de mon financement de thèse.

BirA^{*}-HA-Ubx ; nabGal4

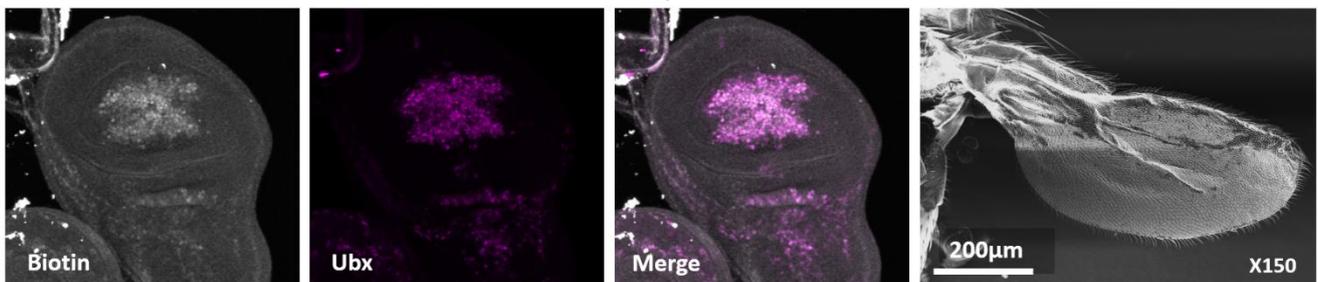


Figure supplémentaire 1 : *BirA^{*}-HA-Ubx* provoque la diminution de la taille des ailes. L'allèle *nabGal4* induit l'expression de *BirA^{*}-HA-Ubx* dans le pouch du disque imaginal d'aile. À 29°C, cela induit la biotinylation de protéines, et provoque une réduction drastique de la taille de l'aile. Cependant, la dose ou la fonction de la protéine de fusion ne semble pas suffisante pour transformer l'aile en haltère. Nous ne pouvons donc pas utiliser ce système pour tenter d'identifier des cofacteurs permettant à Ubx d'orchestrer le développement de l'haltère en utilisant des disques d'ailes transformés en haltère. Cela nous aurait permis d'obtenir plus facilement une grande quantité de protéines étant donné la taille cinq fois plus grande des disques d'ailes par rapport aux disques d'haltère.

Generation of a versatile BiFC ORFeome library for analyzing protein–protein interactions in live *Drosophila*

Au sein de ce projet, j'ai contribué à la génération de lignées de drosophiles transgéniques permettant l'expression de facteurs de transcriptions fusionnés à des fragments de protéines fluorescents à l'aide du système UAS/Gal4. Ces lignées permettent de tester la capacité d'interaction de ces facteurs de transcription avec d'autres protéines par la technique de BiFC, *in vivo* chez la drosophile. Certains résultats issus du crible fonctionnel par interférence ARN ont également été utilisés pour appuyer fonctionnellement la pertinence de certaines interactions mises en évidence par BiFC.

Generation of a versatile BiFC ORFeome library for analyzing protein–protein interactions in live *Drosophila*

Johannes Bischof^{1†}, Marilyne Duffraisse^{2†}, Edy Furger^{1†}, Leiore Ajuria^{2†}, Guillaume Giraud², Solene Vanderperre², Rachel Paul², Mikael Björklund³, Damien Ahr², Alexis W Ahmed², Lionel Spinelli⁴, Christine Brun^{4,5}, Konrad Basler¹, Samir Merabet^{2*}

¹Institute of Molecular Life Sciences, University of Zurich, Zurich, Switzerland; ²IGFL, CNRS, ENS Lyon, Lyon, France; ³Zhejiang University-University of Edinburgh Institute, Zhejiang University, Haining, China; ⁴INSERM, Aix-Marseille Université, Marseille, France; ⁵TAGC, Centre National de la Recherche Scientifique, Marseille, France

Abstract Transcription factors achieve specificity by establishing intricate interaction networks that will change depending on the cell context. Capturing these interactions in live condition is however a challenging issue that requires sensitive and non-invasive methods. We present a set of fly lines, called ‘multicolor BiFC library’, which covers most of the *Drosophila* transcription factors for performing Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC). The multicolor BiFC library can be used to probe two different binary interactions simultaneously and is compatible for large-scale interaction screens. The library can also be coupled with established *Drosophila* genetic resources to analyze interactions in the developmentally relevant expression domain of each protein partner. We provide proof of principle experiments of these various applications, using Hox proteins in the live *Drosophila* embryo as a case study. Overall this novel collection of ready-to-use fly lines constitutes an unprecedented genetic toolbox for the identification and analysis of protein-protein interactions in vivo.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.38853.001>

*For correspondence:
samir.merabet@ens-lyon.fr

†These authors contributed
equally to this work

Competing interest: See
page 20

Funding: See page 21

Received: 01 June 2018

Accepted: 18 September 2018

Published: 24 September 2018

Reviewing editor: K
VijayRaghavan, National Centre
for Biological Sciences, Tata
Institute of Fundamental
Research, India

© Copyright Bischof et al. This
article is distributed under the
terms of the [Creative Commons
Attribution License](#), which
permits unrestricted use and
redistribution provided that the
original author and source are
credited.

Introduction

Proteins are distributed in various compartments within the cell, acting in a crowded environment and establishing hundreds of molecular contacts that will eventually dictate cellular function. These molecular contacts are often highly dynamic, may be of weak affinity, and depend on the cell context. Capturing these versatile interactions is therefore a key challenge to better understand the molecular cues underlying protein function in vivo.

Two types of experimental strategies are classically used for high-throughput screening of protein-protein interactions (PPIs): yeast two-hybrid (Y2H) and tandem affinity purification coupled to mass spectrometry (TAP-MS). Y2H detects PPIs in an automatable way in live yeast cells, while TAP-MS is based on co-immunoprecipitation (co-IP) and subsequent MS analysis of the different constituents of the complex (see [Mann et al., 2013; Cusick et al., 2005] for review). Recent developments such as proximity based biotinylation (BioID) have significantly increased the sensitivity of the TAP-MS approach, allowing capturing low affinity PPIs from a small number of cells (Varnaité and MacNeill, 2016). Despite their wide range of applications, Y2H and TAP-MS still have several drawbacks. For example, Y2H does not reproduce the plant or animal cell environment, and each revealed interaction needs thus to be validated in the relevant physiological context afterwards. TAP-MS can be

performed in the appropriate cell type, but the extraction protocol requires experimental conditions (especially for cell fixation and/or cell lysis) that are often not neutral to the integrity of endogenous PPIs. Finally, BioID allows interaction analyses without fixation, but may capture proteins promiscuously based on proximity rather than direct physical interactions, which could yield false positives.

In addition to these high-throughput approaches, PPIs can also be analyzed at a low-scale level, for example to validate the interaction status of one protein with few candidate partners. Co-IP followed by western blot is classically used for this purpose. However, this approach requires tools that are not systematically available, such as good antibodies or tagged-constructs. Co-IP experiments may also be poorly sensitive, detecting mainly interactions that will resist cell lysis and purification conditions.

An alternative and more sensitive approach is *in situ* proximity ligation assay (PLA), which provides a direct readout of the candidate PPI in the cell (Bagchi *et al.*, 2015). A major limitation of PLA is the need of good antibodies against both interacting proteins. In addition, PLA works on fixed material, which is not neutral for PPIs.

Among the few methods that are compatible for PPI analysis in live conditions is Förster (or Fluorescence) resonance energy transfer (FRET), which relies on the transfer of a virtual photon between two fluorescent chromophores upon excitation. This transfer occurs within a small distance (less than 10 nm) and can thus be used to validate the close proximity between two candidate proteins, or to capture a conformational change (Piston and Kremers, 2007). FRET requires high level of protein expression and dedicated interfaces to interpret the few emitted signals with confidence and therefore cannot be used for large-scale applications.

By contrast, Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) appears much more convenient since it is based on a visible fluorescent signal. BiFC relies on the property of monomeric fluorescent proteins to be reconstituted from two sub-fragments upon spatial proximity (in a similar range of distance as FRET). This method has been used in different plant and animal model systems and with various types of proteins (Kerppola, 2008; Kodama and Hu, 2012; Miller *et al.*, 2015). In particular, recent work has established experimental parameters for performing BiFC in the live *Drosophila* embryo (Hudry *et al.*, 2011), and the method was coupled to a candidate gene approach to identify new interacting partners of *Drosophila* Hox proteins (Baëza *et al.*, 2015).

Moreover, the bright intrinsic fluorescence of BiFC allows analysis of PPIs using commonly available fluorescent microscopes and with normal protein expression levels. Originally established with the Green Fluorescent Protein (GFP [Ghosh *et al.*, 2000]), BiFC has by now been developed with various GFP-derivatives such as the YFP, Venus or Cerulean proteins (Hu *et al.*, 2002; Hu and Kerppola, 2003; Shyu *et al.*, 2006). BiFC has also been established with other types of monomeric fluorescent proteins, including red fluorescent variants like mRFP1 (Jach *et al.*, 2006) or mCherry (Fan *et al.*, 2008), and more recently the near infrared fluorescent protein iRFP (Chen *et al.*, 2015). In all cases, the complementation between the two sub-fragments of the fluorescent protein induces the formation of covalent junctions, leading to a stabilization of the protein complex. While this property forbids monitoring temporal dynamics of PPIs, this practically irreversible nature of the complementation allows detection of weak and otherwise transient PPIs, making BiFC a very sensitive approach for studying PPIs *in vivo*. BiFC has also been used in several high throughput approaches in yeast (Sung *et al.*, 2013), plant (Lee *et al.*, 2012) and mammalian cells (Lee *et al.*, 2011), or for drug discovery against a specific PPI (Poe *et al.*, 2014; Dai *et al.*, 2013), demonstrating its suitability for large-scale applications.

Here, we present a genetic repertoire covering 450 *Drosophila* transcription factors (TFs) (corresponding to around 65% of annotated TFs) for performing BiFC in a tissue- and developmental stage-specific manner *in vivo*. This genetic repertoire is called multicolor BiFC library and consists of a collection of fly lines that complement the previously established FlyORF collection (<https://flyorf.ch/> and [Bischof *et al.*, 2013]). The multicolor BiFC library is continually updated and aims at covering all *Drosophila* TFs in the near future. We provide proof of concept experiments showing the suitability of the BiFC FlyORF library for performing either large-scale interaction screens or for analyzing individual PPIs. This collection of fly lines constitutes the first genetic toolbox for analyzing thousands of different PPIs in a live animal organism, opening new avenues for understanding molecular properties of protein interaction networks.

Results

Generation of a fly library containing Gal4-inducible ORFs compatible with Venus-based BiFC

560 open-reading frames (ORFs) among the 3000 actually present in the FlyORF library code for TFs. These ORFs are under the control of upstream activation sequences (UAS sites) and fused in frame to a hemagglutinin tag (3xHA) sequence at their 3' end (Bischof *et al.*, 2013). The ORFs are flanked by distinct FRT sites that can be used to replace the promoter sequence and/or the 3xHA tag region by any other sequence of choice upon FLP/FRT-mediated recombination in vivo (Bischof *et al.*, 2013). In particular, two swapping fly lines have been generated to replace the C-terminal 3xHA-tag by sequences coding for the N- or C-terminal fragment of the Venus fluorescent protein (fragments respectively called VN and VC hereafter in the manuscript [Bischof *et al.*, 2013]). These two fragments, when attached to proteins that are co-expressed, are able to complement upon spatial proximity, allowing assessment of the interaction by BiFC (Figure 1A). A proof of principle experiment between two known interacting partners present in the FlyORF library proved the efficiency of the swapping and the specificity of the Venus-based BiFC in the *Drosophila* wing imaginal disc (Bischof *et al.*, 2013).

Experimental parameters for performing Venus-based BiFC have also been established in different tissues of the live *Drosophila* embryo (Hudry *et al.*, 2011). In particular, several controls showed

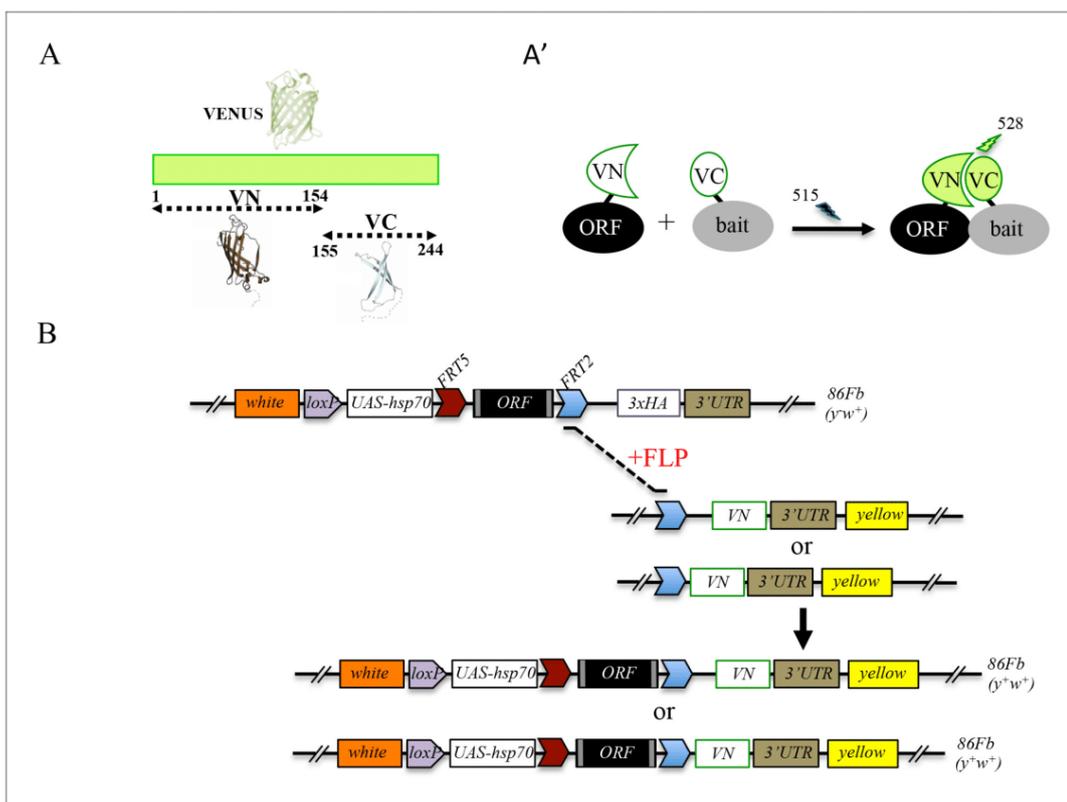


Figure 1. Generation of a Gal4 inducible library compatible with Venus-based BiFC in *Drosophila*. (A-A') Principle of the Venus-based BiFC between a candidate ORF (Open Reading Frame) and a bait protein fused to the N- (VN) or C-terminal (VC) fragment of Venus, respectively. Excitation and emission wavelengths are indicated. (B) Principles of Flippase (FLP)/FRT-mediated recombination to swap the C-terminal 3xHA tag of the ORF with the original VN or new VN-short tag line. Genetic crosses and selection procedure are described in (Bischof *et al.*, 2013). Note that the UAS-ORF-HA and resulting UAS-ORF-VN are located on the third chromosome (86Fb). See also **Figure 1—figure supplement 1** and **Supplementary file 1**. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.38853.002>

The following figure supplement is available for figure 1:

Figure supplement 1. Comparison of Venus-based BiFC when using ORFs swapped with the original VN or VN-short tag line.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.38853.003>

that Venus-based BiFC could not occur under conditions where the interaction between the two candidate partners was disrupted. This was demonstrated by using mutant proteins (Hudry et al., 2011) or by coexpressing one partner that cannot complement (not fused to a Venus fragment) and thus competes against BiFC (Baëza et al., 2015).

Although very convenient for generating new fusions without additional fly transgenesis, swapping experiments require several generations, and therefore several weeks, before getting the desired BiFC-compatible fly line (Bischof et al., 2014). In order to introduce ready-to-use fly lines for performing Venus-based BiFC, we systematically exchanged the 3xHA tag in a number of TF lines of the FlyORF library for the VN tag (Figure 1B). These first rounds of swapping experiments led to a collection of 136 ORF-VN fly lines (Supplementary file 1, third column). We further generated an alternative VN-swapping fly line that allows fusing the ORF to the Venus fragment, however with a shorter linker region between ORF and VN (Figure 1B and Figure 1—figure supplement 1, see also Materials and methods). Reducing the length of this region could potentially diminish the risk of revealing indirect PPIs in vivo. A series of pilot tests confirmed that the new VN-short tag fly line is suitable for swapping and BiFC experiments (Figure 1—figure supplement 1). This new swapping fly line is now systematically used for generating additional ready-to-use ORF-VN tagged fly lines. To date, 74 ORFs have been fused to the VN fragment with the short linker region (Supplementary file 1, fourth column). In addition to the previously generated fly lines (including those generated in (Hudry et al., 2011; Baëza et al., 2015), Supplementary file 1, fifth column), the multicolor BiFC library currently contains 232 different TFs fused to VN for doing Venus-based BiFC in *Drosophila*.

Generation of a fly library containing Gal4-inducible ORFs compatible with bicolor BiFC

One interesting feature of BiFC is the opportunity of using fragments from various GFP-derived proteins to visualize two different PPIs in the same cell (Hu and Kerppola, 2003). In particular, it was shown that the C-terminal fragment of the blue fluorescent Cerulean protein (CC) could complement with either the N-terminal fragment of Venus (VN) or Cerulean (CN), giving rise to Venus or Cerulean-like fluorescent signals, respectively (Figure 2A-A' and [Hu and Kerppola, 2003]). Given that Cerulean-based BiFC was shown to be exploitable in the *Drosophila* embryo (Hudry et al., 2011), we decided to increase the versatility of the BiFC library by generating an additional set of fly lines that could be used for both Venus- and Cerulean-based BiFC (Figure 2B). This new UAS-inducible ORF-CC library was inserted on the second chromosome (see Materials and methods and Figure 2—figure supplement 1) and can be used to perform Venus- and Cerulean-based BiFC with any VN- (including VN fusion constructs of the library) and CN-fused bait protein, respectively. Fly lines for 326 different ORF-CC have been generated so far (Supplementary file 2).

To verify that the ORF-CC library is compatible with Cerulean- or Venus-based BiFC, we chose a set of six TFs that have already been analyzed as VN-fusion constructs with the Hox protein AbdominalA (AbdA) fused to the VC complementary fragment (Bagpipe, Bap; Empty spiracles, Ems; Knirps, Kni; Pangolin, Pan; Pox mesoderm, Poxm; Tinman, Tin), and whose interaction status was also validated by co-IP experiments (Baëza et al., 2015). Among those six TFs, all but Pan could interact with AbdA (Baëza et al., 2015). The same pool of TFs was here tested as ORF-CC fusions with VN-AbdA or CN-AbdA in two different tissues (epidermis and somatic mesoderm) and at two different developmental stages (stages 10 and 12) by using two different Gal4 drivers. Results showed that Venus and Cerulean fluorescent signals could easily be distinguished from the fluorescent background in the epidermis or mesoderm in the case of all tested TFs except Pan (Figure 2C–D). Moreover, competition tests with the corresponding HA-tagged ORFs validated the specificity of BiFC obtained between VN-AbdA and each candidate ORF-CC construct (Figure 2—figure supplement 2). This last experiment confirms that the ORF-3xHA fly lines from the original FlyORF library can be used to verify the specificity of BiFC signals. Altogether, these observations establish that the ORF-CC constructs of the multicolor BiFC library are compatible with either Cerulean- or Venus-based BiFC in different tissues of the live *Drosophila* embryo.

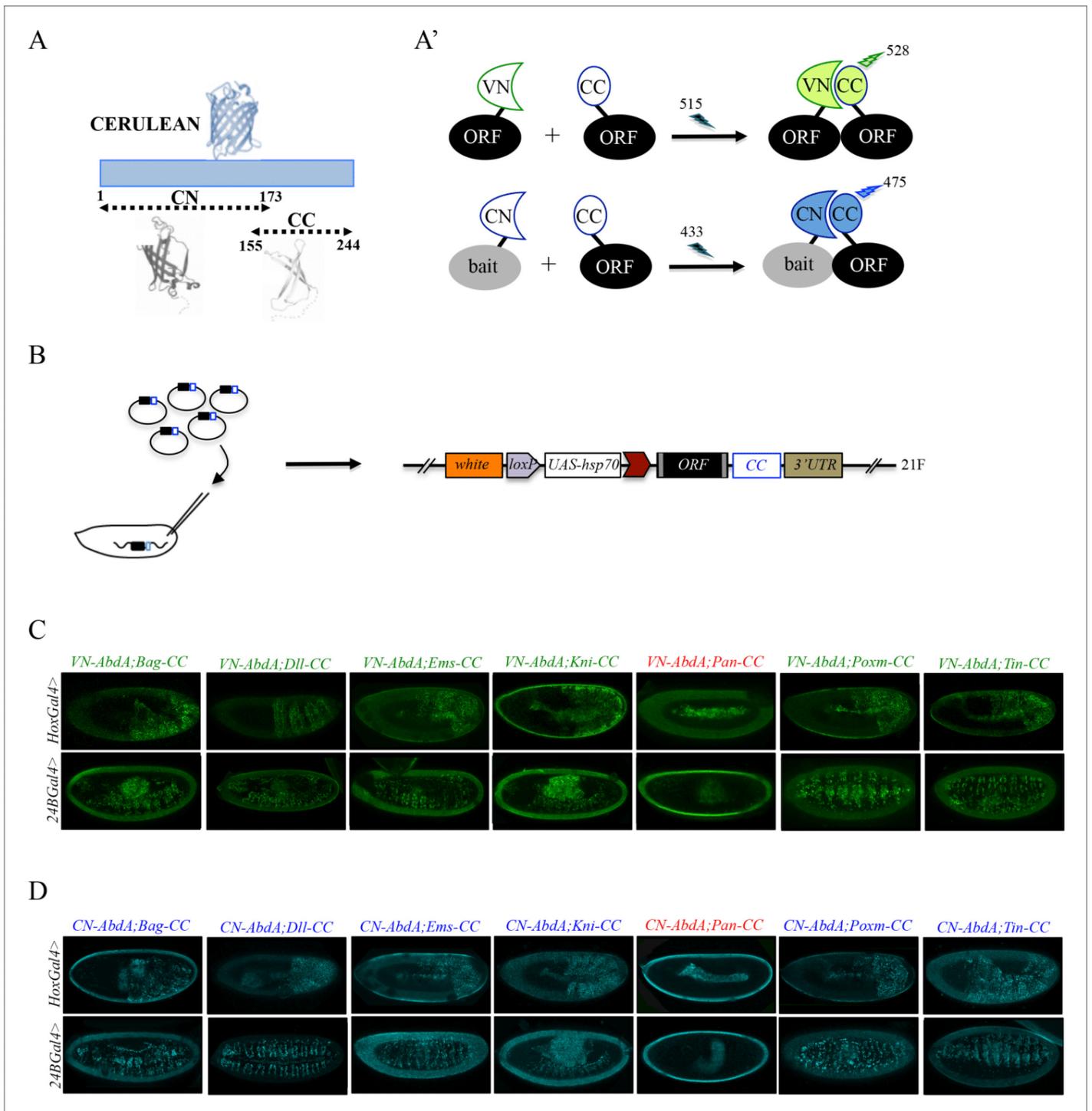


Figure 2. Generation of a Gal4 inducible library compatible with Venus- and Cerulean-based BiFC in *Drosophila*. (A-A') Principle of bicolor BiFC by using the complementation property between the C-terminal fragment of the blue fluorescent protein Cerulean (CC) and the N-terminal fragment of Venus (VN) or Cerulean (CN). Excitation and emission wavelengths are indicated. (B) Principle of the generation of the UAS-ORF-CC library at the 21F genomic locus. See also Materials and methods. (C-D) Illustrative confocal captures of Venus-based BiFC obtained from different ORF-CCs and VN-AbdA (C) or CN-AbdA (D) interaction partners, as indicated. Fusion proteins are expressed with the *abdA-Gal4* (upper panels) or *24B-Gal4* (lower panels) driver and BiFC is observed in the epidermis (stage 10/11) or somatic mesoderm (stage 14), respectively. Note that the amnioserosa, the gut inside the embryo and the vitelline membrane around the embryo display strong autofluorescence. Absence of interaction with Pangolin (Pan) is highlighted in red. See also **Figure 2—figure supplements 1 and 2** and **Supplementary file 2 and 3**.

Figure 2 continued on next page

Figure 2 continued

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.38853.004>

The following figure supplements are available for figure 2:

Figure supplement 1. The 21F and 86Fb attP sites lead to similar expression levels.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.38853.005>

Figure supplement 2. Co-expression of non-complementing ORF-3xHA can compete against BiFC signals obtained from ORF-CC and VN-AbdA constructs.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.38853.006>

Using the multicolor BiFC library for large-scale interaction screens in live *Drosophila* embryos

The multicolor BiFC library currently covers 450 different *Drosophila* TFs (around 65% of annotated TFs), making a total of 579 fly lines due to several TFs fused with different VN and/or CC versions. Among the 450 TFs, 127 are available as VN fusion constructs, 221 as CC fusion constructs, and 105 as VN- and CC-fusion constructs (**Figure 3**). Together with the simplicity of genetic crosses and read-outs, it makes this library appropriate for large-scale interaction screens in *Drosophila*.

We provide a proof of concept by analyzing interaction properties of 260 TFs of the multicolor BiFC library with Ultrabithorax (Ubx) and AbdA (**Figure 4A**). These two Hox proteins have highly similar domains and motifs (**Figure 4—figure supplement 1**). They share a number of common functions during embryogenesis and can substitute for each other in several tissues, as noticed for example in the epidermis (**Gebelein et al., 2004**), trachea (**Merabet et al., 2005**) or ventral nerve cord (**Ahn et al., 2010**). Ubx and AbdA have also few distinct expression patterns that correlate with specific functions in the embryo. For example, the specification of oenocytes (**Brodu et al., 2002**), heart (**Ponzielli et al., 2002**) or gonadal mesoderm (**Riechmann et al., 1998**) is under the control of AbdA, a function that cannot be substituted by Ubx. Such exclusive functions are however rare during *Drosophila* embryogenesis, suggesting that most embryonic functions of Ubx and AbdA could rely on the interaction with a large number of common cofactors. In this context, we aimed at using the multicolor BiFC library to reveal interactions that could be specific to AbdA. The identification of such partners would validate the specificity and sensitivity of the multicolor BiFC library in the context of a large-scale interaction screen with two closely related bait proteins.

Among the 260 different TFs, 127 were analyzed in fusion with VN and 133 in fusion with CC (**Supplementary file 3**). Thirty-five TFs were tested in fusion with VN and CC to assess the influence of the fusion topology on BiFC results (**Supplementary file 8**, see also Discussion). Interactions were analyzed in the epidermis of stage 10 embryos, in the Ubx- or abdA-expression domain, by using Ubx-*Gal4* or abdA-*Gal4* driver, as previously described (**Baëza et al., 2015**).

The analysis showed that 62% (163/260) and 57% (149/260) of the tested TFs could interact with Ubx or AbdA, respectively (**Figure 4A–B**, **Figure 4—figure supplements 2–6** and **Supplementary file 4**). Among all positive interactions, 71,4% (130/182) are common to the Ubx and AbdA interactomes (**Figure 4—figure supplements 7–8**), consistent with the numerous overlapping functions between the two Hox proteins during embryogenesis. Interestingly, the homeodomain (HD) class of TFs appears significantly enriched in the Ubx (p value=0,041) and AbdA (p value=0,017) interactomes, suggesting that HD-containing TFs could constitute a privileged class of common cofactors (**Figure 4C and D** and **Figure 4—figure supplement 1**). We also looked at TFs that did not interact with the Hox proteins, constituting the so-called negatomes (**Smialowski et al., 2010**), but did not notice enrichment for any particular class of TFs (**Figure 4—figure supplements 1 and 7**).

Although Ubx and AbdA shared a number of common interactions, our BiFC screen also revealed interactions that were specific for only one of the two Hox proteins. These interactions represent 20% and 13% of their overall interactome, respectively (33 TFs for Ubx and 19 TFs for AbdA, **Figure 4—figure supplements 8 and 9**). This result confirms that the multicolor BiFC library can be used to capture specific interaction partners between two closely related bait proteins. Interestingly, bZIP-containing TFs are absent from the two specific interactomes (**Figure 4E and F**), suggesting that this class of TFs could be specifically dedicated to Ubx- and AbdA common functions.

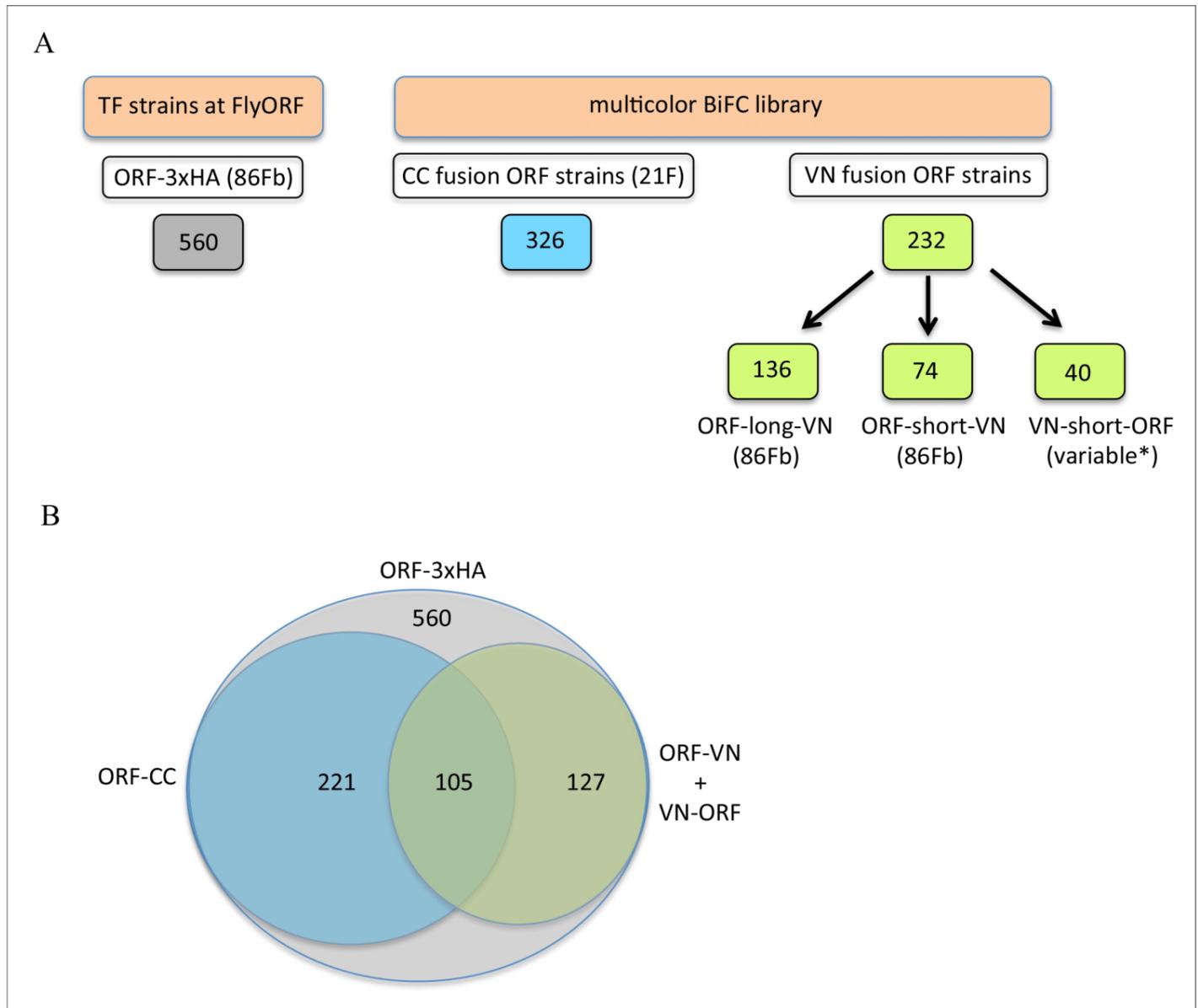


Figure 3. The TF-3xHA and multicolour BiFC libraries. (A) Number of transcription factors (TFs) tagged with three repeats of the hemagglutinin (3xHA) epitope at the 3' end and multicolour BiFC fly strains at FlyORF. Various insertion sites were used for the VN-short-ORF constructs (Baěza et al., 2015). Some of the 232 TF strains exist in more than one VN version (see also **Supplementary file 1**). (B) Distribution of the multicolour BiFC fly lines compared to the TF-3xHA library.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.38853.007>

Overall, the BiFC screen shows that the two Hox proteins could interact with a surprisingly high number of various types of TFs. A similar conclusion (with 41% of positive interactions) was obtained from a previous candidate gene screen based on competitive BiFC with a set of 80 TFs (Baěza et al., 2015). This high interaction potential of Hox proteins could be explained by their numerous functions during embryogenesis and the extreme sensitivity of BiFC (linked to the fluorescent signal and UAS/Gal4 expression system).

The BiFC screen was performed in the *Ubx*- or *abdA*-expression domain by expressing the TFs using *Ubx-Gal4* or *abdA-Gal4* driver. True positive interactions are expected to occur between TFs that are co-expressed in the same spatial expression domain. To test this, we considered the extent of the overlap between the expression domain of *Ubx* or *AbdA* and each TF (as the ratio between

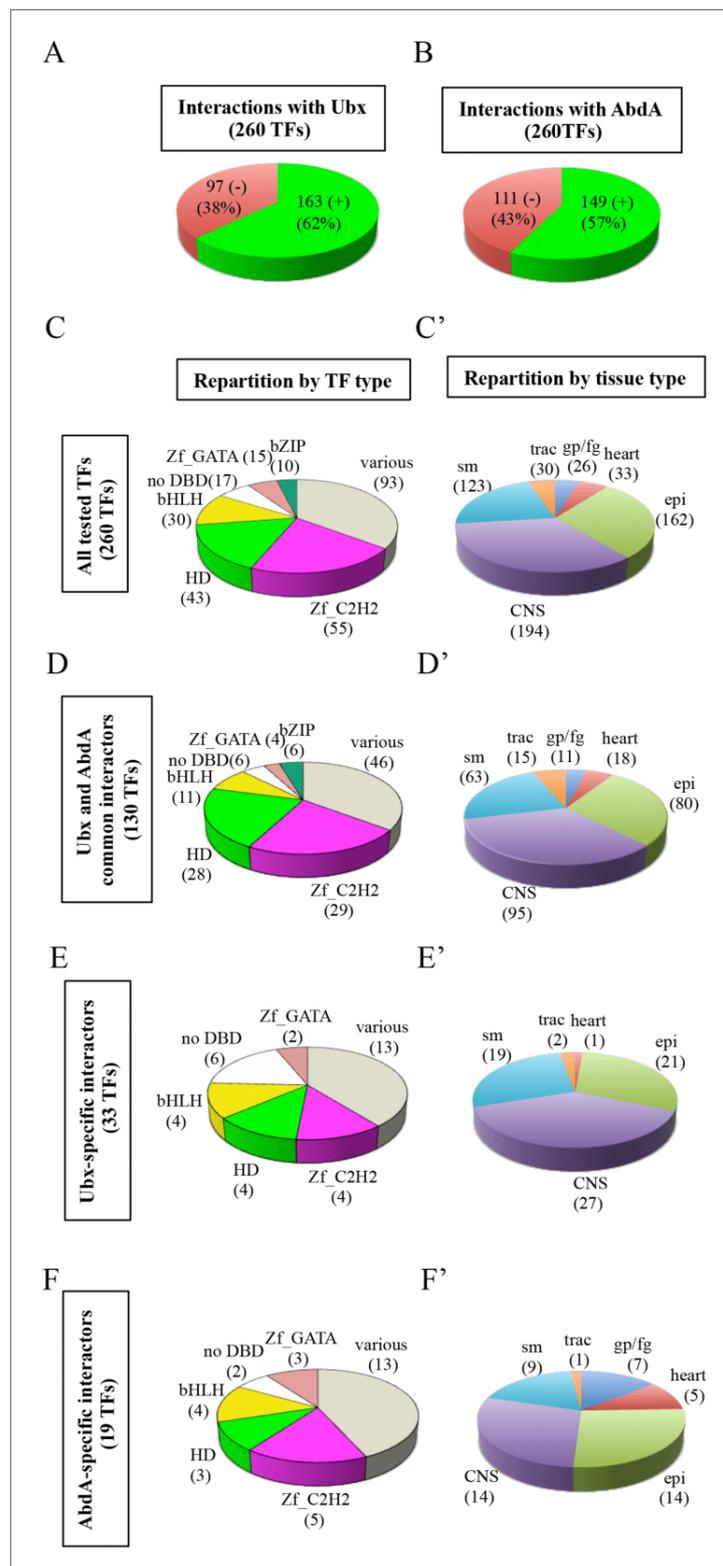


Figure 4. Using the multicolor BiFC library for a large-scale interaction screen with Ubx and AbdA in the live *Drosophila* embryo. (A) Number of TFs that were positive (green) or negative (red) with Ubx. (B) Number of TFs that were positive (green) or negative (red) with AbdA. (C) Repartition of the different families among the 260 TFs tested with the Hox proteins. A specific color code is attributed to each TF family. Families with the highest
Figure 4 continued on next page

Figure 4 continued

number of tested TFs are represented (Zinc fingers C2H2, Zf_C2H2; homeodomain, HD; basic helix-loop-helix, bHLH; no DNA-binding domain, no DBD; zinc fingers GATA, Zf_GATA; basic leucine zipper, bZIP). 36 other different families containing one to eight TF representatives are present in the 'various' category. (D) Repartition of the TF families among the 130 positive interactions common to Ubx and AbdA. Note that the HD family is slightly enriched in this interactome. (E) Repartition of the TF families among the 33 Ubx-specific interactions. (F) Repartition of the TF families among the 19 AbdA-specific interactions. Note the absence of bZIP representatives in the Ubx- and AbdA-specific interactomes. (C') Repartition of the expression profile of the 260 tested TFs in six different embryonic tissues: the somatic mesoderm (sm), trachea (trac), gonad primordium/fat body (gp/fb), heart, epidermis (epi) and central nervous system (CNS). Most of these TFs are expressed in several embryonic tissues. (D') Tissue-type repartition of the expression profile of the 130 Ubx- and AbdA-positive interactors. (E') Tissue-type repartition of the expression profile of the 33 Ubx-specific interactors. Note the absence of TFs expressed in the gp/fb. (F') Tissue-type repartition of the expression profile of the 19 AbdA-specific interactors. Note the specific enrichment of TFs expressed in the gp/fb. See also **Figure 4—figure supplements 1–10** and **Supplementary file 4 and 5**.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.38853.008>

The following figure supplements are available for figure 4:

Figure supplement 1. Interactomes and negatomes of Ubx and AbdA with the 260 tested TFs.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.38853.009>

Figure supplement 2. Illustrative confocal captures of Venus-based BiFC between ORF-VN and VC-Ubx, as indicated.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.38853.010>

Figure supplement 3. Illustrative confocal captures of Venus-based BiFC between ORF-CC and VN-Ubx, as indicated.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.38853.011>

Figure supplement 4. Illustrative confocal captures of Venus-based BiFC between ORF-VN and VC-AbdA, as indicated.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.38853.012>

Figure supplement 5. Illustrative confocal captures of Venus-based BiFC between ORF-CC and VN-AbdA, as indicated.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.38853.013>

Figure supplement 6. Illustrative confocal captures of Cerulean-based BiFC between ORF-CC and CN-AbdA, as indicated.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.38853.014>

Figure supplement 7. Representation of the common interactome and negatome between Ubx and AbdA.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.38853.015>

Figure supplement 8. Comparison between Interactomes.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.38853.016>

Figure supplement 9. Representation of the Ubx- (A) and AbdA-specific (B) interactomes.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.38853.017>

Figure supplement 10. Analysis of the co-expression and interaction status of Ubx (A) or AbdA (B) and the positive ORFs.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.38853.018>

the number of tissues in which the TF and Ubx or AbdA are co-expressed and the total number of tissues composing the TF expression domain during embryogenesis). To this end, we used annotations from (Hammonds et al., 2013) and the Flybase database to assign the expression status of Ubx, AbdA and each TF in 25 different developmental contexts (**Supplementary file 4**). This analysis showed that the extent of co-expression is significantly higher when TFs and Hox protein interactions are detected with BiFC than when they are not (Wilcoxon test, p value = 1.10^{-2} and 5.10^{-5} for Ubx and AbdA, respectively: **Figure 4—figure supplement 10**). Thus, the BiFC screen reveals more frequently interactions between TFs and Hox proteins when they are co-expressed during embryogenesis.

Further analysis of interactomes in major embryonic tissues (**Figure 4C', D', E' and F'**) revealed that the AbdA-specific interactome was enriched in TFs expressed in the fat body/gonad primordium (p value= 8.10^{-4}) when compared to all positive interactions (**Figure 4F'**, encircled TFs in **Figure 4—figure supplement 9**, and **Supplementary file 5**). In contrast, TFs expressed in this tissue

are not present in the Ubx-specific interactome (**Figure 4E**). This observation is consistent with the specific role of AbdA in the gonad primordium (**Moore et al., 1998**). Another TF, Spalt major (Salm), is also found in the AbdA-specific interactome (encircled by a dotted-line in **Figure 4—figure supplement 9**). Among other functions, Salm is important for oenocyte specification (**Elstob et al., 2001**), a role also specifically ensured by AbdA during embryogenesis (**Brodu et al., 2002**). A significant enrichment (p value= 5.10^{-2}) is also observed in the dorsal vessel (**Figure 4F**), TFs annotated with a star in **Figure 4—figure supplement 9**, and **Supplementary file 5**), which again coincides with a specific function of AbdA in particular for the differentiation of ostia and heart beating activity (**Ponzielli et al., 2002**). By comparison, TFs expressed in tissues where Ubx and AbdA have redundant/common functions show no significant enrichment in the AbdA-specific interactome (i.e. epidermis, CNS, somatic mesoderm and trachea: **Figure 4D** and **F** and **Supplementary file 5**). Together these observations underline that the multicolor BiFC library is efficient in revealing relevant candidate cofactors involved in AbdA- and tissue-specific functions.

Validating BiFC observations by a functional genetics approach in haltere primordium

Since BiFC revealed a number of potential interactions, we asked whether hits from the large-scale interaction screen could somehow be confirmed to contribute to Hox protein function. To this end, we searched for a sensitive genetic background where any subtle modification in Hox protein function could lead to a quantifiable phenotype. In this context, the loss of a Hox cofactor could affect the sensitized Hox protein function and lead to a stronger phenotype. No sensitive Hox-dependent phenotypes are known in the embryo, but several exist in the adult, like eye reduction (**Plaza et al., 2001**) or antenna-to-leg transformation (**Plaza et al., 2008**). These phenotypes rely however on ectopic expression of the Hox product and are therefore not ideal for assessing the role of a candidate cofactor in the normal developmental context. To circumvent this problem, we considered the haltere-to-wing phenotype, which results from the specific loss of Ubx in the haltere primordia (**Lewis, 1978**). A particular combination of Ubx mutant alleles has more recently been used to measure the ability of different Ubx isoforms to rescue haltere formation (**de Navas et al., 2011**). Importantly, the haltere-to-wing phenotype is sensitive to the dose of Ubx, and removing one copy of the Hox gene is sufficient to induce the formation of few small hairs that are normally found in the wing margin, revealing a weak haltere-to-wing transformation phenotype (**Figure 5A–B**). In this context, RNAi against Ubx is sufficient to induce a strong haltere-to-wing transformation, with the formation of numerous wing-like hairs and a flattened wing-like shape (**Figure 5A–B**). This result highlights that the heterozygote Ubx mutant phenotype can be increased when Ubx function is affected. We decided to use this sensitive background for measuring the role of TFs tested in our BiFC screen (see Materials and methods). The rationale was that affecting the expression of a positive TF acting as a Ubx cofactor in the haltere primordium should increase the haltere-to-wing phenotype. Reversely, a negative TF should have no effect.

TFs were selected based on their known expression and/or function in the haltere (Flybase database, (**Schertel et al., 2015**) and **Supplementary file 6**). The resulting 40 TFs (among all the 260 that were tested in the embryo BiFC screen) were assayed using RNAi experiments in Ubx heterozygous mutant haltere discs. Slightly more than half of the tested TFs (23/41: **Supplementary file 6**) did not increase the phenotype of the heterozygous Ubx mutant upon RNAi (as illustrated with RNAi against *absent_small_or_homeotic_discs_2* (*ash2*) in **Figure 5A–B**). The large majority of those TFs (18/23) were classified as BiFC negative with Ubx in the embryo, confirming that BiFC was specific enough not to identify these as interacting partners of Ubx (**Figure 5C** and **Supplementary file 6**). In addition, we cannot exclude the possibility that the five other TFs that were BiFC positive could act as Ubx cofactors in another developmental context. Among the 17 remaining TFs, eight enhanced the phenotype upon RNAi (**Supplementary file 6**). The phenotype enhancement was not as strong as with the RNAi against Ubx, and consisted in the appearance of several wing-like hairs in the haltere (as illustrated with RNAi against *homothorax* (*hth*) in **Figure 5A–B**). 7/8 of those TFs scoring positively in the RNAi assay were also BiFC-positive in the embryo, highlighting that Ubx cofactors were efficiently captured in the BiFC interaction screen (**Figure 5D** and **Supplementary file 6**). It is also worth mentioning that the TF that gave the strongest phenotype upon RNAi, Hth, displays enriched binding adjacent to Ubx binding sites genome wide in the haltere tissue (**Choo et al., 2011**). This suggests that Hth could constitute a crucial cofactor for Ubx in the haltere specification

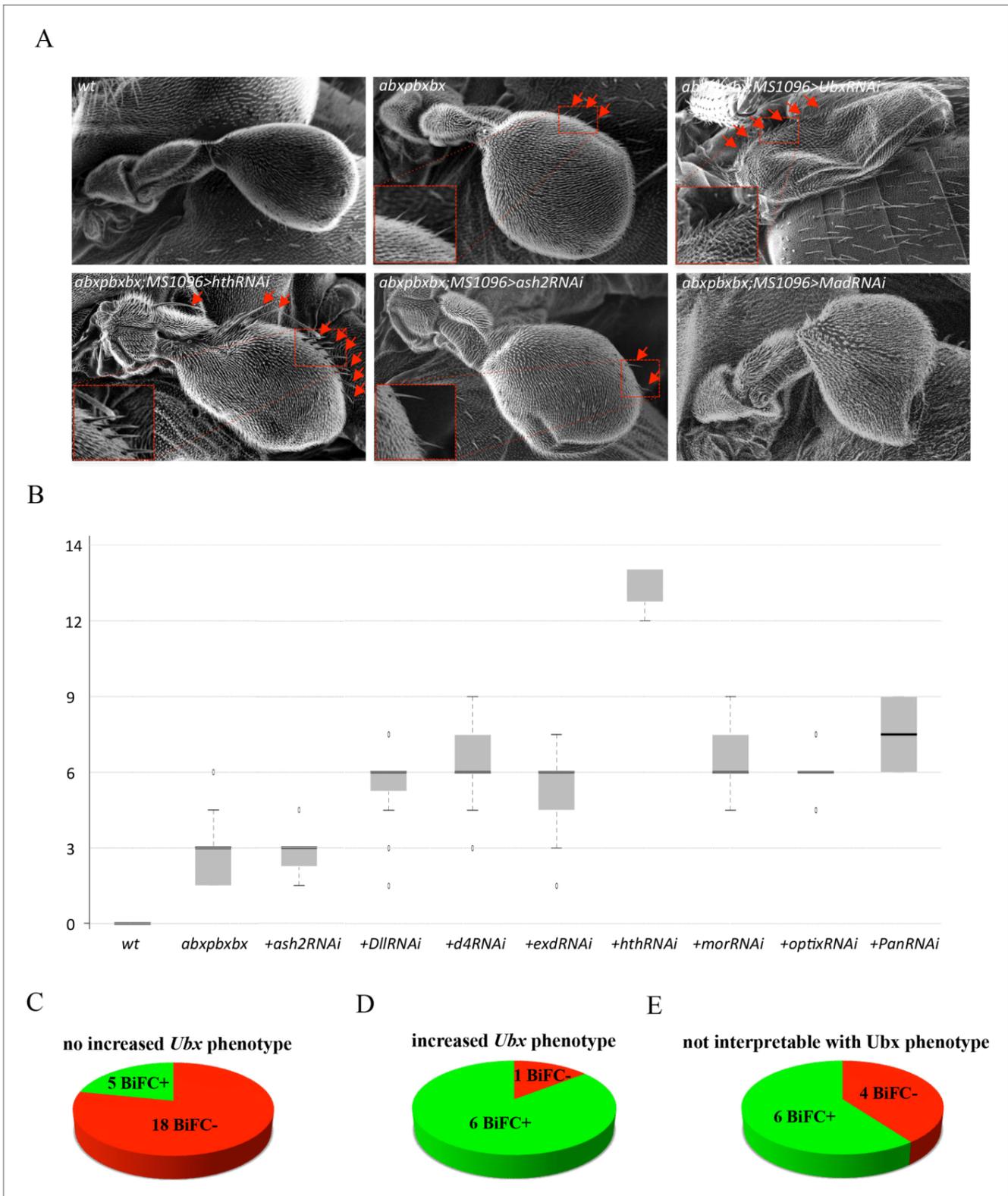


Figure 5. Functional genetics validates BiFC observations with *Ubx* in haltere primordium. (A) Scanning electron microscopy of haltere phenotypes in the different genetic backgrounds, as indicated. Compared to wild-type, halteres of individuals heterozygous for the Hox regulatory mutation *abxpbxbx* have ectopic short wing-like hairs (arrows and zoom in/enlargement in B). This phenotype is increased when affecting *Ubx* expression upon expression of RNAi or when expressing a RNAi against a TF (although to a lesser extent: shown here for *Homothorax*, *Hth*) that could be required for *Ubx* function. Figure 5 continued on next page

Figure 5 continued

(arrows and enlargements). In contrast, expression of RNAi against a TF that is not required for Ubx function (as shown for *absent_small_or_homeotic_discs_2*, *ash2*) does not increase the phenotype. The expression of RNAi against TFs can also affect more globally the haltere (and wing) formation (as shown for *Mad*), which is difficult to interpret in term of homoeotic transformation and therefore with regard to a potential Ubx cofactor function. (B) Box plot statistical quantification of the haltere-to-wing transformations in the different genetic backgrounds, as indicated. Quantification was performed by counting the number of ectopic wing-like hairs formed at the edge of the haltere and on the hinge. The phenotype induced by the *Ubx*RNAi was voluntarily not included since it corresponds to an almost complete haltere-to-wing transformation. (C-E) Diagrams showing the distribution of TFs that were BiFC positive (green) and negative (red) with Ubx in the different cases (not increased haltere phenotype (C); increased haltere phenotype (D); not interpretable (E)). See also **Supplementary file 6**.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.38853.019>

program. Finally, RNAi against 10 TFs led to malformations that were difficult to interpret with regard to a potential role as Ubx cofactor since the morphological defects could also be independent of a Ubx cofactor function. An illustrative phenotype is given with a RNAi against the TF *Mad* (**Figure 5A**). Because of this ambiguous putative role, these TFs were not further considered (**Figure 5E** and black boxes in **Supplementary file 6**).

Overall, the haltere sensitized genetic background highlighted that 80% (25/31) of the selected TFs that give an interpretable phenotype were correlated to the BiFC interaction status. Thus, results obtained from the BiFC screen in the embryo could be reproduced at the functional level in another developmental context.

Using the multicolor BiFC library for analyzing two different PPIs in the same embryo

In addition to large-scale interaction screens, the multicolor BiFC library aims at providing new perspectives for the analysis of individual PPIs *in vivo*. In particular, the ORF-CC library allows performing Venus- and Cerulean-based BiFC, therefore analyzing two different PPIs in the same embryo. This so-called 'multicolor' property was established in live cells (*Hu and Kerppola, 2003*) and recently extended for use in live *Drosophila* embryos (*Hudry et al., 2011*).

Here we asked whether the multicolor BiFC library could be used for analyzing two different PPIs simultaneously. This potential was more precisely examined in the context of a well-known partnership between *AbdA* and the cofactor *Extradenticle* (*Exd*). *Exd* belongs to the PBC class of TALE (Three Amino Acids Loop Extension) TFs (*Mukherjee and Bürklin, 2007*). PBC proteins constitute an ancestral and generic class of Hox cofactors, and the activity of Hox-PBC complexes has been described in numerous developmental contexts (*Mann et al., 2009*). In particular, the partnership between *AbdA* and *Exd* is involved in early (e.g., patterning) and late (e.g., gut morphogenesis) developmental processes during *Drosophila* embryogenesis, suggesting that a number of TFs could interact with the two proteins, potentially participating in the activity of *AbdA/Exd* complexes (**Figure 6A**).

In order to identify such partners, we considered a set of 37 TFs fused to VN and previously described to be positive with VC-*AbdA* (*Baëza et al., 2015*) and this work: **Supplementary file 7**). This set of TFs was tested with the VC-*Exd* fusion protein and BiFC was analysed in the epidermis of stage 10 embryos with the *abdA-Gal4* driver, as previously described (*Duffraisse et al., 2014*). Results showed that 22/37 TFs were positive with *Exd* (**Figure 4—figure supplement 8**, **Figure 6—figure supplements 1** and **2** and **Supplementary file 7**), highlighting that a small majority of *AbdA*-positive interactions (59%) was also positive with *Exd*, but also that an important proportion of *AbdA* interactions (41%) might occur independently of the partnership with *Exd* *in vivo*.

We next selected four TFs (*Tin*, *CtBP*, *Distalless* (*Dll*) and *Bagpipe* (*Bag*)) that were positive with *AbdA* and *Exd* and present in the ORF-CC library to perform bicolour BiFC. An additional TF, *Empty spiracles* (*Ems*), which was positive with *AbdA* (*Baëza et al., 2015*) and **Figure 4—figure supplement 3**) but negative with *Exd* (**Figure 6—figure supplement 2**), was also considered for the specificity control. The corresponding ORF-CC fusions were expressed together with CN-*AbdA*, VN-*Exd* and a mCherry reporter to trace *Gal4*-expressing cells in the embryo. Analysis with *Ems*-CC confirmed the respective positive or negative interaction status with *AbdA* or *Exd*, validating the specificity of BiFC upon the co-expression of the three fusion proteins in the same embryo (**Figure 6B**). Analysis with the four other TFs showed that the majority of expressing nuclei (as assessed with the

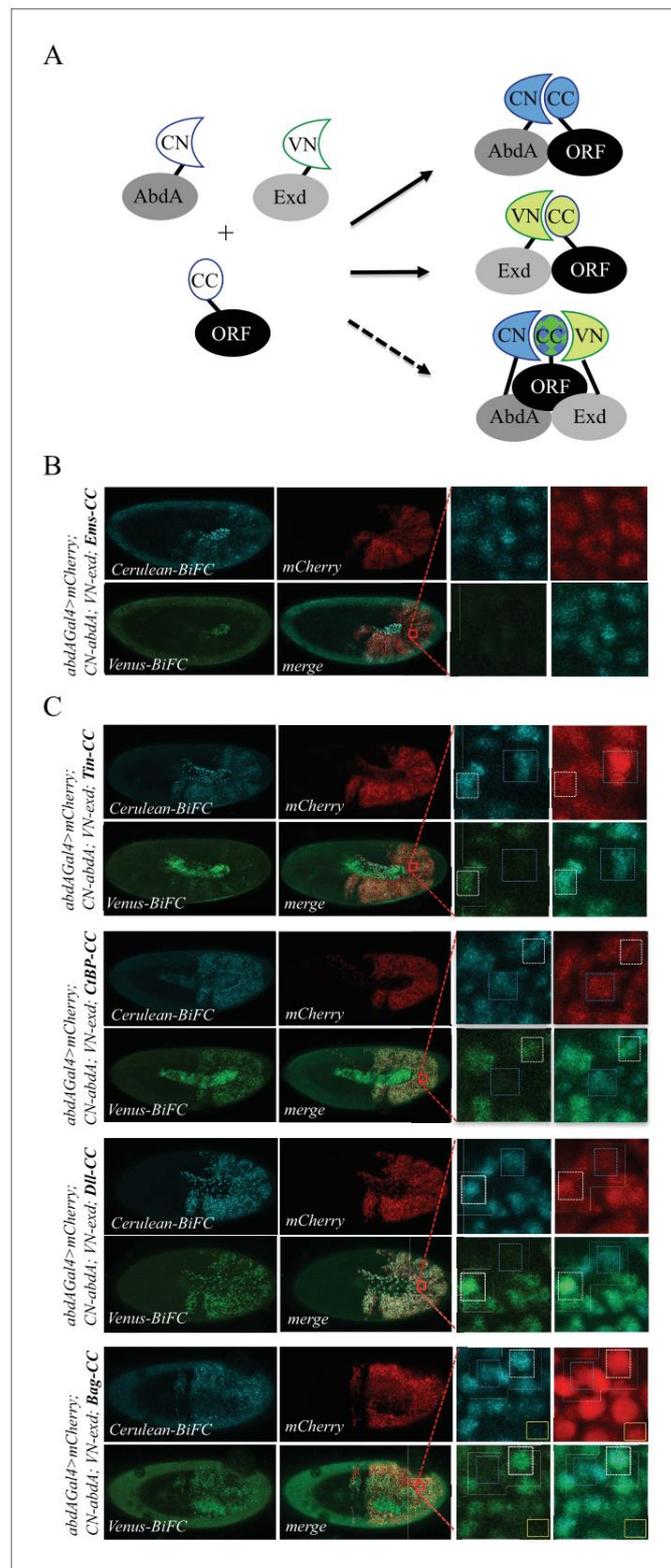


Figure 6. Using the multicolour BiFC library for analysing two different interactions in the same embryo. (A) Principle of the bicolour BiFC. The AbdA and Extradenticle (Exd) cofactor are respectively fused to the CN or VN fragment, which can complement with the CC fragment of a co-expressed ORF when interaction occurs. The simultaneous expression of the three fusion proteins allows assessing Venus- and Cerulean-based BiFC in the *Figure 6 continued on next page*

Figure 6 continued

same cell. Bicolour BiFC results from the interaction of the ORF-CC with both CN-AbdA and VN-Exd, thus revealing two binary interactions simultaneously. BiFC could result from interactions occurring in two independent complexes but potentially also in the context of a trimeric complex (dotted arrow) *in vivo*. (B) Illustrative confocal capture of stage 10 embryo expressing Empty spiracles (Ems) fused to CC, together with CN-AbdA and VN-Exd fusion proteins, as indicated. BiFC is only occurring between AbdA and Ems, as expected from previous observation. (C) Illustrative confocal captures of stage 10 embryos expressing CN-AbdA, VN-Exd and ORF-CC constructs, as indicated in the different panels (Tin: Tinman; CtBP; Distalless, Dll; Bagpipe, Bag). Enlargements are provided in each case. White-dotted boxes depict nuclei where the ORF-CC interacts with both AbdA and Exd. Blue-dotted boxes depict nuclei where the ORF-CC interacts only with AbdA. Yellow-dotted boxes depict nuclei with absence of interaction. Fusion proteins are under the control of the *abdA-Gal4* driver. All expressing cells are recognized with the mCherry reporter. See also **Figure 6—figure supplements 1–3** and **Supplementary file 7**.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.38853.020>

The following figure supplements are available for figure 6:

Figure supplement 1. Illustrative confocal pictures of BiFC between ORF-VN and VC-Exd, as indicated.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.38853.021>

Figure supplement 2. Interaction properties of Extradenticle (Exd) with a set of 37 TFs that are positive with AbdA.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.38853.022>

Figure supplement 3. Adding the sfGFP to the fluorescence repertoire of the multicolour BiFC library.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.38853.023>

mCherry reporter) were positive for both green and blue fluorescent signals, thus demonstrating that simultaneous bicolor BiFC was efficient with different types of TFs in the live *Drosophila* embryo (**Figure 6C**). Interestingly, a close-up in the embryo revealed that several nuclei were only positive in the Cerulean channel, indicating a specific positive interaction status with AbdA (blue-dotted boxes in **Figure 6C**). Green-only nuclei could not be found in the case of the four positive TFs, although Exd is expressed at the same level as AbdA. This suggests that BiFC with Exd is dependent on the concomitant interaction with AbdA and could therefore not be revealed outside AbdA/Exd complexes. Few red-positive nuclei were also negative for the two fluorescent signals (as illustrated with the yellow box in the case of Bag-CC in **Figure 6C**), highlighting that the interaction with both AbdA and Exd was actively inhibited in these specific nuclei.

Together, these observations confirm that the ORF-CC library is compatible for performing bicolor BiFC, providing a unique opportunity to reveal and investigate cell-specific regulatory mechanisms of two different PPIs *in vivo*.

Since the CC fragment is compatible for doing BiFC with the N-terminal fragment of Venus and Cerulean, we tested whether it could also complement with the N-terminal fragment of an additional GFP-derived protein called super-folder GFP (sfGFP). BiFC with sfGFP is described to rely on the complementation property between a long N-terminal fragment of 214 residues (sfGFPN) and a short C-terminal fragment of 19 residues (sfGFPC, [Zhou *et al.*, 2011]). In addition to having distinct spectral properties from Venus and Cerulean (**Figure 6-figure 3**), sfGFP has also a shorter maturation time (Zhou *et al.*, 2011).

Here, we tested the complementation between sfGFPN and CC fragments by considering five TFs that were positive with Exd in our previous BiFC analyses. The sfGFPN fragment was fused at the N-terminus of Exd, making a sfGFPN-Exd fusion protein with the same fusion topology as previously done with the VN fragment (Materials and methods). BiFC was analyzed with excitation and emission wavelengths of the sfGFP. Results showed that the sfGFPN-Exd fusion protein could complement with the CC fragment in the case of all five tested TFs (**Figure 6—figure supplement 3**). Moreover, fluorescent signals were of similar brightness (**Figure 6—figure supplement 3**) and maturation time when compared to signals obtained with VN-Exd. Finally, since the sfGFPN and sfGFPC fragments are described as having a strong auto-affinity (Zhou *et al.*, 2011), we also performed BiFC with the negative control Ems-CC. No fluorescent signal was obtained between Ems-CC and sfGFPN-Exd (**Figure 6—figure supplement 3**), confirming that the affinity between the sfGFPN and CC fragments is not strong enough to artificially induce complex formation between the two non-interacting proteins. Together these results establish yet another novel combination of fragment

complementation for BiFC, adding to the fluorescence repertoire that can be used with the multi-color BiFC library.

Using the multicolor BiFC library to visualize PPIs in the overlapping endogenous expression domains

The multicolor BiFC library is under the control of UAS sequences. Pilot tests were performed as previously described (Hudry et al., 2011; Baěza et al., 2015), using a unique Gal4 driver that reproduces the expression domain of the Hox protein Ubx in the embryo (Figure 7A). The same rationale could be applied with a Gal4 driver reproducing the expression profile of the ORF (Figure 7B).

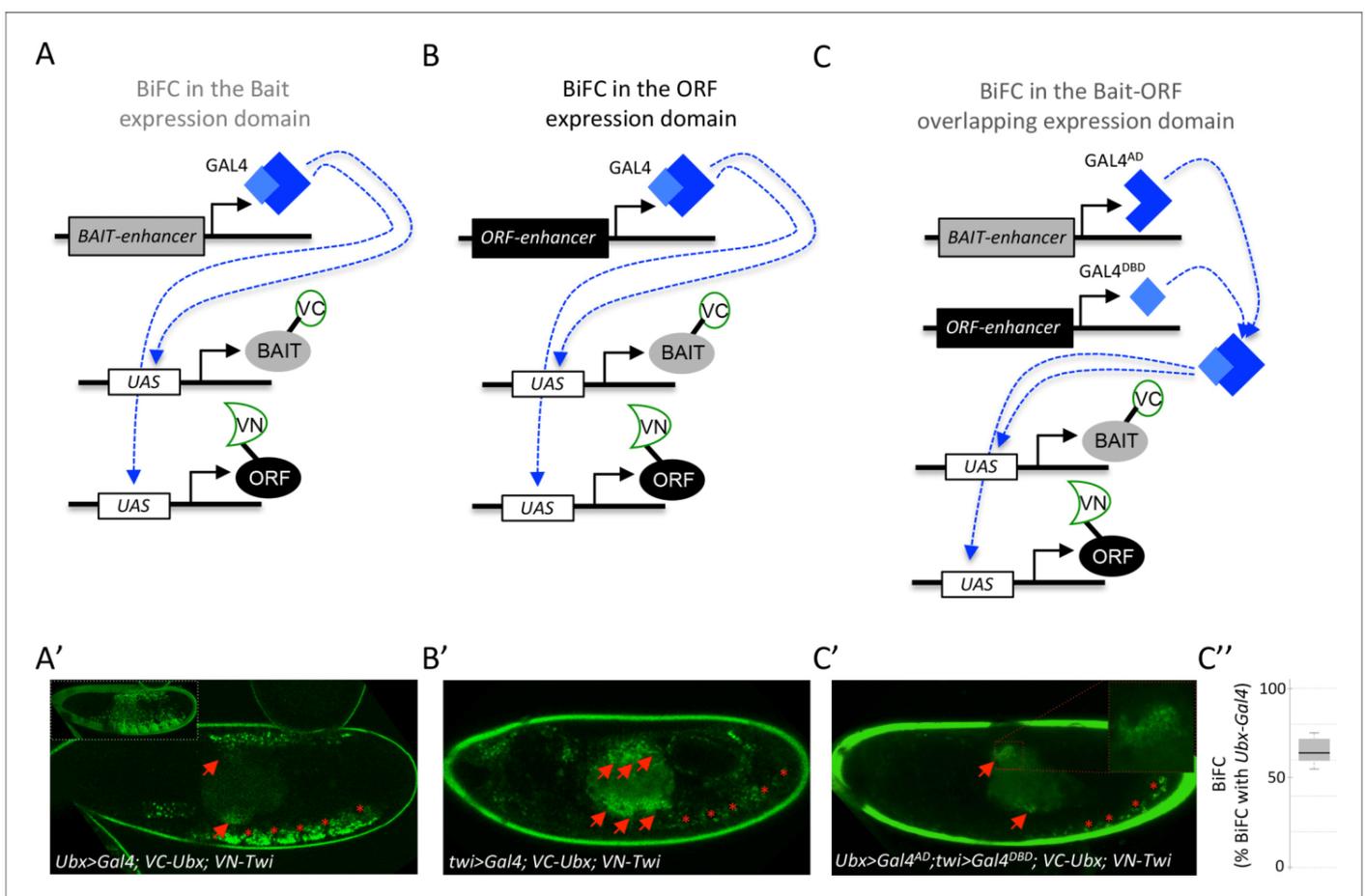


Figure 7. Coupling the multicolor BiFC library to the split-Gal4 system to visualize interactions in the overlapping expression domain of the two protein partners. (A) Principle of BiFC with a unique Gal4 driver reproducing the expression profile of the bait protein (for example *Hox-Gal4* driver). (B) Principle of BiFC with a Gal4 driver reproducing the expression profile of the ORF. (C) Principle of BiFC upon the independent expression of Gal4 moieties (Gal4^{AD} and GAL^{DBD}) by using two different enhancers from the bait- or ORF-encoding gene. This system allows producing a functional Gal4 protein in the overlapping expression domain of the two enhancers, therefore assessing BiFC in cells that normally express both the bait and the ORF. (A') Illustrative confocal picture of BiFC obtained upon the expression of Ultrabithorax (Ubx) and Twist (Twi) fusion proteins by using the *Ubx-Gal4* driver. Confocal acquisitions were specifically obtained at the level of the visceral mesoderm to better highlight BiFC signals in the midgut (red arrow). Red stars depict signals in the somatic mesoderm. Insert shows acquisition of BiFC signals in the epidermis. (B') Illustrative confocal picture of BiFC obtained upon the expression of Ubx and Twi fusion proteins by using the *twi-Gal4* driver. Confocal acquisitions were specifically obtained at the level of the visceral mesoderm. BiFC is occurring in the entire visceral mesoderm of the midgut (red arrows). Fluorescence is also occurring in cells of the somatic mesoderm (red stars). (C') Illustrative confocal picture of BiFC obtained upon the expression of Ubx and Twi fusion proteins by using the split-Gal4 (*Ubx-Gal4^{AD}/twi-Gal4^{DBD}*) system. BiFC is occurring in the same specific part of the midgut as in A' (enlargement on fluorescent nuclei is shown) and in few cells of the somatic mesoderm. C''. Quantification of the fluorescence intensity obtained in the visceral mesoderm with the split-Gal4 system (using the fluorescence intensity obtained in the same tissue with the *Ubx-Gal4* driver as a reference value). See also **Supplementary file 9**.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.38853.024>

Under these conditions, BiFC signals are visualized in the expression domain of only one interacting partner. Assessing BiFC in a context where the two candidate partners are expressed in their endogenous domains could therefore improve the confidence in the interpretation.

We have explored this direction by considering the split-Gal4 system (Luan *et al.*, 2006), which consists in reconstituting an active Gal4 protein upon association of two separate Gal4-DNA-binding (Gal4^{DBD}) and Gal4-activation (Gal4^{AD}) domains. This property can be used to activate any UAS-driven gene in cells that will independently co-express the Gal4^{DBD} and Gal4^{AD} moieties, for example under the control of two different enhancers (Luan *et al.*, 2006). We reasoned that the split-Gal4 system could be used to assess BiFC specifically in the overlapping expression domain of the two candidate partners (Figure 7C). This strategy implies having enhancers that could reproduce the expression profile of each candidate partner and that are available for Gal4^{DBD} and/or Gal4^{AD} expression. A number of enhancers have been used for this purpose in the *Janelia* fly line collection (<https://www.janelia.org/project-team/flylight>). In addition, Mimic transposons have also been designed to be compatible with the split-Gal4 system (Venken *et al.*, 2011; Nagarkar-Jaiswal *et al.*, 2015). Altogether these genetic tools allow BiFC to reproduce the expression of thousands of genes in *Drosophila* using the split-Gal4 system.

Here the suitability of the split-Gal4 system with BiFC was tested by considering the interaction revealed between Ubx and the mesodermal TF Twist (Twi) (Baëza *et al.*, 2015). We used two enhancers from the *Janelia* collection that could recapitulate the expression profile of either Ubx or *twi* in the embryo. Each enhancer was first tested with the classical UAS/Gal4 system. Driving VC-Ubx and VN-Twi constructs with Ubx-Gal4 led to prominent BiFC in the epidermis (insert in the Figure 7A'), but also to signals in the somatic mesoderm (red stars in the Figure 7A') and in a specific part of the midgut (red arrows in the Figure 7A'). Expression of VC-Ubx and VN-Twi with the *twi*-Gal4 driver led to BiFC in the entire midgut (red arrows in the Figure 7B') and in cells of the somatic mesoderm (red stars in the Figure 7B'). The same Ubx and *twi* enhancers were engineered with the split-Gal4 system, and were used to respectively express the Gal4^{AD} or Gal4^{DBD} moiety. In this genetic context, BiFC signals could be detected in few cells of the somatic mesoderm (red stars in the Figure 7C') and in a localized region of the midgut, as previously observed with the Ubx-Gal4 driver (red arrows and highlighted in the enlargement of Figure 7C'). Signals obtained with the combined split-Gal4 system are weaker than signals obtained with each individual Gal4 driver, as exemplified in the midgut when comparing with Ubx-Gal4 (Figure 7C''). This could be explained by the diminished activation activity of the reconstituted Gal4 protein when compared to intact Gal4 (Luan *et al.*, 2006). In any case, this result confirms that the split-Gal4 system can be used with the multicolor BiFC library to analyze PPIs in the overlapping expression domain of the two interacting partners *in vivo*, allowing reproducing more closely the endogenous interaction.

Discussion

A ready-to-use fly library for analyzing the interactions of hundreds of TFs *in vivo*

We present a new fly line library called multicolor BiFC library that currently allows using 450 TFs for testing PPIs *in vivo*. This library contains two different sets of fly lines. The first set contains 232 TFs fused to VN and derives from previous work (Hudry *et al.*, 2011; Baëza *et al.*, 2015) or from swapping experiments with the original FlyORF library. Although swapping experiments were performed for TF-encoding ORFs, it should be noticed that the FlyORF library actually covers around 3000 ORFs and is therefore not limited to TFs only. Proof of principles described with the VN-swapping fly lines could apply to many more ORFs since BiFC is compatible with different types of proteins. Moreover, using the complementary VC-swapping fly line (Bischof *et al.*, 2013) enables the full repertoire of the FlyORF library to be used for Venus-based BiFC in *Drosophila*.

The second set of the multicolor BiFC library consists of 326 ORF-CC constructs that are compatible with the first set of ORF-VN fly lines for doing Venus-based BiFC. ORF-CC fly lines are also compatible for doing Cerulean- or sfGFP-based BiFC with a CN- or sfGFPN-fused bait protein, respectively. This property allows multicolor BiFC experiments, which was here demonstrated with the analysis of interaction properties of different TFs in the context of the AbdA/Exd partnership.

The multicolour BiFC system provides an unprecedented opportunity to dissect cell-specific regulatory mechanisms involving three interacting proteins *in vivo*.

BiFC library enables high-confidence large-scale interaction screens

Among the 260 TFs that have been used for the large-scale interaction screen, 35 were tested in fusion with VN or CC to assess for reproducibility of BiFC when using a different complementation strategy (**Supplementary file 8**). This analysis showed that only 2/35 TFs (Hr83 and Ravus) did not reproduce the same result with VC-AbdA or VN-AbdA (**Supplementary file 8**). This observation highlights that the fusion topology is of minor incidence (6%) for causing false negatives, suggesting that PPIs are rarely completely abolished by inappropriate BiFC fusion topologies. In addition, it should be noted that the AbdA (and Ubx) fusion proteins used in this study were originally generated with an exaggerated short linker region (three residues long) to better measure the potential influence of fusion topologies when establishing BiFC in *Drosophila* (**Hudry et al., 2011**). Using bait proteins fused to the Venus or Cerulean fragment with a more classical linker region (GGSGGG) could further diminish the influence of the fusion topology without increasing the risk of revealing indirect PPIs.

Our screen revealed that half of the 260 TFs could interact with Ubx or AbdA. As expected, a large proportion of the positive interactions (71%) were common to the two Hox proteins, which reflects their ability to control a number of identical developmental processes during embryogenesis. This hypothesis is supported by the observation that common interactions were not so frequent between Ubx and a more divergent Hox protein like Sex combs reduced (40% of common interactions among 35 tested TFs [**Baëza et al., 2015**]), or between AbdA and Exd (59% of common interactions among 37 tested TFs).

The diversity of positive TFs reflects the likely high potential of Hox proteins to engage in many different types of interactions *in vivo*, as previously shown for Ubx (**Bondos et al., 2006**). In addition, activators or repressors were equally enriched in Ubx and AbdA interactomes, highlighting that Hox proteins are involved in both positive and negative regulation of transcription. The screen was performed with a unique *Hox-Gal4* driver and therefore in conditions that do not reproduce the expression profile of the tested ORF. Despite this, we found that TFs that are endogenously more frequently co-expressed with Ubx and AbdA during embryogenesis were significantly enriched among the positive interactions.

Specificity of the BiFC screen was further demonstrated by the identification of several interactions that were exclusive to either Ubx or AbdA. Interestingly, the AbdA-specific interactome was significantly enriched in TFs that are expressed in tissues (gonad, heart) or cells (oenocytes) with known AbdA-specific functions.

Finally, the functional analysis of a selected pool of TFs expressed in the haltere disc showed that 80% of the interpretable phenotypes (25/31 TFs) were consistent with the interaction status found by BiFC in the embryo.

Altogether these results confirm that the multicolor BiFC library is suitable for performing large-scale interaction screens and revealing specific interactomes even for two closely related bait proteins.

Suggestions for fine-tuning the specificity of the multicolor BiFC library screens

The multicolor BiFC library relies on the inducible UAS/Gal4 expression system, and caution should be taken regarding expression levels since high doses of protein expression could lead to artificial positive signals (**Kerppola, 2008**). Nevertheless, we recommend using a unique Gal4 driver in the case of a large-scale interaction screen. Ideally, this driver should derive from a *P-Gal4* insertion that will affect the expression of the bait-encoding gene, as done here with the *Ubx-Gal4* or *abdA-Gal4* driver. This genetic context allows expressing the bait protein at normal levels while eliminating one dose of endogenous competitive gene product. Furthermore, expressing the cofactor in cells that do not contain the corresponding endogenous gene product allows doing BiFC in the absence of competition, therefore increasing assay sensitivity. Here interactions were analyzed in the epidermis, which is an easily accessible tissue with low fluorescent background. The epidermis was previously shown to be tolerant for interactions with many different types of TFs (**Baëza et al., 2015**). The *Hox-*

Gal4 expression domain is also large in the epidermis, making it an ideal tissue for a large-scale interaction screen. By comparison, the split-Gal4 system will not provide a better resolution since it will reproduce the expression pattern of only one cofactor with the bait protein. Therefore, not all potential interactors will be observed in their normal domain. In addition, the split-Gal4 system is less active and not compatible with *P-Gal4* insertions. In conclusion, we recommend using a bait-Gal4 driver derived from a *P-Gal4* insertion for performing a large-scale BiFC interaction screen and doing competition experiments (this work and [Baëza et al., 2015]) for validating the specificity of BiFC. Mutations affecting the interaction potential of the bait protein can also be used as a specificity control, as previously shown with mutated Hox proteins (Baëza et al., 2015), and the interaction confirmed by alternative methods such as co-immunoprecipitation (Baëza et al., 2015).

We showed that the interaction could be confirmed in the relevant developmental context in vivo by doing BiFC with the split-Gal4 system. In particular, the split-Gal4 system was used to visualize BiFC specifically in the overlapping expression domain of Ubx and Twi. The large number of fly lines compatible with the split-gal4 system makes this system very attractive for the future use of the multicolor BiFC library. Along the same line, the Janelia and Mimic collections propose hundreds of fly lines compatible with the LexAop/LexA-AD induction system. This expression system is also compatible with the multicolor BiFC library since UAS sequences of ORF-VN and ORF-CC constructs are swappable with LexAop sequences upon FLP/FRT-mediated recombination (Bischof et al., 2014). The two candidate partners could then be expressed independently and in their respective domain by using the UAS/Gal4 system on the one side, and the LexAop/Lex-AD system on the other side. In this context, BiFC will only be analyzed in the overlapping expression domain of the two partners, as described with the split-Gal4 system. Since the ORF-CC library is inserted on the second chromosome, we have generated another LexAop-swapping fly line that is compatible for FRT-mediated recombination with this chromosome (see Materials and methods).

In conclusion, the versatile inducible expression systems for thousands of enhancers in *Drosophila* and the multicolor BiFC library enable selection of biologically relevant conditions that better recapitulate the endogenous expression profile of each candidate partner, thus maximizing specificity and providing an unprecedented combination of possibilities for large-scale and/or in depth analysis of PPIs in a live animal organism.

Materials and methods

Plasmid constructions

Cloning of pTSVNm9short.attB

The FRT2-VNm9short fragment was PCR-amplified from plasmid pTSVNm9.attB with forward primer FRT2-VN-F (5'-TATGGATCCGAAGTTCCTATTCTCTACTTAGTATAGGAACCTTCGATGGTGAGCAAGGGCG-3') and reverse primer tub-R2 (5'-ACACTGATTCGACGGTTACC-3'), thereby eliminating a stretch of 12aa between FRT2 and VNm9 and introducing flanking restriction sites BamHI and NotI. Plasmid pTSeGFP.attB (without the yellow marker insert) was digested with BamHI-NotI and the shortened FRT2-VNm9short fragment was inserted. Finally, the yellow marker gene was inserted via the XhoI site downstream of the fragment, resulting in pTSVNM9short.attB (for additional cloning details see [Bischof et al., 2013]).

Cloning of pTSCN.attB

The N-terminal part of Cerulean (CN) including the FRT2 site was PCR-amplified from the Cerulean cDNA (Shyu et al., 2006; Hudry et al., 2011) with forward primer FRT2-VN-F (5'-TATGGA TCCGAAGTTCCTATTCTCTACTTAGTATAGGAACCTTCGATGGTGAGCAAGGGCG-3') and reverse primer Not-CN-R (5'-ATAGCGGCCGCctaGGTGATATAGACGTTGTGCG-3'), thereby introducing BamHI and NotI sites. Note, the start sequence of the N-terminal end of Venus and Cerulean is identical. Subsequently, the CN fragment and the yellow marker were introduced into pTSeGFP.attB the same way as described above, generating plasmid pTSCN.attB.

Cloning pGW-CC.attB

To generate this plasmid, the 3 HA tag from pGW-HA.attB (Bischof et al., 2013) was replaced with the C-terminal portion of Cerulean (CC). In brief, fragment CC was PCR-amplified from the Cerulean

cDNA with primers CC-F (5'-ATAGGTACCTGCCGACAAGCAGAAGAACG-3') and CC-R (5'-TATGC TAGCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG-3'). Note, in this construct no FRT2 sequence was included in front of the Cerulean fragment, as no swapping experiments are intended with the subsequent fly lines resulting from this construct. The CC fragment was inserted into pGW-HA.attB with KpnI-NheI digestion, thus releasing FRT2 fragment and 3xHA tag and generating plasmid pGW-CC.attB.

Creating the TF-ORF-CC plasmid library

A detailed description of the involved Gateway cloning steps to generate such a library can be found in previous publications (Bischof et al., 2013; Bischof et al., 2014). In brief, the *Drosophila* transcription factor collection in the pDONR221 vector (Hens et al., 2011) was used as a source for the ORFs. From this collection the TFs were shutteled (Gateway subcloned) into the *Drosophila* expression vector pGW-CC.attB, thus fusing the ORF to the CC tag and equipping them with UAS regulatory promoter elements.

Cloning of sfGFPN-Exd in pUASTattB

The N-terminal fragment of sfGFP (sfGFPN : residues 1–214 [Zhou et al., 2011]) was PCR amplified from the sfGFP cDNA and cloned in place of VN in the original VN-Exd construct in pUASTattB between EcoRI and XhoI restriction sites (Hudry et al., 2011).

Generation of fly strains

For all germline transformation experiments we used the Φ C31 integrase-mediated site-specific integration method.

Generation of individual fly strains for promoter or tag swapping

TSVNm9short-86Fb, *TSCN-86Fb* strains: The constructs pTSVNM9short.attB and pTSCN.attB were injected into line Φ X-86Fb. Transgenic offspring was made homozygous for these transgenes and combined with an X chromosome-linked hsp70-flp construct. These strains provide either the Venus N-terminal tag or the Cerulean N-terminal tag for a swapping event at the 3' end of any UAS-ORF strain from FlyORF that is based on cloning with pGW-HA.attB.

For the *PSlexO-21F* strain the pPSlexO.attB plasmid was injected into line Φ X-21F, again followed by balancing the strain for the transgene and providing the hsp70-flp construct on the X-chromosome. This strain can be used to exchange the UAS-regulated promoter of the TF-ORF-CC library (at location 21F) for a lexA operator (lexO) promoter (Bischof et al., 2013; Bischof et al., 2007).

Creating a transcription factor cerulean tagged fly library (UAS-ORF-CC) on the second chromosome

The individual UAS-ORF-CC plasmids were combined in small pools and injected into Φ X-21F. Transgenes that were not recovered after outcrossing and PCR identification were re-pooled and injected again. The PCR identification for this library was done by single-fly PCR and Sanger sequencing into the 5' region of the genes. Individual stocks were created with balancer line (y^w ; *Bc gla/SM6 a*). Pool injection, transgene identification and stock generation were described in detail previously (Bischof et al., 2013; Bischof et al., 2014).

Swapping procedures: exchange of 3xha tag for VNm9 or VNm9short

The presence of the mutated FRT2 site downstream of the ORF was used to replace the 3xHA tags of FlyORF lines for the Venus tags VNm9 or VNm9short. In brief, the ORF-3xHA lines were crossed to flies carrying a swap construct together with the hsp-flp transgene. After heat-shock treatment and outcrosses the swapping events (FLP/FRT-mediated in vivo events) can easily be tracked by screening for a specific marker combination, i.e. y^+ + w^+ for a C-terminal tag exchange. This procedure was described in detail previously (Bischof et al., 2013; Bischof et al., 2014).

Fly lines availability

Fly lines generated for the project will be deposited in the FlyORF library and are available upon request to FlyORF (<https://flyorf.ch/index.php/orf-collection>)

BiFC analysis

Fly crosses, embryo preparation and BiFC observation in live embryos were performed as previously described (Hudry *et al.*, 2011; Baéza *et al.*, 2015). Quantification of BiFC in the **Figure 7C** was specifically performed in the visceral mesoderm. Briefly, observations were done at least two or three times (from two different overnight egg laying periods) with wild-type or mutated Hox proteins, respectively. BiFC signals with wild type Hox proteins were considered as positive when the intensity was above the fluorescent background and reproducible in the expected proportion of embryos from independent preparations (around 200 embryos were mounted in each case for confocal observation). Fluorescence intensities are strongly fluctuating from one TF to another, which could be due to the influence of the fusion topology and/or a real variation in interaction affinity with the Hox protein. Identical parameters of confocal acquisition were applied with mutated Hox proteins or in competition experiments.

Fly stocks

The *Ubx-Gal4* and *abdA-Gal4* lines were previously used (Hudry *et al.*, 2011). UAS-ORF-HA fly lines used for swapping and competition experiments are from the FlyORF library (Bischof *et al.*, 2013). *Ubx-Gal4^{AD}* and *twi-Gal4^{DBD}* are from Janelia (Bloomington stock numbers 70646 and 68953 respectively). RNAi against TFs are from Bloomington and were expressed with the *MS1096* driver combined or not with UAS-dicer in individuals heterozygous for the *abxpbxbx* mutation, which affects *Ubx* expression in the haltere disc (de Navas *et al.*, 2011). The transgenic BiFC library lines will be available from FlyORF (<http://www.flyorf.ch>).

Statistical analyses

Wilcoxon statistical tests were performed by using Python and R in-house scripts. Quantification of ectopic wing-like hairs in the haltere was shown by boxplot representation using RSoftware. Boxplot depicts the smallest value, lower quartile, median, upper quartile, and largest value for each condition.

Acknowledgements

We thank the Bloomington stock center for fly lines and Bart Deplancke for sharing the TF ORF plasmid library and Cristina Bastos for assistance with injections. Work in the laboratory of S Merabet was supported by Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC, PJA20141202007), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM, DEQ20170336732), Ligue Nationale Contre le Cancer, Centre National de Recherche Scientifique (CNRS), CEFIPRA (5503–2), and Ecole Normale Supérieure (ENS) de Lyon. Work in the laboratory of K Basler was supported by the Swiss National Science Foundation.

Additional information

Competing interests

Johannes Bischof, Konrad Basler: Involved in maintaining and distributing the fly lines via the not-for-profit FlyORF project. There are no other competing interests to declare. Mikael Björklund: Involved in the development of the FlyORF resource. There are no other competing interests to declare. The other authors declare that no competing interests exist.

Funding

Funder	Grant reference number	Author
Fondation pour la Recherche Médicale	1122556	Johannes Bischof Marilyne Duffraisse Edy Furger Leiore Ajuria Guillaume Giraud Solene Vanderperre Rachel Paul Samir Merabet
Indo-French Centre for the Promotion of Advanced Research		Johannes Bischof Marilyne Duffraisse Edy Furger Leiore Ajuria Guillaume Giraud Solene Vanderperre Rachel Paul Samir Merabet

The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Author contributions

Johannes Bischof, Conceptualization, Resources, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing—review and editing; Marilyne Duffraisse, Data curation, Validation, Investigation, Visualization; Edy Furger, Resources, Data curation, Formal analysis, Methodology; Leiore Ajuria, Resources, Formal analysis, Validation, Investigation, Visualization, Methodology; Guillaume Giraud, Solene Vanderperre, Rachel Paul, Formal analysis, Visualization; Mikael Björklund, Resources, Data curation, Investigation, Writing—review and editing; Damien Ahr, Investigation, Visualization; Alexis W Ahmed, Lionel Spinelli, Christine Brun, Formal analysis, Methodology; Konrad Basler, Supervision, Funding acquisition; Samir Merabet, Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Supervision, Funding acquisition, Validation, Investigation, Visualization, Methodology, Writing—original draft, Project administration, Writing—review and editing

Author ORCIDs

Mikael Björklund [id http://orcid.org/0000-0002-2176-681X](http://orcid.org/0000-0002-2176-681X)

Christine Brun [id https://orcid.org/0000-0002-5563-6765](https://orcid.org/0000-0002-5563-6765)

Samir Merabet [id http://orcid.org/0000-0001-7629-703X](http://orcid.org/0000-0001-7629-703X)

Decision letter and Author response

Decision letter <https://doi.org/10.7554/eLife.38853.036>

Author response <https://doi.org/10.7554/eLife.38853.037>

Additional files**Supplementary files**

- Supplementary file 1. List of the 235 TFs of the multicolor BiFC library fused to the VN fragment at the C- or N-terminus, with a long or short linker region, as indicated. Note that several TFs are fused to VN with either a long or a short linker region.
DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.38853.025>

- Supplementary file 2. List of the 326 TFs of the multicolor BiFC library fused to the CC fragment. TFs highlighted in light green are also available as VN fusion constructs (see **Supplementary file 1**).
DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.38853.026>

- Supplementary file 3. List of the 260 VN- and CC-fusion TFs of the multicolor BiFC library that were tested with Ubx and AbdA.
DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.38853.027>

- Supplementary file 4. Expression profile of the 260 TFs that were tested with Ubx and AbdA among 25 different developmental contexts of the *Drosophila* embryo. Each color code corresponds

to a different tissue when expressed. Black boxes depict expression in tissues where Ubx and AbdA are not present. The last two columns indicate the number of co-occurrences of the TF and the Hox protein with regard to the total distribution (parentheses).

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.38853.028>

- Supplementary file 5. Analysis of the proportion of common and specific AbdA- and Ubx interactors expressed in the different tissues, as indicated.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.38853.029>

- Supplementary file 6. List of TFs tested in RNAi in Ubx heterozygous mutant haltere discs. Green and red boxes correspond to increased or not increased RNAi phenotypes, respectively. Black boxes correspond to RNAi phenotypes that could not be interpreted with regard to a potential Ubx cofactor function in the haltere disc (due to morphogenesis defects). Stars indicate RNAi fly lines that were tested with dicer. Stocks without the star are from the last generation and were tested without dicer.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.38853.030>

- Supplementary file 7. List of VN fusion TFs that were positive in BiFC tests with VC-AbdA and tested with VC-Exd. Green and red boxes indicate a positive or negative interaction status, respectively.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.38853.031>

- Supplementary file 8. List of the 35 TFs tested as VN or CC fusion constructs with VC-AbdA or VN-AbdA, respectively. Yellow boxes highlight the two TFs that showed opposite interaction status in the context of the two different fusion topologies (Hr83 and Ravus).

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.38853.032>

- Supplementary file 9. Quantification of BiFC resulting from the overlap between twi- and Ubx-Gal4 drivers in the visceral mesoderm.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.38853.033>

- Transparent reporting form

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.38853.034>

Data availability

Fly lines generated for the project have been deposited to the FlyORF library and are available upon request to FlyORF (<https://flyorf.ch/index.php/orf-collection>). The numerical, processed data used for this study is provided in the manuscript, figures and supplementary files.

References

- Ahn JH, Yoo S, Park HJ, Jung KI, Kim SH, Jeon SH. 2010. *Drosophila castor* is regulated negatively by the Ubx and abdA genes, but positively by the AbdB gene. *The International Journal of Developmental Biology* **54**: 1251–1258. DOI: <https://doi.org/10.1387/ijdb.093037ja>, PMID: 20563987
- Baëza M, Viala S, Heim M, Dard A, Hudry B, Duffraisse M, Rogulja-Ortmann A, Brun C, Merabet S. 2015. Inhibitory activities of short linear motifs underlie hox interactome specificity in vivo. *eLife* **4**:e06034. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.06034>
- Bagchi S, Fredriksson R, Wallén-Mackenzie Å. 2015. In situ proximity ligation assay (PLA). *Methods in Molecular Biology* **1318**: 149–159. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2742-5_15, PMID: 26160573
- Bischof J, Maeda RK, Hediger M, Karch F, Basler K. 2007. An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases. *PNAS* **104**:3312–3317. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0611511104>, PMID: 17360644
- Bischof J, Björklund M, Furger E, Schertel C, Taipale J, Basler K. 2013. A versatile platform for creating a comprehensive UAS-ORFeome library in *Drosophila*. *Development* **140**:2434–2442. DOI: <https://doi.org/10.1242/dev.088757>, PMID: 23637332
- Bischof J, Sheils EM, Björklund M, Basler K. 2014. Generation of a transgenic ORFeome library in *Drosophila*. *Nature Protocols* **9**:1607–1620. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.105>, PMID: 24922270
- Bondos SE, Tan XX, Matthews KS. 2006. Physical and genetic interactions link hox function with diverse transcription factors and cell signaling proteins. *Molecular & Cellular Proteomics* **5**:824–834. DOI: <https://doi.org/10.1074/mcp.M500256-MCP200>, PMID: 16455680
- Brodu V, Elstob PR, Gould AP. 2002. Abdominal A specifies one cell type in *Drosophila* by regulating one principal target gene. *Development* **129**:2957–2963. PMID: 12050142

- Chen M**, Li W, Zhang Z, Liu S, Zhang X, Zhang XE, Cui Z. 2015. Novel near-infrared BiFC systems from a bacterial phytochrome for imaging protein interactions and drug evaluation under physiological conditions. *Biomaterials* **48**:97–107. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.01.038>, PMID: 25701035
- Choo SW**, White R, 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. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014778>, PMID: 21483667
- Cusick ME**, Klitgord N, Vidal M, Hill DE. 2005. Interactome: gateway into systems biology. *Human Molecular Genetics* **14 Spec No. 2**:R171–R181. DOI: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi335>, PMID: 16162640
- Dai JP**, Zhao XF, Zeng J, Wan QY, Yang JC, Li WZ, Chen XX, Wang GF, Li KS. 2013. Drug screening for autophagy inhibitors based on the dissociation of Beclin1-Bcl2 complex using BiFC technique and mechanism of eugenol on anti-influenza A virus activity. *PLoS ONE* **8**:e61026. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061026>, PMID: 23613775
- de Navas LF**, Reed H, Akam M, Barrio R, Alonso CR, Sánchez-Herrero E. 2011. Integration of RNA processing and expression level control modulates the function of the *Drosophila* Hox gene Ultrabithorax during adult development. *Development* **138**:107–116. DOI: <https://doi.org/10.1242/dev.051409>, PMID: 21115609
- Duffraisse M**, Hudry B, Merabet S. 2014. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) in live *Drosophila* embryos. *Methods in Molecular Biology* **1196**:307–318. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1242-1_19, PMID: 25151172
- Elstob PR**, Brodu V, Gould AP. 2001. spalt-dependent switching between two cell fates that are induced by the *Drosophila* EGF receptor. *Development* **128**:723–732. PMID: 11171397
- Fan JY**, Cui ZQ, Wei HP, Zhang ZP, Zhou YF, Wang YP, Zhang XE. 2008. Split mCherry as a new red bimolecular fluorescence complementation system for visualizing protein-protein interactions in living cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **367**:47–53. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.12.101>, PMID: 18158915
- Gebelein B**, McKay DJ, Mann RS. 2004. Direct integration of Hox and segmentation gene inputs during *Drosophila* development. *Nature* **431**:653–659. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature02946>, PMID: 15470419
- Ghosh I**, Hamilton AD, Regan L. 2000. Antiparallel leucine Zipper-Directed protein reassembly: Application to the Green Fluorescent Protein. *Journal of the American Chemical Society* **122**:5658–5659. DOI: <https://doi.org/10.1021/ja994421w>
- Hammonds AS**, Bristow CA, Fisher WW, Weiszmann R, Wu S, Hartenstein V, Kellis M, Yu B, Frise E, Celniker SE. 2013. Spatial expression of transcription factors in *Drosophila* embryonic organ development. *Genome Biology* **14**:R140. DOI: <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-12-r140>, PMID: 24359758
- Hens K**, Feuz JD, Isakova A, Iagovitina A, Massouras A, Bryois J, Callaerts P, Celniker SE, Deplancke B. 2011. Automated protein-DNA interaction screening of *Drosophila* regulatory elements. *Nature Methods* **8**:1065–1070. DOI: <https://doi.org/10.1038/nmeth.1763>, PMID: 22037703
- Hu CD**, Chinenov Y, Kerppola TK. 2002. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Molecular Cell* **9**:789–798. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00496-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00496-3), PMID: 11983170
- Hu CD**, Kerppola TK. 2003. Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nature Biotechnology* **21**:539–545. DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt816>, PMID: 12692560
- Hudry B**, Viala S, Graba Y, Merabet S. 2011. Visualization of protein interactions in living *Drosophila* embryos by the bimolecular fluorescence complementation assay. *BMC Biology* **9**:5. DOI: <https://doi.org/10.1186/1741-7007-9-5>, PMID: 21276241
- Jach G**, Pesch M, Richter K, Frings S, Uhrig JF. 2006. An improved mRFP1 adds red to bimolecular fluorescence complementation. *Nature Methods* **3**:597–600. DOI: <https://doi.org/10.1038/nmeth901>, PMID: 16862132
- Kerppola TK**. 2008. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annual Review of Biophysics* **37**:465–487. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.37.032807.125842>, PMID: 18573091
- Kodama Y**, Hu CD. 2012. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC): a 5-year update and future perspectives. *BioTechniques* **53**:285–298. DOI: <https://doi.org/10.2144/000113943>, PMID: 23148879
- Lee OH**, Kim H, He Q, Baek HJ, Yang D, Chen LY, Liang J, Chae HK, Safari A, Liu D, Songyang Z. 2011. Genome-wide YFP fluorescence complementation screen identifies new regulators for telomere signaling in human cells. *Molecular & Cellular Proteomics* **10**:M110.001628. DOI: <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.001628>, PMID: 21044950
- Lee LY**, Wu FH, Hsu CT, Shen SC, Yeh HY, Liao DC, Fang MJ, Liu NT, Yen YC, Dokládal L, Sykorová E, Gelvin SB, Lin CS. 2012. Screening a cDNA library for protein-protein interactions directly in planta. *The Plant Cell* **24**:1746–1759. DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.112.097998>, PMID: 22623495
- Lewis EB**. 1978. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* **276**:565–570. DOI: <https://doi.org/10.1038/276565a0>, PMID: 103000
- Luan H**, Peabody NC, Vinson CR, White BH. 2006. Refined spatial manipulation of neuronal function by combinatorial restriction of transgene expression. *Neuron* **52**:425–436. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.08.028>, PMID: 17088209
- Mann RS**, Lelli KM, Joshi R. 2009. Hox specificity unique roles for cofactors and collaborators. *Current Topics in Developmental Biology* **88**:63–101. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(09\)88003-4](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(09)88003-4), PMID: 19651302
- Mann M**, Kulak NA, Nagaraj N, Cox J. 2013. The coming age of complete, accurate, and ubiquitous proteomes. *Molecular Cell* **49**:583–590. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.029>, PMID: 23438854

- Merabet S**, Ebner A, Affolter M. 2005. The Drosophila extradenticle and homothorax selector proteins control branchless/FGF expression in mesodermal bridge-cells. *EMBO Reports* **6**:762–768. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400462>, PMID: 16007069
- Miller KE**, Kim Y, Huh WK, Park HO. 2015. Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) Analysis: Advances and Recent Applications for Genome-Wide Interaction Studies. *Journal of Molecular Biology* **427**:2039–2055. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.03.005>, PMID: 25772494
- Moore LA**, Broihier HT, Van Doren M, Lehmann R. 1998. Gonadal mesoderm and fat body initially follow a common developmental path in Drosophila. *Development* **125**:837–844. PMID: 9449666
- Mukherjee K**, Bürglin TR. 2007. Comprehensive analysis of animal TALE homeobox genes: new conserved motifs and cases of accelerated evolution. *Journal of Molecular Evolution* **65**:137–153. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00239-006-0023-0>, PMID: 17665086
- Nagarkar-Jaiswal S**, Lee P-T, Campbell ME, Chen K, Anguiano-Zarate S, Cantu Gutierrez M, Busby T, Lin W-W, He Y, Schulze KL, Booth BW, Evans-Holm M, Venken KJT, Levis RW, Spradling AC, Hoskins RA, Bellen HJ. 2015. A library of MiMICs allows tagging of genes and reversible, spatial and temporal knockdown of proteins in Drosophila. *eLife* **4**:e05338. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.05338>
- Piston DW**, Kremers GJ. 2007. Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *Trends in Biochemical Sciences* **32**:407–414. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.08.003>, PMID: 17764955
- Plaza S**, Prince F, Jaeger J, Kloter U, Flister S, Benassayag C, Cribbs D, Gehring WJ. 2001. Molecular basis for the inhibition of Drosophila eye development by Antennapedia. *The EMBO Journal* **20**:802–811. DOI: <https://doi.org/10.1093/emboj/20.4.802>, PMID: 11179224
- Plaza S**, Prince F, Adachi Y, Punzo C, Cribbs DL, Gehring WJ. 2008. Cross-regulatory protein-protein interactions between hox and pax transcription factors. *PNAS* **105**:13439–13444. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0806106105>, PMID: 18755899
- Poe JA**, Vollmer L, Vogt A, Smithgall TE. 2014. Development and validation of a high-content bimolecular fluorescence complementation assay for small-molecule inhibitors of HIV-1 Nef dimerization. *Journal of Biomolecular Screening* **19**:556–565. DOI: <https://doi.org/10.1177/1087057113513640>, PMID: 24282155
- Ponzielli R**, Astier M, Chartier A, Gallet A, Théron P, Séméria M. 2002. Heart tube patterning in Drosophila requires integration of axial and segmental information provided by the Bithorax Complex genes and hedgehog signaling. *Development* **129**:4509–4521. PMID: 12223408
- Riechmann V**, Rehorn KP, Reuter R, Leptin M. 1998. The genetic control of the distinction between fat body and gonadal mesoderm in Drosophila. *Development* **125**:713–723. PMID: 9435291
- Schertel C**, Albarca M, Rockel-Bauer C, Kelley NW, Bischof J, Hens K, van Nimwegen E, Basler K, Deplancke B. 2015. A large-scale, in vivo transcription factor screen defines bivalent chromatin as a key property of regulatory factors mediating Drosophila wing development. *Genome Research* **25**:514–523. DOI: <https://doi.org/10.1101/gr.181305.114>, PMID: 25568052
- Shannon P**, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. 2003. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research* **13**:2498–2504. DOI: <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>, PMID: 14597658
- Shyu YJ**, Liu H, Deng X, Hu CD. 2006. Identification of new fluorescent protein fragments for bimolecular fluorescence complementation analysis under physiological conditions. *BioTechniques* **40**:61–66. DOI: <https://doi.org/10.2144/000112036>, PMID: 16454041
- Smialowski P**, Pagel P, Wong P, Brauner B, Dunger I, Fobo G, Frishman G, Montrone C, Rattei T, Frishman D, Ruepp A. 2010. The Negatome database: a reference set of non-interacting protein pairs. *Nucleic Acids Research* **38**:D540–D544. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1026>, PMID: 19920129
- Sung MK**, Lim G, Yi DG, Chang YJ, Yang EB, Lee K, Huh WK. 2013. Genome-wide bimolecular fluorescence complementation analysis of SUMO interactome in yeast. *Genome Research* **23**:736–746. DOI: <https://doi.org/10.1101/gr.148346.112>, PMID: 23403034
- Varnaité R**, MacNeill SA. 2016. Inside front cover: meet the neighbors: mapping local protein interactomes by proximity-dependent labeling with BioID. *Proteomics* **16**:1–16. DOI: <https://doi.org/10.1002/pmhc.201670171>
- Venken KJ**, Schulze KL, Haelterman NA, Pan H, He Y, Evans-Holm M, Carlson JW, Levis RW, Spradling AC, Hoskins RA, Bellen HJ. 2011. MiMIC: a highly versatile transposon insertion resource for engineering Drosophila melanogaster genes. *Nature Methods* **8**:737–743. DOI: <https://doi.org/10.1038/nmeth.1662>, PMID: 21985007
- Zhou J**, Lin J, Zhou C, Deng X, Xia B. 2011. An improved bimolecular fluorescence complementation tool based on superfolder green fluorescent protein. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **43**:239–244. DOI: <https://doi.org/10.1093/abbs/gmq128>, PMID: 21273204

Chapitre V : matériels et méthodes

Lignées de drosophiles

Les lignées de drosophile sont cultivées selon les procédures standard entre 18 et 25°C. Pour les lignées ayant servi aux expériences de gain de fonction et de BiFC, se référer à Bischof et al., 2018. La lignée portant l'allèle *abxpbx* est celle utilisée par De Navas et al. (2011). La lignée *UbxGal4^{LDN}* est celle utilisée par De Navas, Garaulet, et Sánchez-Herrero en 2006. La lignée *MS1096-Gal4* provient du Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC, Indiana, USA), stock n°8696. Les lignées permettant de cibler l'interférence ARN de gènes cibles à l'aide du système UAS/Gal4 sont issus du Transgenic RNAi Project, disponible au BDSC.

Génération de lignées transgéniques

Le vecteur contenant la séquence codant pour BirA*-HA a été commandé chez addgène (#36047). BirA*-HA a ensuite été sous-cloné en phase et en amont (5') de la séquence codante pour Ubx ou Dfd au sein d'un vecteur pUASTattb. Les constructions ont été vérifiées par séquençage avant d'être envoyées pour injection dans des embryons de drosophiles (lignée 9752, possédant un site attP au niveau du second chromosome) par la société BestGene. Les lignées transgéniques ont alors été établies à l'aide du système intégrase Φ C-31 (Bischof et al. 2007).

Interférence ARN

Les mâles des lignes TRiP sont croisés avec des femelles vierges *MS1096-Gal4/MS1096-Gal4 ; +/+ ; abxpbx/TM6b*. Une fois les premières étapes du développement embryonnaires achevées, la descendance de ce croisement est placée à 29°C afin de maximiser l'expression des transgènes. Après émergence des pupes, les spécimens ayant subi l'interférence ARN à l'aide d'une loupe binoculaire.

Immunomarquages des disques imaginaux de drosophile

Les disques imaginaux de larves de drosophile sont disséqués dans du PBS 1X, puis fixés dans du PBS + formaldéhyde 4% (sans méthanol) pendant 15 minutes. Après trois lavages de 15 minutes en PBS+Triton-X100 à 0,1% (PBST), les disques sont saturés à l'aide de PBST+BSA 2% pendant 1h. Ils sont ensuite incubés avec les anticorps primaires sur la nuit à 4°C. Après trois nouveaux lavages au PBST, ils sont incubés avec les anticorps secondaires 2h à température ambiante, puis lavés à nouveau avant d'être montés entre lame et lamelle dans du Vectashield

(Vector laboratories) + DAPI pour l'acquisition en microscopie confocale. Les anticorps utilisés sont : anti-Ubx (souris) FP3.38 dilué à 1/500 ; anti-Hth (lapin) gracieusement fourni par Jonathan Enriquez (1/500), anti-Grn (rat) gracieusement fourni par Alain Garces (1/500) ; anti-GFP (lapin) PABGI (1/500 ; Chromotek) ; Anti-HA (rat) 3F10 (1/500).

Microscopie et imagerie

Les images de microscopie confocale ont été acquises à l'aide d'un microscope Zeiss LSM 780. Les ailes et haltères des drosophiles adultes ont été photographiées à l'aide d'un microscope électronique à balayage Hirox SH-3000 à -20°C, 10kV.

Purification des protéines biotinylées par BioID

1- A partir de cellules HEK transfectées

Le mélange de transfection contient 19µg de plasmides (pCDNA3-actineGal4 + pUASTattb-UAS-BirA*-HA-Ubx) et 1µL de jetPRIME® dilués dans un volume final de 700µL avec du milieu OPTI MEM.

1,7 millions de cellules sont inoculées dans une flasque Corning® de 175 cm² dans un volume de 10mL de milieu DMEM Glutamax W/Glc+Pyr (ref 31966) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal et de 2% de pénicilline et streptomycine (5000U/mL). Les cellules sont transfectées avec le mélange de transfection. Ajouter 60µL de solution de polyéthylèneimine (Sigma Aldrich, 408727). 4h plus tard, le milieu de culture est supplémenté de biotine (100mM) 4h. Après une incubation de 18h dans ce milieu complémenté à la biotine, les cellules sont rincées et resuspendues par grattage dans 1,3mL de PBS, puis transférées dans un tube Eppendorf de 1,5mL. Les cellules sont culotées par centrifugation (300G, 5 minutes, température ambiante) puis congelées.

2- A partir de disques imaginaux de drosophile

Lors de la séance de dissection, les disques imaginaux sont placés dans du PBS dans un tube Eppendorf de 1,5mL « Low protein-binding » sur la glace. Après une rapide étape de centrifugation, un maximum de PBS est retiré. Le tube contenant les disques imaginaux est alors instantanément congelé à l'aide d'azote liquide, puis conservé à -80°C.

3- Étapes similaires entre culture cellulaire et disques imaginaux.

Les cellules/tissus sont lysés sur la glace par ajout de 500µL de tampon RIPA+1%SDS et deux brefs passages au vortex, pendant 20 minutes ou jusqu'à la lyse de tous les tissus. On traite ensuite le lysat à la benzonase nucléase (1/100 ; Sigma Aldrich 9025-65-4) pendant 10 minutes. Le lysat doit alors avoir perdu sa viscosité. Le lysat est alors centrifugé 30 minutes à 16 000 G et à 4°C. Pendant ce temps, 160µL de billes magnétiques à la streptavidine (NEB S1420S) sont équilibrées dans un tube Eppendorf de 1,5mL par deux lavages au PBS (1mL),

puis deux lavages par 500µL de de tampon RIPA+SDS1% dilué au ½ à l'aide de tampon Tris pH8. Le surnageant du lysat cellulaire est récupéré dans un nouveau tube puis dilué par ½ à l'aide de tampon Tris pH8, après avoir conservé un aliquot pour la quantification de protéines et les analyses par western blot. L'extrait de protéine ainsi obtenu est incubé sur la nuit à 4°C avec les 160µL de billes magnétiques à la streptavidine équilibrées. Les billes sont ensuite lavées à l'aide de deux lavages par 500µL de tampon de rinçage SDS, de deux lavages à l'aide de 500µL de tampon RIPA-1%SDS, et de deux lavages à l'aide de 500µL d'acétonitrile 20%. Les protéines biotinylées sont alors éluées par re-suspension des billes dans 70µL de tampon Laemmli, et incubation 10 minutes à 95°C sous agitation (650RPM). Le surnageant alors collecté contient les protéines biotinylées.

Tampons :

-**RIPA+1%SDS** : 50mM Tris pH8, 150mM NaCl, 0.5% deoxycholate de sodium, 1% NP40/IGEPAL, 1%dodécyl-sulfate de sodium (SDS)

-**Tampon de rinçage SDS** : Tris.Cl 10mM, EDTA 1mM, SDS 1%, NaCl 200mM

-**Tampon de lavage à l'acétonitrile** : acétonitrile 20%, eau

-**Tampon Laemmli** : β-mercaptoéthanol 5%, glycérol 10%, bleu de bromophénol 0,005%, SDS 2%, Tris pH6,8 à 63mM.

SDS-PAGE/Western blot

Pur l'analyse par Western blot, les protéines sont séparées sur un gel SDS-PAGE 4%-7,5%, puis transférées sur une membrane de Polyfluorure de vinylidène (« PVDF », BioRad). Après une étape de saturation à l'aide de tampon Tris pH6,8+0,1% de Triton-X100 additionné de BSA (2%), les protéines sont marquées à l'aide de streptavidine couplée à l'enzyme HRP (1/5 000) (18-152 Merck Millipore). Le signal est révélé à l'aide du substrat SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent (ThermoFischer, #34580) et d'un système ChemiDox XRS (BioRad).

Retard sur gel

Les protéines Ubx, Antp et Scr fusionnées à une étiquette VC ont été produites à l'aide du système TNT(T7)-coupled *in vitro* transcription/translation (Promega). Se référer à Merabet et al. 2007. Les sondes oligonucléotidiques sont marquées par du P³² radioactif à l'aide du fragment de Klenow . Les expériences de supershifts sont réalisées à l'aide de 10µg d'anticorps anti-GFP (lapin) PABGI (Chromotek) ciblant l'étiquette VC fusionnées aux différentes protéines Hox.

References

- Abe, Namiko, Iris Dror, Lin Yang, Matthew Slattery, Tianyin Zhou, Harmen J. Bussemaker, Remo Rohs, et Richard S. Mann. 2015. « Deconvolving the Recognition of DNA Shape from Sequence ». *Cell* 161(2):307-18. doi: 10.1016/j.cell.2015.02.008.
- Aegerter-Wilmsen, Tinri, Christof M. Aegerter, Ernst Hafen, et Konrad Basler. 2007. « Model for the Regulation of Size in the Wing Imaginal Disc of *Drosophila* ». *Mechanisms of Development* 124(4):318-26. doi: 10.1016/j.mod.2006.12.005.
- Agrawal, Pavan, Farhat Habib, Ramesh Yelagandula, et L. S. Shashidhara. 2011. « Genome-Level Identification of Targets of Hox Protein Ultrabithorax in *Drosophila* : Novel Mechanisms for Target Selection ». *Scientific Reports* 1(1):205. doi: 10.1038/srep00205.
- Akam, M. 1989. « Hox and HOM: Homologous Gene Clusters in Insects and Vertebrates ». *Cell* 57(3):347-49. doi: 10.1016/0092-8674(89)90909-4.
- Akam, M. 1998. « Hox Genes: From Master Genes to Micromanagers ». *Current Biology: CB* 8(19):R676-678. doi: 10.1016/s0960-9822(98)70433-6.
- Akam, M., M. Averof, J. Castelli-Gair, R. Dawes, F. Falciani, et D. Ferrier. 1994. « The Evolving Role of Hox Genes in Arthropods ». *Development (Cambridge, England). Supplement* 209-15.
- van den Akker, Eric, Sylvie Forlani, Kallayane Chawengsaksophak, Wim de Graaff, Felix Beck, Barbara I. Meyer, et Jacqueline Deschamps. 2002. « Cdx1 and Cdx2 Have Overlapping Functions in Anteroposterior Patterning and Posterior Axis Elongation ». *Development (Cambridge, England)* 129(9):2181-93.
- del Álamo Rodríguez, David, Javier Terriente Felix, et Fernando J. Díaz-Benjumea. 2004. « The Role of the T-Box Gene Optomotor-Blind in Patterning the *Drosophila* Wing ». *Developmental Biology* 268(2):481-92. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.01.005.
- Albertin, Caroline B., Oleg Simakov, Therese Mitros, Z. Yan Wang, Judit R. Pungor, Eric Edsinger-Gonzales, Sydney Brenner, Clifton W. Ragsdale, et Daniel S. Rokhsar. 2015. « The Octopus Genome and the Evolution of Cephalopod Neural and Morphological Novelties ». *Nature* 524(7564):220-24. doi: 10.1038/nature14668.
- Alexander, David E. 2015. *On the Wing: Insects, Pterosaurs, Birds, Bats and the Evolution of Animal Flight*. Oxford University Press.
- Almudi, Isabel, Joel Vizueta, Christopher D. R. Wyatt, Alex de Mendoza, Ferdinand Marlétaz, Panos N. Firbas, Roberto Feuda, Giulio Masiero, Patricia Medina, Ana Alcaina-Caro, Fernando Cruz, Jessica Gómez-Garrido, Marta Gut, Tyler S. Alioto, Carlos Vargas-Chavez, Kristofer Davie, Bernhard Misof, Josefa González, Stein Aerts, Ryan Lister, Jordi Paps, Julio Rozas, Alejandro Sánchez-Gracia, Manuel Irimia, Ignacio Maeso, et Fernando Casares. 2020. « Genomic Adaptations to Aquatic and Aerial Life in

- Mayflies and the Origin of Insect Wings ». *Nature Communications* 11(1):2631. doi: 10.1038/s41467-020-16284-8.
- Amândio, Ana Rita, Lucille Lopez-Delisle, Christopher Chase Bolt, Bénédicte Mascrez, et Denis Duboule. 2020. « A complex regulatory landscape involved in the development of mammalian external genitals » édité par J. Dekker, K. Struhl, J. Dekker, et J. L. Gómez-Skármeta. *eLife* 9:e52962. doi: 10.7554/eLife.52962.
- Amândio, Ana Rita, Anamaria Necsulea, Elisabeth Joye, Bénédicte Mascrez, et Denis Duboule. 2016. « Hotair Is Dispensable for Mouse Development ». *PLoS Genetics* 12(12):e1006232. doi: 10.1371/journal.pgen.1006232.
- Amin, Shilu, Ian J. Donaldson, Denise A. Zannino, James Hensman, Magnus Rattray, Marta Losa, François Spitz, Franck Ladam, Charles Sagerström, et Nicoletta Bobola. 2015. « Hoxa2 Selectively Enhances Meis Binding to Change a Branchial Arch Ground State ». *Developmental Cell* 32(3):265-77. doi: 10.1016/j.devcel.2014.12.024.
- Ando, Ryoko, Hideaki Mizuno, et Atsushi Miyawaki. 2004. « Regulated Fast Nucleocytoplasmic Shuttling Observed by Reversible Protein Highlighting ». *Science (New York, N.Y.)* 306(5700):1370-73. doi: 10.1126/science.1102506.
- Andrey, Guillaume, Thomas Montavon, Bénédicte Mascrez, Federico Gonzalez, Daan Noordermeer, Marion Leleu, Didier Trono, François Spitz, et Denis Duboule. 2013. « A Switch between Topological Domains Underlies HoxD Genes Collinearity in Mouse Limbs ». *Science (New York, N.Y.)* 340(6137):1234167. doi: 10.1126/science.1234167.
- Angelini, David R., et Thomas C. Kaufman. 2005. « Insect Appendages and Comparative Ontogenetics ». *Developmental Biology* 286(1):57-77. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.07.006.
- Anholt, Robert R. H., Patrick O'Grady, Mariana F. Wolfner, et Susan T. Harbison. 2020. « Evolution of Reproductive Behavior ». *Genetics* 214(1):49. doi: 10.1534/genetics.119.302263.
- Arai, Ryoichi, Hideyuki Nakagawa, Kouhei Tsumoto, Walt Mahoney, Izumi Kumagai, Hiroshi Ueda, et Teruyuki Nagamune. 2001. « Demonstration of a Homogeneous Noncompetitive Immunoassay Based on Bioluminescence Resonance Energy Transfer ». *Analytical Biochemistry* 289(1):77-81. doi: 10.1006/abio.2000.4924.
- Aramaki, Shinsuke, et Kohei Hatta. 2006. « Visualizing Neurons One-by-One in Vivo: Optical Dissection and Reconstruction of Neural Networks with Reversible Fluorescent Proteins ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 235(8):2192-99. doi: 10.1002/dvdy.20826.
- Audet, Martin, Monique Lagacé, David W. Silversides, et Michel Bouvier. 2010. « Protein-Protein Interactions Monitored in Cells from Transgenic Mice Using Bioluminescence Resonance Energy Transfer ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24(8):2829-38. doi: 10.1096/fj.09-144816.

- Averof, M., et M. Akam. 1995. « Hox Genes and the Diversification of Insect and Crustacean Body Plans ». *Nature* 376(6539):420-23. doi: 10.1038/376420a0.
- Averof, M., et N. H. Patel. 1997. « Crustacean Appendage Evolution Associated with Changes in Hox Gene Expression ». *Nature* 388(6643):682-86. doi: 10.1038/41786.
- Averof, Michalis. 1997. « Arthropod Evolution: Same Hox Genes, Different Body Plans ». *Current Biology* 7(10):R634-36. doi: 10.1016/S0960-9822(06)00321-6.
- Babu, M. Madan. 2016. « The contribution of intrinsically disordered regions to protein function, cellular complexity, and human disease ». *Biochemical Society Transactions* 44(5):1185-1200. doi: 10.1042/BST20160172.
- Bach, Erika A., Stephane Vincent, Martin P. Zeidler, et Norbert Perrimon. 2003. « A Sensitized Genetic Screen to Identify Novel Regulators and Components of the Drosophila Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription Pathway ». *Genetics* 165(3):1149-66.
- Baena-López, L. Alberto, et Antonio García-Bellido. 2003. « Genetic Requirements of Vestigial in the Regulation of Drosophila Wing Development ». *Development* 130(1):197-208. doi: 10.1242/dev.00187.
- Baëza, Manon, Séverine Viala, Marjorie Heim, Amélie Dard, Bruno Hudry, Marilyne Duffraisse, Ana Rogulja-Ortmann, Christine Brun, et Samir Merabet. 2015. « Inhibitory activities of short linear motifs underlie Hox interactome specificity in vivo ». *eLife* 4. doi: 10.7554/eLife.06034.
- Banreti, Agnes, Bruno Hudry, Miklos Sass, Andrew J. Saurin, et Yacine Graba. 2014. « Hox Proteins Mediate Developmental and Environmental Control of Autophagy ». *Developmental Cell* 28(1):56-69. doi: 10.1016/j.devcel.2013.11.024.
- Bantignies, Frédéric, et Giacomo Cavalli. 2011. « Polycomb Group Proteins: Repression in 3D ». *Trends in Genetics* 27(11):454-64. doi: 10.1016/j.tig.2011.06.008.
- Bantignies, Frédéric, Virginie Roure, Itys Comet, Benjamin Leblanc, Bernd Schuettengruber, Jérôme Bonnet, Vanessa Tixier, André Mas, et Giacomo Cavalli. 2011. « Polycomb-Dependent Regulatory Contacts between Distant Hox Loci in Drosophila ». *Cell* 144(2):214-26. doi: 10.1016/j.cell.2010.12.026.
- Barges, S., J. Mihaly, M. Galloni, K. Hagstrom, M. Muller, G. Shanower, P. Schedl, H. Gyurkovics, et F. Karch. 2000. « The Fab-8 Boundary Defines the Distal Limit of the Bithorax Complex lab-7 Domain and Insulates lab-7 from Initiation Elements and a PRE in the Adjacent lab-8 Domain ». *Development* 127(4):779-90.
- Bartel, David P. 2018. « Metazoan MicroRNAs ». *Cell* 173(1):20-51. doi: 10.1016/j.cell.2018.03.006.

- Bartussek, Jan, et Fritz-Olaf Lehmann. 2016. « Proprioceptive feedback determines visuomotor gain in *Drosophila* ». *Royal Society Open Science* 3(1). doi: 10.1098/rsos.150562.
- Baskind, Heather A., Lucy Na, Quanhong Ma, Mayur P. Patel, David L. Geenen, et Q. Tian Wang. 2009. « Functional Conservation of *Asx12*, a Murine Homolog for the *Drosophila* Enhancer of *Trithorax* and Polycomb Group Gene *Asx* ». *PLOS ONE* 4(3):e4750. doi: 10.1371/journal.pone.0004750.
- Baxevanis, A. D., et D. Landsman. 1995. « The HMG-1 box protein family: classification and functional relationships. » *Nucleic Acids Research* 23(9):1604-13.
- Beccari, Leonardo, Nayuta Yakushiji-Kaminatsui, Joost M. Woltering, Anamaria Necsulea, Nicolas Lonfat, Eddie Rodríguez-Carballo, Benedicte Mascrez, Shiori Yamamoto, Atsushi Kuroiwa, et Denis Duboule. 2016. « A role for HOX13 proteins in the regulatory switch between TADs at the *HoxD* locus ». *Genes & Development* 30(10):1172-86. doi: 10.1101/gad.281055.116.
- Beckett, D., E. Kovaleva, et P. J. Schatz. 1999. « A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation. » *Protein Science : A Publication of the Protein Society* 8(4):921-29.
- Beeman, Richard W. 1987. « A Homoeotic Gene Cluster in the Red Flour Beetle ». *Nature* 327(6119):247-49. doi: 10.1038/327247a0.
- Béganton, Benoît, Etienne Coyaud, Alain Mangé, et Jérôme Solassol. 2019. « Approches nouvelles pour l'étude des interactions protéine-protéine ». *médecine/sciences* 35(3):223-31. doi: 10.1051/medsci/2019035.
- Beh, Ching Yew, Sherif El-Sharnouby, Aikaterini Chatzipli, Steven Russell, Siew Woh Choo, et Robert White. 2016. « Roles of cofactors and chromatin accessibility in Hox protein target specificity ». *Epigenetics & Chromatin* 9(1):1. doi: 10.1186/s13072-015-0049-x.
- Beira, Jorge V., et Renato Paro. 2016. « The Legacy of *Drosophila* Imaginal Discs ». *Chromosoma* 125(4):573-92. doi: 10.1007/s00412-016-0595-4.
- Beisel, Christian, Andreas Bunes, Ian M. Roustan-Espinosa, Britta Koch, Sabine Schmitt, Stefan A. Haas, Marc Hild, Tomonori Katsuyama, et Renato Paro. 2007. « Comparing Active and Repressed Expression States of Genes Controlled by the Polycomb/*Trithorax* Group Proteins ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(42):16615-20. doi: 10.1073/pnas.0701538104.
- Bejarano, Fernando, et Ana Busturia. 2004. « Function of the *Trithorax*-like Gene during *Drosophila* Development ». *Developmental Biology* 268(2):327-41. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.01.006.
- Belting, Heinz-Georg, Cooduvalli S. Shashikant, et Frank H. Ruddle. 1998. « Modification of Expression and Cis-Regulation of *Hoxc8* in the Evolution of Diverged Axial

- Morphology ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(5):2355-60. doi: 10.1073/pnas.95.5.2355.
- Berger, Michael F., Gwenaél Badis, Andrew R. Gehrke, Shaheynoor Talukder, Anthony A. Philippakis, Lourdes Peña-Castillo, Trevis M. Alleyne, Sanie Mnaimneh, Olga B. Botvinnik, Esther T. Chan, Faiqua Khalid, Wen Zhang, Daniel Newburger, Savina A. Jaeger, Quaid D. Morris, Martha L. Bulyk, et Timothy R. Hughes. 2008. « Variation in Homeodomain DNA Binding Revealed by High-Resolution Analysis of Sequence Preferences ». *Cell* 133(7):1266-76. doi: 10.1016/j.cell.2008.05.024.
- Berry, Meera, et Walter Gehring. 2000. « Phosphorylation status of the SCR homeodomain determines its functional activity: essential role for protein phosphatase 2A,B' ». *The EMBO Journal* 19(12):2946-57. doi: 10.1093/emboj/19.12.2946.
- Bischof, Johannes, Marilyne Duffraisse, Edy Furger, Leïre Ajuria, Guillaume Giraud, Solène Vanderperre, Rachel Paul, Mikael Björklund, Damien Ahr, Alexis W. Ahmed, Lionel Spinelli, Christine Brun, Konrad Basler, et Samir Merabet. 2018. « Generation of a versatile BiFC ORFeome library for analyzing protein–protein interactions in live *Drosophila* » édité par K. VijayRaghavan. *eLife* 7:e38853. doi: 10.7554/eLife.38853.
- Bischof, Johannes, Robert K. Maeda, Monika Hediger, François Karch, et Konrad Basler. 2007. « An Optimized Transgenesis System for *Drosophila* Using Germ-Line-Specific PhiC31 Integrases ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(9):3312-17. doi: 10.1073/pnas.0611511104.
- Blackledge, Neil P., Nathan R. Rose, et Robert J. Klose. 2015. « Targeting Polycomb Systems to Regulate Gene Expression: Modifications to a Complex Story ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 16(11):643-49. doi: 10.1038/nrm4067.
- Blair, S. S. 1992. « Engrailed Expression in the Anterior Lineage Compartment of the Developing Wing Blade of *Drosophila* ». *Development* 115(1):21-33.
- Blair, Seth S. 2003. « Genetic Mosaic Techniques for Studying *Drosophila* Development ». *Development (Cambridge, England)* 130(21):5065-72. doi: 10.1242/dev.00774.
- Blair, Seth S. 2007. « Wing Vein Patterning in *Drosophila* and the Analysis of Intercellular Signaling ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 23:293-319. doi: 10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123606.
- Bolatto, Carmen, Cristina Parada, et Victoria Colmenares. 2017. « A Rapid and Efficient Method to Dissect Pupal Wings of *Drosophila* Suitable for Immunodetections or PCR Assays ». *Journal of Visualized Experiments : JoVE* (130). doi: 10.3791/55854.
- Bondos, Sarah E., Daniel J. Catanese, Xin-Xing Tan, Alicia Bicknell, Likun Li, et Kathleen S. Matthews. 2004. « Hox Transcription Factor Ultrabithorax Ib Physically and Genetically Interacts with Disconnected Interacting Protein 1, a Double-Stranded RNA-Binding Protein ». *Journal of Biological Chemistry* 279(25):26433-44. doi: 10.1074/jbc.M312842200.

- Bondos, Sarah E., Xin-Xing Tan, et Kathleen S. Matthews. 2006. « Physical and Genetic Interactions Link Hox Function with Diverse Transcription Factors and Cell Signaling Proteins ». *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 5(5):824-34. doi: 10.1074/mcp.M500256-MCP200.
- Boube, Muriel, Bruno Hudry, Clément Immarigeon, Yannick Carrier, Sandra Bernat-Fabre, Samir Merabet, Yacine Graba, Henri-Marc Bourbon, et David L. Cribbs. 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 Genetics* 10(5):e1004303. doi: 10.1371/journal.pgen.1004303.
- Boussau, Bastien, Zaak Walton, Juan A. Delgado, Francisco Collantes, Laura Beani, Isaac J. Stewart, Sydney A. Cameron, James B. Whitfield, J. Spencer Johnston, Peter W. H. Holland, Doris Bachtrog, Jeyarany Kathirithamby, et John P. Huelsenbeck. 2014. « Strepsiptera, Phylogenomics and the Long Branch Attraction Problem ». *PLoS ONE* 9(10). doi: 10.1371/journal.pone.0107709.
- Boyce, Michael, Kevin F. Bryant, Céline Jousse, Kai Long, Heather P. Harding, Donalyn Scheuner, Randal J. Kaufman, Dawei Ma, Donald M. Coen, David Ron, et Junying Yuan. 2005. « A Selective Inhibitor of EIF2alpha Dephosphorylation Protects Cells from ER Stress ». *Science (New York, N.Y.)* 307(5711):935-39. doi: 10.1126/science.1101902.
- Bradaschia-Correa, Vivian, Kevin Leclerc, Anne M. Josephson, Sooyeon Lee, Laura Palma, Hannah P. Litwa, Shane S. Neibart, Jason C. Huo, et Philipp Leucht. 2019. « Hox Gene Expression Determines Cell Fate of Adult Periosteal Stem/Progenitor Cells ». *Scientific Reports* 9(1):5043. doi: 10.1038/s41598-019-41639-7.
- Branon, Tess C., Justin A. Bosch, Ariana D. Sanchez, Namrata D. Udeshi, Tanya Svinkina, Steven A. Carr, Jessica L. Feldman, Norbert Perrimon, et Alice Y. Ting. 2018. « Efficient Proximity Labeling in Living Cells and Organisms with TurboID ». *Nature Biotechnology* 36(9):880-87. doi: 10.1038/nbt.4201.
- Broussard, Joshua A., Benjamin Rappaz, Donna J. Webb, et Claire M. Brown. 2013. « Fluorescence Resonance Energy Transfer Microscopy as Demonstrated by Measuring the Activation of the Serine/Threonine Kinase Akt ». *Nature Protocols* 8(2):265-81. doi: 10.1038/nprot.2012.147.
- Brown, S., et J. Castelli-Gair Hombria. 2000. « *Drosophila* Grain Encodes a GATA Transcription Factor Required for Cell Rearrangement during Morphogenesis ». *Development* 127(22):4867-76.
- Brown, Seth J., Peter Stoilov, et Yi Xing. 2012. « Chromatin and Epigenetic Regulation of Pre-mRNA Processing ». *Human Molecular Genetics* 21(R1):R90-96. doi: 10.1093/hmg/dds353.

- Brown, Susan J., Teresa D. Shippy, Richard W. Beeman, et Robin E. Denell. 2002. « Tribolium Hox Genes Repress Antennal Development in the Gnathos and Trunk ». *Molecular Phylogenetics and Evolution* 24(3):384-87. doi: 10.1016/S1055-7903(02)00205-1.
- Budd, Graham. 1999. « Does Evolution in Body Patterning Genes Drive Morphological Change or Vice Versa? » *BioEssays*.
- Bürglin, T. R. 1997. « Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals. » *Nucleic Acids Research* 25(21):4173-80.
- Bürglin, Thomas R. 1998. « The PBC Domain Contains a MEINOX Domain: Coevolution of Hox and TALE Homeobox Genes? » *Development Genes and Evolution* 208(2):113-16. doi: 10.1007/s004270050161.
- Burke, A. C., C. E. Nelson, B. A. Morgan, et C. Tabin. 1995. « Hox Genes and the Evolution of Vertebrate Axial Morphology ». *Development* 121(2):333-46.
- Busturia, A., C. D. Wightman, et S. Sakonju. 1997. « A Silencer Is Required for Maintenance of Transcriptional Repression throughout Drosophila Development ». *Development (Cambridge, England)* 124(21):4343-50.
- Mooney, C., Pollastri G, Shields Dc, et Haslam Nj. 2011. « Prediction of Short Linear Protein Binding Regions. » *Journal of Molecular Biology* 415(1):193-204. doi: 10.1016/j.jmb.2011.10.025.
- Cabantous, Stéphanie, Hau B. Nguyen, Jean-Denis Pedelacq, Faten Koraïchi, Anu Chaudhary, Kumkum Ganguly, Meghan A. Lockard, Gilles Favre, Thomas C. Terwilliger, et Geoffrey S. Waldo. 2013. « A New Protein-Protein Interaction Sensor Based on Tripartite Split-GFP Association ». *Scientific Reports* 3. doi: 10.1038/srep02854.
- Cabrera, Carlos V., Juan Botas, et Antonio Garcia-Bellido. 1985. « Distribution of Ultrabithorax Proteins in Mutants of Drosophila Bithorax Complex and Its Transregulatory Genes ». *Nature* 318(6046):569-71. doi: 10.1038/318569a0.
- Cameron, R. Andrew, Lee Rowen, Ryan Nesbitt, Scott Bloom, Jonathan P. Rast, Kevin Berney, Cesar Arenas-Mena, Pedro Martinez, Susan Lucas, Paul M. Richardson, Eric H. Davidson, Kevin J. Peterson, et Leroy Hood. 2006. « Unusual Gene Order and Organization of the Sea Urchin Hox Cluster ». *Journal of Experimental Zoology. Part B, Molecular and Developmental Evolution* 306(1):45-58. doi: 10.1002/jez.b.21070.
- Campbell, G., et A. Tomlinson. 1998. « The Roles of the Homeobox Genes *Aristaless* and *Distal-Less* in Patterning the Legs and Wings of *Drosophila* ». *Development* 125(22):4483-93.
- Carnesecchi, Julie, Pedro B. Pinto, et Ingrid Lohmann. 2018. « Hox Transcription Factors: An Overview of Multi-Step Regulators of Gene Expression ». *International Journal of Developmental Biology* 62(11-12):723-32. doi: 10.1387/ijdb.180294il.

- Carneseccchi, Julie, Gianluca Sigismondo, Katrin Domsch, Clara Eva Paula Baader, Mahmoud-Reza Rafiee, Jeroen Krijgsveld, et Ingrid Lohmann. 2020. « Multi-Level and Lineage-Specific Interactomes of the Hox Transcription Factor Ubx Contribute to Its Functional Specificity ». *Nature Communications* 11(1):1-17. doi: 10.1038/s41467-020-15223-x.
- Carroll, S. B. 1995. « Homeotic Genes and the Evolution of Arthropods and Chordates ». *Nature* 376(6540):479-85. doi: 10.1038/376479a0.
- Carroll, Sean B., Scott D. Weatherbee, et James A. Langeland. 1995. « Homeotic Genes and the Regulation and Evolution of Insect Wing Number ». *Nature* 375(6526):58-61. doi: 10.1038/375058a0.
- Casares, F., M. Calleja, et E. Sánchez-Herrero. 1996. « Functional similarity in appendage specification by the Ultrabithorax and abdominal-A Drosophila HOX genes. » *The EMBO Journal* 15(15):3934-42. doi: 10.1002/j.1460-2075.1996.tb00767.x.
- Castelli-Gair Hombría, J., C. Sánchez-Higueras, et E. Sánchez-Herrero. 2016. « Control of Organogenesis by Hox Genes ». P. 319-73 in *Organogenetic Gene Networks: Genetic Control of Organ Formation*, édité par James Castelli-Gair Hombría et P. Bovolenta. Cham: Springer International Publishing.
- Chafino, S., D. López-Escardó, G. Benelli, H. Kovac, E. Casacuberta, X. Franch-Marro, J. Kathirithamby, et D. Martín. 2018. « Differential Expression of the Adult Specifier E93 in the Strepsipteran Xenos Vesparum Rossi Suggests a Role in Female Neoteny ». *Scientific Reports* 8.
- Chai, Chun-Li, Ze Zhang, Fei-Fei Huang, Xian-Yan Wang, Quan-You Yu, Bin-Bin Liu, Tian Tian, Qing-You Xia, Cheng Lu, et Zhong-Huai Xiang. 2008. « A Genomewide Survey of Homeobox Genes and Identification of Novel Structure of the Hox Cluster in the Silkworm, Bombyx Mori ». *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38(12):1111-20. doi: 10.1016/j.ibmb.2008.06.008.
- Chan, C. S., L. Rastelli, et V. Pirrotta. 1994. « A Polycomb Response Element in the Ubx Gene That Determines an Epigenetically Inherited State of Repression ». *The EMBO Journal* 13(11):2553-64.
- Chan, S. K., H. D. Ryoo, A. Gould, R. Krumlauf, et R. S. Mann. 1997. « Switching the in Vivo Specificity of a Minimal Hox-Responsive Element ». *Development* 124(10):2007-14.
- Cheah, Joleen S., et Soichiro Yamada. 2017. « A Simple Elution Strategy for Biotinylated Proteins Bound to Streptavidin Conjugated Beads Using Excess Biotin and Heat ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 493(4):1522-27. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.09.168.
- Chen, Chiao-Lin, Yanhui Hu, Namrata D. Udeshi, Thomas Y. Lau, Frederik Wirtz-Peitz, Li He, Alice Y. Ting, Steven A. Carr, et Norbert Perrimon. 2015. « Proteomic Mapping in Live Drosophila Tissues Using an Engineered Ascorbate Peroxidase ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(39):12093-98. doi: 10.1073/pnas.1515623112.

- Chen, Selby, Ann Yeelin Lee, Nina M. Bowens, Robert Huber, et Edward A. Kravitz. 2002. « Fighting Fruit Flies: A Model System for the Study of Aggression ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(8):5664-68. doi: 10.1073/pnas.082102599.
- Chiori, Roxane, Muriel Jager, Elsa Denker, Patrick Wincker, Corinne Da Silva, Hervé Le Guyader, Michaël Manuel, et Eric Quéinnec. 2009. « Are Hox Genes Ancestrally Involved in Axial Patterning? Evidence from the Hydrozoan *Clytia hemisphaerica* (Cnidaria) ». *PLoS ONE* 4(1). doi: 10.1371/journal.pone.0004231.
- Cho, Kelvin F., Tess C. Branon, Sanjana Rajeev, Tanya Svinkina, Namrata D. Udeshi, Themis Thoudam, Chulhwan Kwak, Hyun-Woo Rhee, In-Kyu Lee, Steven A. Carr, et Alice Y. Ting. 2020. « Split-TurboID Enables Contact-Dependent Proximity Labeling in Cells ». *BioRxiv* 2020.03.11.988022. doi: 10.1101/2020.03.11.988022.
- Choo, Siew Woh, Robert White, et Steven Russell. 2011. « Genome-Wide Analysis of the Binding of the Hox Protein Ultrabithorax and the Hox Cofactor Homothorax in *Drosophila* ». *PLOS ONE* 6(4):e14778. doi: 10.1371/journal.pone.0014778.
- Chourrout, D., F. Delsuc, P. Chourrout, R. B. Edvardsen, F. Rentzsch, E. Renfer, M. F. Jensen, B. Zhu, P. de Jong, R. E. Steele, et U. Technau. 2006. « Minimal ProtoHox Cluster Inferred from Bilaterian and Cnidarian Hox Complements ». *Nature* 442(7103):684-87. doi: 10.1038/nature04863.
- Christen, B., et M. Bienz. 1994. « Imaginal Disc Silencers from Ultrabithorax: Evidence for Polycomb Response Elements ». *Mechanisms of Development* 48(3):255-66. doi: 10.1016/0925-4773(94)90064-7.
- Cillo, Clemente, Giulia Schiavo, Monica Cantile, Michel P. Bihl, Paolo Sorrentino, Vincenza Carafa, Maria D' Armiento, Massimo Roncalli, Sebastiano Sansano, Raffaella Vecchione, Luigi Tornillo, Lucia Mori, Gennaro De Libero, Jessica Zucman-Rossi, et Luigi Terracciano. 2011. « The HOX Gene Network in Hepatocellular Carcinoma ». *International Journal of Cancer* 129(11):2577-87. doi: 10.1002/ijc.25941.
- Clark, Erik. 2017. « Dynamic patterning by the *Drosophila* pair-rule network reconciles long-germ and short-germ segmentation ». *PLoS Biology* 15(9). doi: 10.1371/journal.pbio.2002439.
- Clark-Hachtel, Courtney M., et Yoshinori Tomoyasu. 2016. « Exploring the Origin of Insect Wings from an Evo-Devo Perspective ». *Current Opinion in Insect Science* 13:77-85. doi: 10.1016/j.cois.2015.12.005.
- .Cohn, Martin J., et Cheryll Tickle. 1999. « Developmental Basis of Limblessness and Axial Patterning in Snakes ». *Nature* 399(6735):474-79. doi: 10.1038/20944.
- Coiffier, D., Charroux B, et Kerridge S. 2007. « Common Functions of Central and Posterior Hox Genes for the Repression of Head in the Trunk of *Drosophila*. » *Development (Cambridge, England)* 135(2):291-300. doi: 10.1242/dev.009662.

- Cole, Eric S., et John Palka. 1982. « The Pattern of Campaniform Sensilla on the Wing and Haltere of *Drosophila Melanogaster* and Several of Its Homeotic Mutants ». *Development* 71(1):41-61.
- Conley, Kevin E., et Stan L. Lindstedt. 2002. « Energy-Saving Mechanisms in Muscle: The Minimization Strategy ». *Journal of Experimental Biology* 205(15):2175-81.
- Cook, Orna, Brian Biehs, et Ethan Bier. 2004. « Brinker and Optomotor-Blind Act Coordinately to Initiate Development of the L5 Wing Vein Primordium in *Drosophila* ». *Development* 131(9):2113-24. doi: 10.1242/dev.01100.
- Costa, M., M. Weir, A. Coulson, J. Sulston, et C. Kenyon. 1988. « Posterior Pattern Formation in *C. Elegans* Involves Position-Specific Expression of a Gene Containing a Homeobox ». *Cell* 55(5):747-56. doi: 10.1016/0092-8674(88)90131-6.
- Coulon, Vincent, Martin Audet, Vincent Homburger, Joël Bockaert, Laurent Fagni, Michel Bouvier, et Julie Perroy. 2008. « Subcellular Imaging of Dynamic Protein Interactions by Bioluminescence Resonance Energy Transfer ». *Biophysical Journal* 94(3):1001-9. doi: 10.1529/biophysj.107.117275.
- Couso, J. P., E. Knust, et A. Martinez Arias. 1995. « Serrate and Wingless Cooperate to Induce Vestigial Gene Expression and Wing Formation in *Drosophila* ». *Current Biology* 5(12):1437-48. doi: 10.1016/S0960-9822(95)00281-8.
- Couturier, Cyril, et Benoit Deprez. 2012. « Setting Up a Bioluminescence Resonance Energy Transfer High throughput Screening Assay to Search for Protein/Protein Interaction Inhibitors in Mammalian Cells ». *Frontiers in Endocrinology* 3. doi: 10.3389/fendo.2012.00100.
- Couturier, Cyril, et Ralf Jockers. 2003. « Activation of the Leptin Receptor by a Ligand-Induced Conformational Change of Constitutive Receptor Dimers ». *The Journal of Biological Chemistry* 278(29):26604-11. doi: 10.1074/jbc.M302002200.
- Couzens, Amber L., James D. R. Knight, Michelle J. Kean, Guoci Teo, Alexander Weiss, Wade H. Dunham, Zhen-Yuan Lin, Richard D. Bagshaw, Frank Sicheri, Tony Pawson, Jeffrey L. Wrana, Hyungwon Choi, et Anne-Claude Gingras. 2013. « Protein Interaction Network of the Mammalian Hippo Pathway Reveals Mechanisms of Kinase-Phosphatase Interactions ». *Science Signaling* 6(302):rs15. doi: 10.1126/scisignal.2004712.
- Creuzet, Sophie, Gérard Couly, et Nicole M. Le Douarin. 2005. « Patterning the Neural Crest Derivatives during Development of the Vertebrate Head: Insights from Avian Studies ». *Journal of Anatomy* 207(5):447-59. doi: 10.1111/j.1469-7580.2005.00485.x.
- Crickmore, Michael A., et Richard S. Mann. 2006. « Hox Control of Organ Size by Regulation of Morphogen Production and Mobility ». *Science* 313(5783):63-68. doi: 10.1126/science.1128650.

- Crocker, Justin, Namiko Abe, Lucrezia Rinaldi, Alistair P. McGregor, Nicolás Frankel, Shu Wang, Ahmad Alsawadi, Philippe Valenti, Serge Plaza, François Payre, Richard S. Mann, et David L. Stern. 2015. « Low Affinity Binding Site Clusters Confer Hox Specificity and Regulatory Robustness ». *Cell* 160(1):191-203. doi: 10.1016/j.cell.2014.11.041.
- Crocker, Justin, Ella Preger-Ben Noon, et David L. Stern. 2016. « Chapter Twenty-Seven - The Soft Touch: Low-Affinity Transcription Factor Binding Sites in Development and Evolution ». P. 455-69 in *Current Topics in Developmental Biology*. Vol. 117, *Essays on Developmental Biology, Part B*, édité par P. M. Wassarman. Academic Press.
- Darbellay, Fabrice, Célia Bochaton, Lucille Lopez-Delisle, Bénédicte Mascrez, Patrick Tschopp, Saskia Delpretti, Jozsef Zakany, et Denis Duboule. 2019. « The Constrained Architecture of Mammalian Hox Gene Clusters ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116(27):13424-33. doi: 10.1073/pnas.1904602116.
- Dard, Amélie, Yunlong Jia, Jonathan Reboulet, Françoise Bleicher, Catherine Lavau, et Samir Merabet. 2019. « The Human HOXA9 Protein Uses Paralog-Specific Residues of the Homeodomain to Interact with TALE-Class Cofactors ». *Scientific Reports* 9(1):5664. doi: 10.1038/s41598-019-42096-y.
- Dard, Amélie, Jonathan Reboulet, Yunlong Jia, Françoise Bleicher, Marilyne Duffraisse, Jean-Marc Vanaker, Christelle Forcet, et Samir Merabet. 2018. « Human HOX Proteins Use Diverse and Context-Dependent Motifs to Interact with TALE Class Cofactors ». *Cell Reports* 22(11):3058-71. doi: 10.1016/j.celrep.2018.02.070.
- von Dassow, George, Eli Meir, Edwin M. Munro, et Garrett M. Odell. 2000. « The Segment Polarity Network Is a Robust Developmental Module ». *Nature* 406(6792):188-92. doi: 10.1038/35018085.
- Davey, Norman E., Van Roey K, Weatheritt Rj, Toedt G, Uyar B, Altenberg B, Budd A, Diella F, Dinkel H, et Gibson Tj. 2012. « Attributes of Short Linear Motifs ». *Molecular BioSystems* 8(1). Consulté 4 septembre 2020 (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21909575/>).
- Davis, Shaun M., Amanda L. Thomas, Lingzhi Liu, Ian M. Campbell, et Herman A. Dierick. 2018. « Isolation of Aggressive Behavior Mutants in *Drosophila* Using a Screen for Wing Damage ». *Genetics* 208(1):273-82. doi: 10.1534/genetics.117.300292.
- De Las Heras, José M., Celia García-Cortés, David Foronda, José Carlos Pastor-Pareja, L. S. Shashidhara, et Ernesto Sánchez-Herrero. 2018. « The *Drosophila* Hox Gene Ultrabithorax Controls Appendage Shape by Regulating Extracellular Matrix Dynamics ». *Development (Cambridge, England)* 145(13). doi: 10.1242/dev.161844.
- Degnan, Bernard M., Vervoort M, Larroux C, et Richards Gs. 2009. « Early Evolution of Metazoan Transcription Factors ». *Current Opinion in Genetics & Development* 19(6). Consulté 21 septembre 2020 (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19880309/>).

- Delker, Rebecca K., Vikram Ranade, Ryan Loker, Roumen Voutev, et Richard S. Mann. 2019. « Low Affinity Binding Sites in an Activating CRM Mediate Negative Autoregulation of the *Drosophila* Hox Gene Ultrabithorax ». *PLoS Genetics* 15(10):e1008444. doi: 10.1371/journal.pgen.1008444.
- Denans, Nicolas, Tadahiro Imura, et Olivier Pourquié. 2015. « Hox genes control vertebrate body elongation by collinear Wnt repression » édité par M. E. Bronner. *eLife* 4:e04379. doi: 10.7554/eLife.04379.
- Denell, Robin E., Susan J. Brown, et Richard W. Beeman. 1996. « Evolution of the Organization and Function of Insect Homeotic Complexes ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 7(4):527-38. doi: 10.1006/scdb.1996.0067.
- Deng, Mingxi, Ying Wang, Lina Zhang, Yang Yang, Shengshuo Huang, Jiguang Wang, Hao Ge, Toyotaka Ishibashi, et Yan Yan. 2019. « Single Cell Transcriptomic Landscapes of Pattern Formation, Proliferation and Growth in *Drosophila* Wing Imaginal Discs ». *Development* 146(18). doi: 10.1242/dev.179754.
- Deora, Tanvi, Amit Kumar Singh, et Sanjay P. Sane. 2015. « Biomechanical basis of wing and haltere coordination in flies ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(5):1481-86. doi: 10.1073/pnas.1412279112.
- Dernburg, A. F., K. W. Broman, J. C. Fung, W. F. Marshall, J. Philips, D. A. Agard, et J. W. Sedat. 1996. « Perturbation of Nuclear Architecture by Long-Distance Chromosome Interactions ». *Cell* 85(5):745-59. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81240-4.
- Deutsch, Jean S., et Emmanuèle Mouchel-Vielh. 2003. « Hox Genes and the Crustacean Body Plan ». *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 25(9):878-87. doi: 10.1002/bies.10319.
- Dickinson, Michael. 2006. « Insect Flight ». *Current Biology: CB* 16(9):R309-314. doi: 10.1016/j.cub.2006.03.087.
- Dietzl, Georg, Doris Chen, Frank Schnorrer, Kuan-Chung Su, Yulia Barinova, Michaela Fellner, Beate Gasser, Kaolin Kinsey, Silvia Oettel, Susanne Scheiblauer, Africa Couto, Vincent Marra, Krystyna Keleman, et Barry J. Dickson. 2007. « A Genome-Wide Transgenic RNAi Library for Conditional Gene Inactivation in *Drosophila* ». *Nature* 448(7150):151-56. doi: 10.1038/nature05954.
- Dingar, Dharmendra, Manpreet Kalkat, Pak-Kei Chan, Tharan Srikumar, Swneke D. Bailey, William B. Tu, Etienne Coyaud, Romina Ponzielli, Max Kolyar, Igor Jurisica, Annie Huang, Mathieu Lupien, Linda Z. Penn, et Brian Raught. 2015. « BioID Identifies Novel C-MYC Interacting Partners in Cultured Cells and Xenograft Tumors ». *Journal of Proteomics* 118:95-111. doi: 10.1016/j.jprot.2014.09.029.
- Dingwall, A. K., S. J. Beek, C. M. McCallum, J. W. Tamkun, G. V. Kalpana, S. P. Goff, et M. P. Scott. 1995. « The *Drosophila* snr1 and brm proteins are related to yeast SWI/SNF proteins and are components of a large protein complex. » *Molecular Biology of the Cell* 6(7):777-91. doi: 10.1091/mbc.6.7.777.

- Divoux, Adeline, Hui Xie, Jian-Liang Li, Kalypso Karastergiou, Ranjan J. Perera, R. Jeffrey Chang, Susan K. Fried, et Steven R. Smith. 2017. « MicroRNA-196 Regulates HOX Gene Expression in Human Gluteal Adipose Tissue ». *Obesity* 25(8):1375-83. doi: 10.1002/oby.21896.
- Dixon, Jesse R., Siddarth Selvaraj, Feng Yue, Audrey Kim, Yan Li, Yin Shen, Ming Hu, Jun S. Liu, et Bing Ren. 2012. « Topological Domains in Mammalian Genomes Identified by Analysis of Chromatin Interactions ». *Nature* 485(7398):376-80. doi: 10.1038/nature11082.
- Domsch, Katrin, Julie Carnesecchi, Vanessa Disela, Jana Friedrich, Nils Trost, Olga Ermakova, Maria Polychronidou, et Ingrid Lohmann. 2019. « The Hox Transcription Factor Ubx Stabilizes Lineage Commitment by Suppressing Cellular Plasticity in Drosophila ». *ELife* 8. doi: 10.7554/eLife.42675.
- Draime, Amandine, Laure Bridoux, Yacine Graba, et René Rezsöházy. 2018. « Post-Translational Modifications of HOX Proteins, an Underestimated Issue ». *International Journal of Developmental Biology* 62(11-12):733-44. doi: 10.1387/ijdb.180178rr.
- Driever, W., G. Thoma, et C. Nüsslein-Volhard. 1989. « Determination of Spatial Domains of Zygotic Gene Expression in the Drosophila Embryo by the Affinity of Binding Sites for the Bicoid Morphogen ». *Nature* 340(6232):363-67. doi: 10.1038/340363a0.
- Duboule, D., et P. Dollé. 1989. « The Structural and Functional Organization of the Murine HOX Gene Family Resembles That of Drosophila Homeotic Genes ». *The EMBO Journal* 8(5):1497-1505.
- Duboule, Denis. 2007. « The Rise and Fall of Hox Gene Clusters ». *Development (Cambridge, England)* 134(14):2549-60. doi: 10.1242/dev.001065.
- Duboule, Denis, et Gines Morata. 1994. « Colinearity and Functional Hierarchy among Genes of the Homeotic Complexes ». *Trends in Genetics* 10(10):358-64. doi: 10.1016/0168-9525(94)90132-5.
- DuBuc, Timothy Q., Joseph F. Ryan, Chuya Shinzato, Nori Satoh, et Mark Q. Martindale. 2012. « Coral Comparative Genomics Reveal Expanded Hox Cluster in the Cnidarian–Bilaterian Ancestor ». *Integrative and Comparative Biology* 52(6):835-41. doi: 10.1093/icb/ics098.
- DuBuc, Timothy Q., Thomas B. Stephenson, Amber Q. Rock, et Mark Q. Martindale. 2018. « Hox and Wnt Pattern the Primary Body Axis of an Anthozoan Cnidarian before Gastrulation ». *Nature Communications* 9(1):1-12. doi: 10.1038/s41467-018-04184-x.
- Duffraisse, Marilyne, Bruno Hudry, et Samir Merabet. 2014. « Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) in Live Drosophila Embryos ». P. 307-18 in *Hox Genes: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, édité par Y. Graba et R. Rezsöházy. New York, NY: Springer.

- Duncan, Ian, et Geoffrey Montgomery. 2002. « E. B. Lewis and the Bithorax Complex: Part I ». *Genetics* 160(4):1265-72.
- Durston, Antony J. 2020. « A Tribute to Lewis Wolpert and His Ideas on the 50th Anniversary of the Publication of His Paper 'Positional Information and the Spatial Pattern of Differentiation'. Evidence for a Timing Mechanism for Setting Up the Vertebrate Anterior-Posterior (A-P) Axis ». *International Journal of Molecular Sciences* 21(7):2552. doi: 10.3390/ijms21072552.
- Elias-Neto, Moysés, et Xavier Belles. 2016. « Tergal and pleural structures contribute to the formation of ectopic prothoracic wings in cockroaches ». *Royal Society Open Science* 3(8):160347. doi: 10.1098/rsos.160347.
- Enderle, Daniel, Christian Beisel, Michael B. Stadler, Moritz Gerstung, Prashanth Athri, et Renato Paro. 2011. « Polycomb Preferentially Targets Stalled Promoters of Coding and Noncoding Transcripts ». *Genome Research* 21(2):216-26. doi: 10.1101/gr.114348.110.
- Enriquez, Jonathan, Hadi Boukhatmi, Laurence Dubois, Anthony A. Philippakis, Martha L. Bulyk, Alan M. Michelson, Michèle Crozatier, et Alain Vincent. 2010. « Multi-Step Control of Muscle Diversity by Hox Proteins in the Drosophila Embryo ». *Development (Cambridge, England)* 137(3):457-66. doi: 10.1242/dev.045286.
- Ernst, Patricia, Meghann Mabon, Alan J. Davidson, Leonard I. Zon, et Stanley J. Korsmeyer. 2004. « An Mll-Dependent Hox Program Drives Hematopoietic Progenitor Expansion ». *Current Biology* 14(22):2063-69. doi: 10.1016/j.cub.2004.11.012.
- Ewing, Rob M., Peter Chu, Fred Elisma, Hongyan Li, Paul Taylor, Shane Climie, Linda McBroom-Cerajewski, Mark D. Robinson, Liam O'Connor, Michael Li, Rod Taylor, Moyez Dharsee, Yuen Ho, Adrian Heilbut, Lynda Moore, Shudong Zhang, Olga Ornatsky, Yury V. Bukhman, Martin Ethier, Yinglun Sheng, Julian Vasilescu, Mohamed Abu-Farha, Jean-Philippe Lambert, Henry S. Duewel, Ian I. Stewart, Bonnie Kuehl, Kelly Hogue, Karen Colwill, Katharine Gladwish, Brenda Muskat, Robert Kinach, Sally-Lin Adams, Michael F. Moran, Gregg B. Morin, Thodoros Topaloglou, et Daniel Figeys. 2007. « Large-scale mapping of human protein–protein interactions by mass spectrometry ». *Molecular Systems Biology* 3:89. doi: 10.1038/msb4100134.
- Falciani, F., B. Hausdorf, R. Schröder, M. Akam, D. Tautz, R. Denell, et S. Brown. 1996. « Class 3 Hox Genes in Insects and the Origin of Zen ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93(16):8479-84. doi: 10.1073/pnas.93.16.8479.
- Farkas, Gabriella, Janos Gausz, Mireille Galloni, Günter Reuter, Henrik Gyurkovics, et François Karch. 1994. « The Trithorax-like Gene Encodes the Drosophila GAGA Factor ». *Nature* 371(6500):806-8. doi: 10.1038/371806a0.
- Farley, Emma K., Katrina M. Olson, Wei Zhang, Daniel S. Rokhsar, et Michael S. Levine. 2016. « Syntax Compensates for Poor Binding Sites to Encode Tissue Specificity of Developmental Enhancers ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(23):6508-13. doi: 10.1073/pnas.1605085113.

- Fasano, L., Laurence Röder, N. Coré, E. Alexandre, C. Vola, B. Jacq, et S. Kerridge. 1991. « The gene *teashirt* is required for the development of *Drosophila* embryonic trunk segments and encodes a protein with widely spaced zinc finger motifs ». *Cell* 64(1):63–79.
- Faucheux, M., J. Y. Roignant, S. Netter, J. Charollais, C. Antoniewski, et L. Théodore. 2003. « Batman Interacts with Polycomb and Trithorax Group Genes and Encodes a BTB/POZ Protein That Is Included in a Complex Containing GAGA Factor ». *Molecular and Cellular Biology* 23(4):1181-95. doi: 10.1128/mcb.23.4.1181-1195.2003.
- Feiner, Nathalie, et Natalie J. Wood. 2019. « Lizards Possess the Most Complete Tetrapod Hox Gene Repertoire despite Pervasive Structural Changes in Hox Clusters ». *Evolution & Development* 21(4):e12300. doi: 10.1111/ede.12300.
- Feng, J. A., R. C. Johnson, et R. E. Dickerson. 1994. « Hin Recombinase Bound to DNA: The Origin of Specificity in Major and Minor Groove Interactions ». *Science (New York, N.Y.)* 263(5145):348-55. doi: 10.1126/science.8278807.
- Fernández-Suárez, Marta, T. Scott Chen, et Alice Y. Ting. 2008. « Protein–Protein Interaction Detection in Vitro and in Cells by Proximity Biotinylation ». *Journal of the American Chemical Society* 130(29):9251-53. doi: 10.1021/ja801445p.
- Ferrier, D. E., et P. W. Holland. 2001. « Ancient Origin of the Hox Gene Cluster ». *Nature Reviews. Genetics* 2(1):33-38. doi: 10.1038/35047605.
- Fields, Stanley, et Ok-kyu Song. 1989. « A Novel Genetic System to Detect Protein–Protein Interactions ». *Nature* 340(6230):245-46. doi: 10.1038/340245a0.
- Filippova, G. N., S. Fagerlie, E. M. Klenova, C. Myers, Y. Dehner, G. Goodwin, P. E. Neiman, S. J. Collins, et V. V. Lobanenkova. 1996. « An Exceptionally Conserved Transcriptional Repressor, CTCF, Employs Different Combinations of Zinc Fingers to Bind Diverged Promoter Sequences of Avian and Mammalian c-Myc Oncogenes ». *Molecular and Cellular Biology* 16(6):2802-13. doi: 10.1128/mcb.16.6.2802.
- Finnerty, John R., Kevin Pang, Pat Burton, Dave Paulson, et Mark Q. Martindale. 2004. « Origins of Bilateral Symmetry: Hox and Dpp Expression in a Sea Anemone ». *Science* 304(5675):1335-37. doi: 10.1126/science.1091946.
- Fisher, C. L., I. Lee, S. Bloyer, S. Bozza, J. Chevalier, A. Dahl, C. Bodner, C. D. Helgason, J. L. Hess, R. K. Humphries, et H. W. Brock. 2010. « Additional Sex Combs-like 1 Belongs to the Enhancer of Trithorax and Polycomb Group and Genetically Interacts with Cbx2 in Mice ». *Developmental Biology* 337(1):9-15. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.10.004.
- Flower, J. W. 1964. « On the Origin of Flight in Insects ». *Journal of Insect Physiology* 10(1):81-88. doi: 10.1016/0022-1910(64)90096-4.
- Foos, Nicolas, C. Maurel-Zaffran, M. Maté, R. Vincentelli, M. Hainaut, H. Bérenger, J. Pradel, A. J. Saurin, M. Ortiz-Lombardía, et Y. Graba. 2015. « A flexible extension of the

- Drosophila ultrabithorax* homeodomain defines a novel Hox/PBC interaction mode. » *Structure*. doi: 10.1016/j.str.2014.12.011.
- Fortunato, Sofia A. V., Marcin Adamski, Olivia Mendivil Ramos, Sven Leininger, Jing Liu, David E. K. Ferrier, et Maja Adamska. 2014. « Calcisponges Have a ParaHox Gene and Dynamic Expression of Dispersed NK Homeobox Genes ». *Nature* 514(7524):620-23. doi: 10.1038/nature13881.
- Friedrich, Jana, Sebastian Sorge, Fatmire Bujupi, Michael P. Eichenlaub, Natalie G. Schulz, Jochen Wittbrodt, et Ingrid Lohmann. 2016. « Hox Function Is Required for the Development and Maintenance of the *Drosophila* Feeding Motor Unit ». *Cell Reports* 14(4):850-60. doi: 10.1016/j.celrep.2015.12.077.
- Fristrom, D., P. Gotwals, S. Eaton, T. B. Kornberg, M. Sturtevant, E. Bier, et J. W. Fristrom. 1994. « Blistered: A Gene Required for Vein/Intervein Formation in Wings of *Drosophila* ». *Development (Cambridge, England)* 120(9):2661-71.
- Frith, Martin C., Alistair R. Forrest, Ehsan Nourbakhsh, Ken C. Pang, Chikatoshi Kai, Jun Kawai, Piero Carninci, Yoshihide Hayashizaki, Timothy L. Bailey, et Sean M. Grimmond. 2006. « The Abundance of Short Proteins in the Mammalian Proteome ». *PLOS Genetics* 2(4):e52. doi: 10.1371/journal.pgen.0020052.
- Fu, Sheng-Jie, Jin-Li Zhang, Sun-Jie Chen, Hao-Hao Chen, Yi-Lai Liu, et Hai-Jun Xu. 2020. « Functional Analysis of Ultrabithorax in the Wing-Dimorphic Planthopper *Nilaparvata lugens* (Stål, 1854) (Hemiptera: Delphacidae) ». *Gene* 737:144446. doi: 10.1016/j.gene.2020.144446.
- Furukubo-Tokunaga, K., S. Flister, et W. J. Gehring. 1993. « Functional Specificity of the Antennapedia Homeodomain ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(13):6360-64. doi: 10.1073/pnas.90.13.6360.
- Fuyama, Y. 1979. « A Visual Stimulus in the Courtship Of *Drosophila* *Suzukii* ». *Experientia* 35(10):1327-28. doi: 10.1007/BF01963987.
- G, Struhl, et Akam M. 1985. « Altered Distributions of Ultrabithorax Transcripts in Extra Sex Combs Mutant Embryos of *Drosophila*. » *The EMBO Journal* 4(12):3259-64. doi: 10.1002/j.1460-2075.1985.tb04075.x.
- Galant, Ron, et Sean B. Carroll. 2002. « Evolution of a Transcriptional Repression Domain in an Insect Hox Protein ». *Nature* 415(6874):910-13. doi: 10.1038/nature717.
- Galant, Ron, Christopher M. Walsh, et Sean B. Carroll. 2002. « Hox Repression of a Target Gene: Extradenticle-Independent, Additive Action through Multiple Monomer Binding Sites ». *Development (Cambridge, England)* 129(13):3115-26.
- Galliot, B. 2005. « Evo-Devo: Relaxed Constraints on Hox Gene Clustering during Evolution ». *Heredity* 94(3):277-277. doi: 10.1038/sj.hdy.6800624.

- Gambetta, Maria Cristina, et Eileen E. M. Furlong. 2018. « The Insulator Protein CTCF Is Required for Correct Hox Gene Expression, but Not for Embryonic Development in *Drosophila* ». *Genetics* 210(1):129-36. doi: 10.1534/genetics.118.301350.
- Gangloff, Yann-Gaël, Jean-Christophe Pointud, Sylvie Thuault, Lucie Carré, Christophe Romier, Selen Muratoglu, Marjorie Brand, Laszlo Tora, Jean-Louis Couderc, et Irwin Davidson. 2001. « The TFIID Components Human TAFII140 And *Drosophila* BIP2 (TAFII155) Are Novel Metazoan Homologues of Yeast TAFII47 Containing a Histone Fold and a PHD Finger ». *Molecular and Cellular Biology* 21(15):5109-21. doi: 10.1128/MCB.21.15.5109-5121.2001.
- Garaulet, Daniel L., David Foronda, Manuel Calleja, et Ernesto Sánchez-Herrero. 2008. « Polycomb-Dependent Ultrabithorax Hox Gene Silencing Induced by High Ultrabithorax Levels in *Drosophila* ». *Development* 135(19):3219-28. doi: 10.1242/dev.025809.
- Garces, Alain, et Stefan Thor. 2006. « Specification of *Drosophila* ACC Motoneuron Identity by a Genetic Cascade Involving Even-Skipped, Grain and Zfh1 ». *Development* 133(8):1445-55. doi: 10.1242/dev.02321.
- Garcia-Fernández, J. 2005. « Hox, ParaHox, ProtoHox: Facts and Guesses ». *Heredity* 94(2):145-52. doi: 10.1038/sj.hdy.6800621.
- Gauchat, Dominique, Françoise Mazet, Cédric Berney, Michèle Schummer, Sylvia Kreger, Jan Pawlowski, et Brigitte Galliot. 2000. « Evolution of Antp-Class Genes and Differential Expression of Hydra Hox/ParaHox Genes in Anterior Patterning ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(9):4493-98. doi: 10.1073/pnas.97.9.4493.
- Gavis, E. R., et D. S. Hogness. 1991. « Phosphorylation, Expression and Function of the Ultrabithorax Protein Family in *Drosophila Melanogaster* ». *Development (Cambridge, England)* 112(4):1077-93.
- Gebelein, Brian, Joaquim Culi, Hyung Don Ryoo, Wen Zhang, et Richard S. Mann. 2002. « Specificity of Distalless Repression and Limb Primordia Development by Abdominal Hox Proteins ». *Developmental Cell* 3(4):487-98. doi: 10.1016/S1534-5807(02)00257-5.
- Gebelein, Brian, et Richard S. Mann. 2007. « Compartmental modulation of abdominal Hox expression by engrailed and sloppy-paired patterns the fly ectoderm ». *Developmental biology* 308(2):593-605. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.05.017.
- Gebelein, Brian, Daniel J. McKay, et Richard S. Mann. 2004. « Direct Integration of Hox and Segmentation Gene Inputs during *Drosophila* Development ». *Nature* 431(7009):653-59. doi: 10.1038/nature02946.
- Gehring, W. J., M. Affolter, et T. Bürglin. 1994. « Homeodomain Proteins ». *Annual Review of Biochemistry* 63:487-526. doi: 10.1146/annurev.bi.63.070194.002415.

- Geisler, Sarah J., et Renato Paro. 2015. « Trithorax and Polycomb Group-Dependent Regulation: A Tale of Opposing Activities ». *Development* 142(17):2876-87. doi: 10.1242/dev.120030.
- Gheisari, Elham, Mostafa Aakhte, et H. Arno J. Müller. 2020. « Gastrulation in *Drosophila Melanogaster*: Genetic Control, Cellular Basis and Biomechanics ». *Mechanisms of Development* 163:103629. doi: 10.1016/j.mod.2020.103629.
- Gilbert, Scott F. 2000. « The Origins of Anterior-Posterior Polarity ». *Developmental Biology*. 6th Edition.
- Gildea, J. J., R. Lopez, et A. Shearn. 2000. « A Screen for New Trithorax Group Genes Identified Little Imaginal Discs, the *Drosophila Melanogaster* Homologue of Human Retinoblastoma Binding Protein 2 ». *Genetics* 156(2):645-63.
- Giorgetti, Luca, Trevor Siggers, Guido Tiana, Greta Caprara, Samuele Notarbartolo, Teresa Corona, Manolis Pasparakis, Paolo Milani, Martha L. Bulyk, et Gioacchino Natoli. 2010. « Noncooperative Interactions between Transcription Factors and Clustered DNA Binding Sites Enable Graded Transcriptional Responses to Environmental Inputs ». *Molecular Cell* 37(3):418-28. doi: 10.1016/j.molcel.2010.01.016.
- Gompel, Nicolas, Benjamin Prud'homme, Patricia J. Wittkopp, Victoria A. Kassner, et Sean B. Carroll. 2005. « Chance Caught on the Wing: Cis-Regulatory Evolution and the Origin of Pigment Patterns in *Drosophila* ». *Nature* 433(7025):481-87. doi: 10.1038/nature03235.
- Gonzalez, Federico, Denis Duboule, et François Spitz. 2007. « Transgenic Analysis of Hoxd Gene Regulation during Digit Development ». *Developmental Biology* 306(2):847-59. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.03.020.
- González-Gaitán, M. A., J. L. Micol, et A. García-Bellido. 1990. « Developmental Genetic Analysis of Contrabithorax Mutations in *Drosophila Melanogaster* ». *Genetics* 126(1):139-55.
- Gotea, Valer, Axel Visel, John M. Westlund, Marcelo A. Nobrega, Len A. Pennacchio, et Ivan Ovcharenko. 2010. « Homotypic Clusters of Transcription Factor Binding Sites Are a Key Component of Human Promoters and Enhancers ». *Genome Research* 20(5):565-77. doi: 10.1101/gr.104471.109.
- Graham, A., N. Papalopulu, et R. Krumlauf. 1989. « The Murine and *Drosophila* Homeobox Gene Complexes Have Common Features of Organization and Expression ». *Cell* 57(3):367-78. doi: 10.1016/0092-8674(89)90912-4.
- Grenier, Jennifer K., et Sean B. Carroll. 2000. « Functional Evolution of the Ultrabithorax Protein ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(2):704-9. doi: 10.1073/pnas.97.2.704.
- Grenier, Jennifer K., Theodore L. Garber, Robert Warren, Paul M. Whittington, et Sean Carroll. 1997. « Evolution of the Entire Arthropod Hox Gene Set Predated the Origin and

- Radiation of the Onychophoran/Arthropod Clade ». *Current Biology* 7(8):547-53. doi: 10.1016/S0960-9822(06)00253-3.
- Gross, C. T., et W. McGinnis. 1996. « DEAF-1, a Novel Protein That Binds an Essential Region in a Deformed Response Element ». *The EMBO Journal* 15(8):1961-70.
- Grossniklaus, Ueli, et Renato Paro. 2014. « Transcriptional Silencing by Polycomb-Group Proteins ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6(11):a019331. doi: 10.1101/cshperspect.a019331.
- Gu, Y., T. Nakamura, H. Alder, R. Prasad, O. Canaani, G. Cimino, C. M. Croce, et E. Canaani. 1992. « The t(4;11) Chromosome Translocation of Human Acute Leukemias Fuses the ALL-1 Gene, Related to Drosophila Trithorax, to the AF-4 Gene ». *Cell* 71(4):701-8. doi: 10.1016/0092-8674(92)90603-a.
- Gummalla, Maheshwar, Robert K. Maeda, Javier J. Castro Alvarez, Henrik Gyurkovics, Swetha Singari, Kevin A. Edwards, François Karch, et Welcome Bender. 2012. « Abd-A Regulation by the lab-8 Noncoding RNA ». *PLoS Genetics* 8(5):e1002720. doi: 10.1371/journal.pgen.1002720.
- Gupta, Gagan D., Étienne Coyaud, João Gonçalves, Bahareh A. Mojarad, Yi Liu, Qianzhu Wu, Ladan Gheiratmand, David Comartin, Johnny M. Tkach, Sally W. T. Cheung, Mikhail Bashkurov, Monica Hasegan, James D. Knight, Zhen-Yuan Lin, Markus Schueler, Friedhelm Hildebrandt, Jason Moffat, Anne-Claude Gingras, Brian Raught, et Laurence Pelletier. 2015. « A Dynamic Protein Interaction Landscape of the Human Centrosome-Cilium Interface ». *Cell* 163(6):1484-99. doi: 10.1016/j.cell.2015.10.065.
- Hagstrom, K., M. Muller, et P. Schedl. 1997. « A Polycomb and GAGA Dependent Silencer Adjoins the Fab-7 Boundary in the Drosophila Bithorax Complex ». *Genetics* 146(4):1365-80.
- Hamaratoglu, Fisun, Aitana Morton de Lachapelle, George Pyrowolakis, Sven Bergmann, et Markus Affolter. 2011. « Dpp Signaling Activity Requires Pentagone to Scale with Tissue Size in the Growing Drosophila Wing Imaginal Disc ». *PLOS Biology* 9(10):e1001182. doi: 10.1371/journal.pbio.1001182.
- Hamdan, Fadi F., Martin Audet, Philippe Garneau, Jerry Pelletier, et Michel Bouvier. 2005. « High-Throughput Screening of G Protein-Coupled Receptor Antagonists Using a Bioluminescence Resonance Energy Transfer 1-Based Beta-Arrestin2 Recruitment Assay ». *Journal of Biomolecular Screening* 10(5):463-75. doi: 10.1177/1087057105275344.
- Hanson, Robin D., Jay L. Hess, Benjamin D. Yu, Patricia Ernst, Maarten van Lohuizen, Anton Berns, Nathalie M. T. van der Lugt, Cooduvalli S. Shashikant, Frank H. Ruddle, Masao Seto, et Stanley J. Korsmeyer. 1999. « Mammalian Trithorax and Polycomb-Group Homologues Are Antagonistic Regulators of Homeotic Development ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(25):14372-77. doi: 10.1073/pnas.96.25.14372.

- Harrison, Paul M., Anuj Kumar, Ning Lang, Michael Snyder, et Mark Gerstein. 2002. « A Question of Size: The Eukaryotic Proteome and the Problems in Defining It ». *Nucleic Acids Research* 30(5):1083-90. doi: 10.1093/nar/30.5.1083.
- Hauri, Simon, Federico Comoglio, Makiko Seimiya, Moritz Gerstung, Timo Glatter, Klaus Hansen, Ruedi Aebersold, Renato Paro, Matthias Gstaiger, et Christian Beisel. 2016. « A High-Density Map for Navigating the Human Polycomb Complexome ». *Cell Reports* 17(2):583-95. doi: 10.1016/j.celrep.2016.08.096.
- He, Shuonan, Florencia Del Viso, Cheng-Yi Chen, Aissam Ikmi, Amanda E. Kroesen, et Matthew C. Gibson. 2018. « An Axial Hox Code Controls Tissue Segmentation and Body Patterning in *Nematostella vectensis* ». *Science (New York, N.Y.)* 361(6409):1377-80. doi: 10.1126/science.aar8384.
- Hersh, Bradley M., et Sean B. Carroll. 2005. « Direct Regulation of Knot Gene Expression by Ultrabithorax and the Evolution of Cis-Regulatory Elements in *Drosophila* ». *Development* 132(7):1567-77. doi: 10.1242/dev.01737.
- Hersh, Bradley M., Craig E. Nelson, Samantha J. Stoll, Jason E. Norton, Thomas J. Albert, et Sean B. Carroll. 2007a. « The UBX-Regulated Network in the Haltere Imaginal Disc of *D. melanogaster* ». *Developmental Biology* 302(2):717-27. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.11.011.
- Hersh, Bradley M., Craig E. Nelson, Samantha J. Stoll, Jason E. Norton, Thomas J. Albert, et Sean B. Carroll. 2007b. « The UBX-regulated network in the haltere imaginal disc of *D. melanogaster* ». *Developmental Biology* 302(2):717-27. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.11.011.
- Hirth, Frank, Thomas Loop, Boris Egger, David F. B. Miller, Thomas C. Kaufman, et Heinrich Reichert. 2001. « Functional Equivalence of Hox Gene Products in the Specification of the Tritocerebrum during Embryonic Brain Development of *Drosophila* ». *Development* 128(23):4781-88.
- Holec, Sarah, et Frédéric Berger. 2012. « Polycomb Group Complexes Mediate Developmental Transitions in Plants ». *Plant Physiology* 158(1):35-43. doi: 10.1104/pp.111.186445.
- Hsiao, Hao-Ching, Kim L. Gonzalez, Daniel J. Catanese, Kristopher E. Jordy, Kathleen S. Matthews, et Sarah E. Bondos. 2014. « The Intrinsically Disordered Regions of the *Drosophila melanogaster* Hox Protein Ultrabithorax Select Interacting Proteins Based on Partner Topology ». *PLoS ONE* 9(10). doi: 10.1371/journal.pone.0108217.
- Hsieh, James J. D., Emily H. Y. Cheng, et Stanley J. Korsmeyer. 2003. « Taspase1: A Threonine Aspartase Required for Cleavage of MLL and Proper HOX Gene Expression ». *Cell* 115(3):293-303. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00816-x.
- Hu, Yong, Xiaokun Liu, Anding Zhang, Hongbo Zhou, Ziduo Liu, Huanchun Chen, et Meilin Jin. 2015. « CHD3 facilitates vRNP nuclear export by interacting with NES1 of influenza A

- virus NS2 ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 72(5):971-82. doi: 10.1007/s00018-014-1726-9.
- Hu, Yonggang, David M. Linz, et Armin P. Moczek. 2019. « Beetle Horns Evolved from Wing Serial Homologs ». *Science (New York, N.Y.)* 366(6468):1004-7. doi: 10.1126/science.aaw2980.
- Huan, Pin, Qian Wang, Sujian Tan, et Baozhong Liu. 2020. « Dorsoventral Decoupling of Hox Gene Expression Underpins the Diversification of Molluscs ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117(1):503-12. doi: 10.1073/pnas.1907328117.
- Huang, Hailiang, Bruno M. Jedynak, et Joel S. Bader. 2007. « Where Have All the Interactions Gone? Estimating the Coverage of Two-Hybrid Protein Interaction Maps ». *PLoS Computational Biology* 3(11). doi: 10.1371/journal.pcbi.0030214.
- Hudry, Bruno, Sophie Remacle, Marie-Claire Delfini, René Rezsöházy, Yacine Graba, et Samir Merabet. 2012. « Hox Proteins Display a Common and Ancestral Ability to Diversify Their Interaction Mode with the PBC Class Cofactors ». *PLoS Biology* 10(6):e1001351. doi: 10.1371/journal.pbio.1001351.
- Hudry, Bruno, Morgane Thomas-Chollier, Yael Volovik, Marilyne Duffraisse, Amélie Dard, Dale Frank, Ulrich Technau, et Samir Merabet. 2014. « Molecular insights into the origin of the Hox-TALE patterning system » édité par D. Tautz. *eLife* 3:e01939. doi: 10.7554/eLife.01939.
- Hudry, Bruno, Séverine Viala, Yacine Graba, et Samir Merabet. 2011. « Visualization of Protein Interactions in Living Drosophila Embryos by the Bimolecular Fluorescence Complementation Assay ». *BMC Biology* 9:5. doi: 10.1186/1741-7007-9-5.
- Hueber, Stefanie D., Daniela Bezdán, Stefan R. Henz, Martina Blank, Haijia Wu, et Ingrid Lohmann. 2007. « Comparative Analysis of Hox Downstream Genes in Drosophila ». *Development (Cambridge, England)* 134(2):381-92. doi: 10.1242/dev.02746.
- Hughes, Cynthia L., et Thomas C. Kaufman. 2002. « Exploring the Myriapod Body Plan: Expression Patterns of the Ten Hox Genes in a Centipede ». *Development* 129(5):1225-38.
- Hung, Victoria, Peng Zou, Hyun-Woo Rhee, Namrata D. Udeshi, Valentin Cracan, Tanya Svinkina, Steven A. Carr, Vamsi K. Mootha, et Alice Y. Ting. 2014. « Proteomic Mapping of the Human Mitochondrial Intermembrane Space in Live Cells via Ratiometric APEX Tagging ». *Molecular Cell* 55(2):332-41. doi: 10.1016/j.molcel.2014.06.003.
- Hunter, Philip. 2007. « The nature of flight. The molecules and mechanics of flight in animals ». *EMBO Reports* 8(9):811-13. doi: 10.1038/sj.embor.7401050.
- Huttlin, Edward L., Raphael J. Bruckner, Joao A. Paulo, Joe R. Cannon, Lily Ting, Kurt Baltier, Greg Colby, Fana Gebreab, Melanie P. Gygi, Hannah Parzen, John Szpyt, Stanley Tam, Gabriela Zarraga, Laura Pontano-Vaites, Sharan Swarup, Anne E. White, Devin K.

- Schweppe, Ramin Rad, Brian K. Erickson, Robert A. Obar, K. G. Guruharsha, Kejie Li, Spyros Artavanis-Tsakonas, Steven P. Gygi, et J. Wade Harper. 2017. « Architecture of the Human Interactome Defines Protein Communities and Disease Networks ». *Nature* 545(7655):505-9. doi: 10.1038/nature22366.
- Ikuta, Tetsuro, et Hidetoshi Saiga. 2005. « Organization of Hox Genes in Ascidians: Present, Past, and Future ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 233(2):382-89. doi: 10.1002/dvdy.20374.
- In der Rieden, Paul M. J., Gaëll Mainguy, Joost M. Woltering, et Antony J. Durston. 2004. « Homeodomain to Hexapeptide or PBC-Interaction-Domain Distance: Size Apparently Matters ». *Trends in Genetics: TIG* 20(2):76-79. doi: 10.1016/j.tig.2003.12.001.
- Ingham, P. W. 1983. « Differential Expression of Bithorax Complex Genes in the Absence of the Extra Sex Combs and Trithorax Genes ». *Nature* 306(5943):591-93. doi: 10.1038/306591a0.
- Ingham, P. W. 1985. « A Clonal Analysis of the Requirement for the Trithorax Gene in the Diversification of Segments in Drosophila ». *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 89:349-65.
- Issa, A. Raouf, João Picao-Osorio, Nuno Rito, M. Eugenia Chiappe, et Claudio R. Alonso. 2019. « A Single MicroRNA-Hox Gene Module Controls Equivalent Movements in Biomechanically Distinct Forms of Drosophila ». *Current Biology* 29(16):2665-2675.e4. doi: 10.1016/j.cub.2019.06.082.
- Iwamoto, Hiroyuki. 2011. « Structure, Function and Evolution of Insect Flight Muscle ». *Biophysics* 7:21. doi: 10.2142/biophysics.7.21.
- Jaffe, L., H. D. Ryoo, et R. S. Mann. 1997. « A Role for Phosphorylation by Casein Kinase II in Modulating Antennapedia Activity in Drosophila. » *Genes & Development* 11(10):1327-40. doi: 10.1101/gad.11.10.1327.
- Janssen, Ralf, Bo Joakim Eriksson, Noel N. Tait, et Graham E. Budd. 2014. « Onychophoran Hox genes and the evolution of arthropod Hox gene expression ». *Frontiers in Zoology* 11:22. doi: 10.1186/1742-9994-11-22.
- Jaw, Thomas J., Li-Ru You, Paul S. Knoepfler, Li-Chin Yao, Chi-Yun Pai, Chiou-Yang Tang, Li-Ping Chang, Jens Berthelsen, Francesco Blasi, Mark P. Kamps, et Y. Henry Sun. 2000. « Direct Interaction of Two Homeoproteins, Homothorax and Extradenticle, Is Essential for EXD Nuclear Localization and Function ». *Mechanisms of Development* 91(1):279-91. doi: 10.1016/S0925-4773(99)00316-0.
- Jeong, Sangyun, Antonis Rokas, et Sean B. Carroll. 2006. « Regulation of Body Pigmentation by the Abdominal-B Hox Protein and Its Gain and Loss in Drosophila Evolution ». *Cell* 125(7):1387-99. doi: 10.1016/j.cell.2006.04.043.

- Jerković, Ivana, Daniel M. Ibrahim, Guillaume Andrey, Stefan Haas, Peter Hansen, Catrin Janetzki, Irene González Navarrete, Peter N. Robinson, Jochen Hecht, et Stefan Mundlos. 2017. « Genome-Wide Binding of Posterior HOXA/D Transcription Factors Reveals Subgrouping and Association with CTCF ». *PLOS Genetics* 13(1):e1006567. doi: 10.1371/journal.pgen.1006567.
- Jiao, Lianying, et Xin Liu. 2015. « Structural Basis of Histone H3K27 Trimethylation by an Active Polycomb Repressive Complex 2 ». *Science (New York, N.Y.)* 350(6258):aac4383. doi: 10.1126/science.aac4383.
- Joshi, Rohit, Jonathan M. Passner, Remo Rohs, Rinku Jain, Alona Sosinsky, Michael A. Crickmore, Vinitha Jacob, Aneel K. Aggarwal, Barry Honig, et Richard S. Mann. 2007. « Functional specificity of a Hox protein mediated by the recognition of minor groove structure ». *Cell* 131(3):530-43. doi: 10.1016/j.cell.2007.09.024.
- Joshi, Rohit, Liping Sun, et Richard Mann. 2010. « Dissecting the functional specificities of two Hox proteins ». *Genes & Development* 24(14):1533-45. doi: 10.1101/gad.1936910.
- Kamm, Kai, et Bernd Schierwater. 2006. « Ancient Complexity of the Non-Hox ANTP Gene Complement in the Anthozoan *Nematostella vectensis*. Implications for the Evolution of the ANTP Superclass ». *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* 306B(6):589-96. doi: 10.1002/jez.b.21123.
- Karastergiou, Kalypso, Susan K. Fried, Hui Xie, Mi-Jeong Lee, Adeline Divoux, Marcus A. Rosencrantz, R. Jeffrey Chang, et Steven R. Smith. 2013. « Distinct Developmental Signatures of Human Abdominal and Gluteal Subcutaneous Adipose Tissue Depots ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 98(1):362-71. doi: 10.1210/jc.2012-2953.
- Kassis, Judith A., et J. Lesley Brown. 2013. « Polycomb Group Response Elements in *Drosophila* and Vertebrates ». *Advances in genetics* 81:83-118. doi: 10.1016/B978-0-12-407677-8.00003-8.
- Kathirithamby, J. 2018. *Biodiversity of Strepsiptera*. Vol. 2. John Wiley & Sons.
- Kato-Stankiewicz, Juran. 2002. « Inhibitors of Ras/Raf-1 interaction identified by two-hybrid screening revert Ras-dependent transformation phenotypes in human cancer cells - PubMed ». Consulté 31 juillet 2020 (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12391290/>).
- Kehrer, Jessica, Friedrich Frischknecht, et Gunnar R. Mair. 2016. « Proteomic Analysis of the Plasmodium Berghei Gametocyte Egressome and Vesicular BioID of Osmiophilic Body Proteins Identifies Merozoite TRAP-like Protein (MTRAP) as an Essential Factor for Parasite Transmission ». *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 15(9):2852-62. doi: 10.1074/mcp.M116.058263.
- Kennison, J. A. 1995. « The Polycomb and Trithorax Group Proteins of *Drosophila*: Trans-Regulators of Homeotic Gene Function ». *Annual Review of Genetics* 29:289-303. doi: 10.1146/annurev.ge.29.120195.001445.

- Kerppola, Tom K. 2008. « Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) Analysis as a Probe of Protein Interactions in Living Cells ». *Annual Review of Biophysics* 37:465-87. doi: 10.1146/annurev.biophys.37.032807.125842.
- Kerppola, Tom K. 2013. « Multicolor Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) Analysis of Protein Interactions with Alternative Partners ». *Cold Spring Harbor Protocols* 2013(9):798-803. doi: 10.1101/pdb.top077164.
- Khadjeh, Sara, Natascha Turetzek, Matthias Pechmann, Evelyn E. Schwager, Ernst A. Wimmer, Wim G. M. Damen, et Nikola-Michael Prpic. 2012. « Divergent Role of the Hox Gene Antennapedia in Spiders Is Responsible for the Convergent Evolution of Abdominal Limb Repression ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(13):4921-26. doi: 10.1073/pnas.1116421109.
- Khan, Madiha, Ji-Young Youn, Anne-Claude Gingras, Rajagopal Subramaniam, et Darrell Desveaux. 2018. « In Planta Proximity Dependent Biotin Identification (BioID) ». *Scientific Reports* 8(1):9212. doi: 10.1038/s41598-018-27500-3.
- Khavari, P. A., C. L. Peterson, J. W. Tamkun, D. B. Mendel, et G. R. Crabtree. 1993. « BRG1 Contains a Conserved Domain of the SWI2/SNF2 Family Necessary for Normal Mitotic Growth and Transcription ». *Nature* 366(6451):170-74. doi: 10.1038/366170a0.
- Ki, Sw, Kasahara K, Kwon Hj, Eishima J, Takesako K, Cooper Ja, Yoshida M, et Horinouchi S. 1998. « Identification of Radicicol as an Inhibitor of in Vivo Ras/Raf Interaction with the Yeast Two-Hybrid Screening System ». *The Journal of Antibiotics* 51(10). Consulté 31 juillet 2020 (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9917007/>).
- Kido, Kohki, Satoshi Yamanaka, Shogo Nakano, Kou Motani, Souta Shinohara, Akira Nozawa, Hidetaka Kosako, Sohei Ito, et Tatsuya Sawasaki. 2020. « AirID, a Novel Proximity Biotinylation Enzyme, for Analysis of Protein-Protein Interactions ». *ELife* 9. doi: 10.7554/eLife.54983.
- Kim, Dae In, K. C. Birendra, Wenhong Zhu, Khatereh Motamedchaboki, Valérie Doye, et Kyle J. Roux. 2014. « Probing Nuclear Pore Complex Architecture with Proximity-Dependent Biotinylation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(24):E2453-2461. doi: 10.1073/pnas.1406459111.
- Kim, Dae In, Samuel C. Jensen, Kyle A. Noble, Birendra Kc, Kenneth H. Roux, Khatereh Motamedchaboki, et Kyle J. Roux. 2016. « An Improved Smaller Biotin Ligase for BioID Proximity Labeling ». *Molecular Biology of the Cell* 27(8):1188-96. doi: 10.1091/mbc.E15-12-0844.
- Kim, Somi, Nam-Kyung Yu, et Bong-Kiun Kaang. 2015. « CTCF as a Multifunctional Protein in Genome Regulation and Gene Expression ». *Experimental & Molecular Medicine* 47(6):e166-e166. doi: 10.1038/emm.2015.33.
- Klymenko, Tetyana, et Jürg Müller. 2004. « The histone methyltransferases Trithorax and Ash1 prevent transcriptional silencing by Polycomb group proteins ». *EMBO reports* 5(4):373-77. doi: 10.1038/sj.embor.7400111.

- Klymenko, Tetyana, Bernadett Papp, Wolfgang Fischle, Thomas Köcher, Malgorzata Schelder, Cornelia Fritsch, Brigitte Wild, Matthias Wilm, et Jürg Müller. 2006. « A Polycomb Group Protein Complex with Sequence-Specific DNA-Binding and Selective Methyl-Lysine-Binding Activities ». *Genes & Development* 20(9):1110-22. doi: 10.1101/gad.377406.
- Kodama, Yutaka, et Chang-Deng Hu. 2012a. « Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC): A 5-Year Update and Future Perspectives ». *BioTechniques* 53(5):285-98. doi: 10.2144/000113943.
- Kodama, Yutaka, et Chang-Deng Hu. 2012b. « Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC): A 5-Year Update and Future Perspectives ». *BioTechniques* 53(5):285-98. doi: 10.2144/000113943.
- Kodama, Yutaka, et Masamitsu Wada. 2009. « Simultaneous Visualization of Two Protein Complexes in a Single Plant Cell Using Multicolor Fluorescence Complementation Analysis ». *Plant Molecular Biology* 70(1-2):211-17. doi: 10.1007/s11103-009-9467-0.
- Koos, Björn, Janna Paulsson, Malin Jarvius, Betzabe Chavez Sanchez, Brigitte Wrede, Sonja Mertsch, Astrid Jeibmann, Anne Kruse, Ove Peters, Johannes E. A. Wolff, Hans-Joachim Galla, Ola Söderberg, Werner Paulus, Arne Ostman, et Martin Hasselblatt. 2009. « Platelet-Derived Growth Factor Receptor Expression and Activation in Choroid Plexus Tumors ». *The American Journal of Pathology* 175(4):1631-37. doi: 10.2353/ajpath.2009.081022.
- Kopp, Artyom, et John R. True. 2002. « Evolution of Male Sexual Characters in the Oriental *Drosophila Melanogaster* Species Group ». *Evolution & Development* 4(4):278-91. doi: 10.1046/j.1525-142x.2002.02017.x.
- Kozopas, Karen M., Cindy Harryman Samos, et Roel Nusse. 1998. « DWnt-2, a *Drosophila* Wnt gene required for the development of the male reproductive tract, specifies a sexually dimorphic cell fate ». *Genes & Development* 12(8):1155-65.
- Kribelbauer, Judith F., Ryan E. Loker, Siqian Feng, Chaitanya Rastogi, Namiko Abe, H. Tomas Rube, Harmen J. Bussemaker, et Richard S. Mann. 2020. « Context-Dependent Gene Regulation by Homeodomain Transcription Factor Complexes Revealed by Shape-Readout Deficient Proteins ». *Molecular Cell* 78(1):152-167.e11. doi: 10.1016/j.molcel.2020.01.027.
- Kribelbauer, Judith F., Chaitanya Rastogi, Harmen J. Bussemaker, et Richard S. Mann. 2019. « Low-Affinity Binding Sites and the Transcription Factor Specificity Paradox in Eukaryotes ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 35(1):357-79. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100617-062719.
- Krumlauf, R. 1994. « Hox Genes in Vertebrate Development ». *Cell* 78(2):191-201. doi: 10.1016/0092-8674(94)90290-9.
- Kukalová-Peck, J. 1983. « Origin of the insect wing and wing articulation from the arthropodan leg ». doi: 10.1139/z83-217.

- Kukalova-Peck, Jarmila. 1978. « Origin and Evolution of Insect Wings and Their Relation to Metamorphosis, as Documented by the Fossil Record ». *Journal of Morphology* 156(1):53-125. doi: 10.1002/jmor.1051560104.
- Kumar, Pradeep, Kavita Rawat, Tanuj Sharma, Sushila Kumari, Reshu Saxena, Balawant Kumar, Tanvi Baghel, Tayyaba Afshan, Mohammad Imran Siddiqi, Aamir Nazir, Jimut Kanti Ghosh, et Raj Kamal Tripathi. 2019. « HIV-1 Nef Physically Associate with CAMKII δ – ASK-1 Complex to Inhibit P38MAPK Signalling and Apoptosis in Infected Cells ». *Life Sciences* 224:263-73. doi: 10.1016/j.lfs.2019.03.039.
- Kuo, Hsiang-Ling, Pei-Chuan Ho, Shenq-Shyang Huang, et Nan-Shan Chang. 2018. « Chasing the Signaling Run by Tri-Molecular Time-Lapse FRET Microscopy ». *Cell Death Discovery* 4(1):1-9. doi: 10.1038/s41420-018-0047-4.
- Kurafeiski, Jasmin D., Paulo Pinto, et Erich Bornberg-Bauer. 2019. « Evolutionary Potential of Cis-Regulatory Mutations to Cause Rapid Changes in Transcription Factor Binding ». *Genome Biology and Evolution* 11(2):406-14. doi: 10.1093/gbe/evy269.
- Kurata, Shoichiro, Masahiro J. Go, Spyros Artavanis-Tsakonas, et Walter J. Gehring. 2000. « Notch signaling and the determination of appendage identity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(5):2117-22.
- Kuroda, Mitzi I., Hyuckjoon Kang, Sandip De, et Judith A. Kassis. 2020. « Dynamic Competition of Polycomb and Trithorax in Transcriptional Programming ». *Annual review of biochemistry* 89:235-53. doi: 10.1146/annurev-biochem-120219-103641.
- Lacombe, Julie, Olivia Hanley, Heekyung Jung, Polyxeni Philippidou, Gulsen Surmeli, Jonathan Grinstein, et Jeremy S. Dasen. 2013. « Genetic and Functional Modularity of Hox Activities in the Specification of Limb-Innervating Motor Neurons ». *PLoS Genetics* 9(1):e1003184. doi: 10.1371/journal.pgen.1003184.
- Lam, Stephanie S., Jeffrey D. Martell, Kimberli J. Kamer, Thomas J. Deerinck, Mark H. Ellisman, Vamsi K. Mootha, et Alice Y. Ting. 2015. « Directed Evolution of APEX2 for Electron Microscopy and Proximity Labeling ». *Nature Methods* 12(1):51-54. doi: 10.1038/nmeth.3179.
- Lambert, Barbara, Julie Vandeputte, Sophie Remacle, Isabelle Bergiers, Nicolas Simonis, Jean-Claude Twizere, Marc Vidal, et René Rezsöházy. 2012. « Protein Interactions of the Transcription Factor Hoxa1 ». *BMC Developmental Biology* 12(1):29. doi: 10.1186/1471-213X-12-29.
- LaRonde-LeBlanc, Nicole A., et Cynthia Wolberger. 2003. « Structure of HoxA9 and Pbx1 Bound to DNA: Hox Hexapeptide and DNA Recognition Anterior to Posterior ». *Genes & Development* 17(16):2060-72. doi: 10.1101/gad.1103303.
- Lau, Mei Sheng, Matthew G. Schwartz, Sharmistha Kundu, Andrej J. Savol, Peggy I. Wang, Sharon K. Marr, Daniel J. Grau, Patrick Schorderet, Ruslan I. Sadreyev, Clifford J. Tabin, et Robert E. Kingston. 2017. « Mutation of a Nucleosome Compaction Region

- Disrupts Polycomb-Mediated Axial Patterning ». *Science (New York, N.Y.)* 355(6329):1081-84. doi: 10.1126/science.aah5403.
- Laurent, B. C., M. A. Treitel, et M. Carlson. 1991. « Functional Interdependence of the Yeast SNF2, SNF5, and SNF6 Proteins in Transcriptional Activation. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88(7):2687-91. doi: 10.1073/pnas.88.7.2687.
- Leavesley, Silas J., Andrea L. Britain, Lauren K. Cichon, Viacheslav O. Nikolaev, et Thomas C. Rich. 2013. « Assessing FRET using Spectral Techniques ». *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 83(10):898-912. doi: 10.1002/cyto.a.22340.
- Leavesley, Silas J., et Thomas C. Rich. 2016. « Overcoming Limitations of FRET Measurements ». *Cytometry Part A* 89(4):325-27. doi: 10.1002/cyto.a.22851.
- Lee, Jeannie T. 2012. « Epigenetic Regulation by Long Noncoding RNAs ». *Science (New York, N.Y.)* 338(6113):1435-39. doi: 10.1126/science.1231776.
- Lee, You Ri, Jong-Hwa Park, Soo-Hyun Hahm, Lin-Woo Kang, Ji Hyung Chung, Ki-Hyun Nam, Kwang Yeon Hwang, Ick Chan Kwon, et Ye Sun Han. 2010. « Development of Bimolecular Fluorescence Complementation Using Dronpa for Visualization of Protein-Protein Interactions in Cells ». *Molecular Imaging and Biology* 12(5):468-78. doi: 10.1007/s11307-010-0312-2.
- Leeuwen, J. L. van, et Michael H. Dickinson. 1999. « Haltere-mediated equilibrium reflexes of the fruit fly, *Drosophila melanogaster* ». *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 354(1385):903-16. doi: 10.1098/rstb.1999.0442.
- Lehmann, Michael. 2004. « Anything Else but GAGA: A Nonhistone Protein Complex Reshapes Chromatin Structure ». *Trends in Genetics* 20(1):15-22. doi: 10.1016/j.tig.2003.11.005.
- Lehoczky, Jessica A., Melissa E. Williams, et Jeffrey W. Innis. 2004. « Conserved Expression Domains for Genes Upstream and within the HoxA and HoxD Clusters Suggests a Long-Range Enhancer Existed before Cluster Duplication ». *Evolution & Development* 6(6):423-30. doi: 10.1111/j.1525-142X.2004.04050.x.
- Leslie Oct. 17, Mitch, 2019, et 2:00 Pm. 2019. « New Universe of Miniproteins Is Upending Cell Biology and Genetics ». *Science / AAAS*. Consulté 7 octobre 2020 (<https://www.sciencemag.org/news/2019/10/new-universe-miniproteins-upending-cell-biology-and-genetics>).
- Leucht, Philipp, Jae-Beom Kim, Raimy Amasha, Aaron W. James, Sabine Girod, et Jill A. Helms. 2008. « Embryonic Origin and Hox Status Determine Progenitor Cell Fate during Adult Bone Regeneration ». *Development* 135(17):2845-54. doi: 10.1242/dev.023788.

- Lewis, E. B. 1955. « Some Aspects of Position Pseudoallelism ». *The American Naturalist* 89(845):73-89. doi: 10.1086/281867.
- Lewis, E. B. 1963. « Genes and Developmental Pathways ». *American Zoologist* 3(1):33-56.
- Lewis, E. B. 1978a. « A Gene Complex Controlling Segmentation in *Drosophila* ». *Nature* 276(5688):565-70. doi: 10.1038/276565a0.
- Lewis, E. B. 1978b. « A Gene Complex Controlling Segmentation in *Drosophila* ». *Nature* 276(5688):565-70. doi: 10.1038/276565a0.
- Lewis, E. B. 1982. « Control of Body Segment Differentiation in *Drosophila* by the Bithorax Gene Complex ». *Progress in Clinical and Biological Research* 85 Pt A:269-88.
- Lewis, P.H. (1947). New mutants report. *Drosoph. Inf. Serv.* 21, 69.
- Li, Chung-Jung, Tian Hong, Ying-Tsen Tung, Ya-Ping Yen, Ho-Chiang Hsu, Ya-Lin Lu, Mien Chang, Qing Nie, et Jun-An Chen. 2017. « MicroRNA Filters Hox Temporal Transcription Noise to Confer Boundary Formation in the Spinal Cord ». *Nature Communications* 8(1):14685. doi: 10.1038/ncomms14685.
- Li, Jian, Yingyun Liu, Ho Sung Rhee, Saikat Kumar B. Ghosh, Lu Bai, B. Franklin Pugh, et David S. Gilmour. 2013. « Kinetic Competition between Elongation Rate and Binding of NELF Controls Promoter Proximal Pausing ». *Molecular cell* 50(5):711-22. doi: 10.1016/j.molcel.2013.05.016.
- Li, Jiefu, Wei Zhang, Zhenhao Guo, Sophia Wu, Lily Yeh Jan, et Yuh-Nung Jan. 2016. « A Defensive Kicking Behavior in Response to Mechanical Stimuli Mediated by *Drosophila* Wing Margin Bristles ». *Journal of Neuroscience* 36(44):11275-82. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1416-16.2016.
- Li, Jing, Shuyong Zhang, Linghuan Gao, Ying Chen, et Xin Xie. 2011. « A Cell-Based High-Throughput Assay for the Screening of Small-Molecule Inhibitors of P53-MDM2 Interaction ». *Journal of Biomolecular Screening* 16(4):450-56. doi: 10.1177/1087057111399191.
- Li, Lingjie, Jill A. Helms, et Howard Y. Chang. 2016. « Comment on “Hotair Is Dispensable for Mouse Development” ». *PLoS Genetics* 12(12). doi: 10.1371/journal.pgen.1006406.
- Li, Lingjie, Bo Liu, Orly L. Wapinski, Miao-Chih Tsai, Kun Qu, Jiajing Zhang, Jeff C. Carlson, Meihong Lin, Fengqin Fang, Rajnish A. Gupta, Jill A. Helms, et Howard Y. Chang. 2013. « Targeted Disruption of Hotair Leads to Homeotic Transformation and Gene Derepression ». *Cell Reports* 5(1):3-12. doi: 10.1016/j.celrep.2013.09.003.
- Li, Taosui, Jacob W. Hodgson, Svetlana Petruk, Alexander Mazo, et Hugh W. Brock. 2017. « Additional sex combs interacts with enhancer of zeste and trithorax and modulates levels of trimethylation on histone H3K4 and H3K27 during transcription of hsp70 ». *Epigenetics & Chromatin* 10(1):43. doi: 10.1186/s13072-017-0151-3.

- Li, Xiang, Mu-Hua Zhao, Miao-Miao Tian, Jing Zhao, Wan-Lun Cai, et Hong-Xia Hua. 2020. « An InR/Mir-9a/NIUbx Regulatory Cascade Regulates Wing Diphenism in Brown Planthoppers ». *Insect Science* n/a(n/a). doi: 10.1111/1744-7917.12872.
- Liang, Dan, Riga Wu, Jie Geng, Chaolin Wang, et Peng Zhang. 2011. « A general scenario of Hox gene inventory variation among major sarcopterygian lineages ». *BMC Evolutionary Biology* 11:25. doi: 10.1186/1471-2148-11-25.
- Lifanov, Alexander, Vsevolod Makeev, Anna Nazina, et Dmitri Papatsenko. 2003. « Homotypic Regulatory Clusters in Drosophila ». *Genome research* 13:579-88. doi: 10.1101/gr.668403.
- Linz, David M., et Yoshinori Tomoyasu. 2018. « Dual Evolutionary Origin of Insect Wings Supported by an Investigation of the Abdominal Wing Serial Homologs in Tribolium ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115(4):E658-67. doi: 10.1073/pnas.1711128115.
- Liu, Cheng-Ling, Yun-Ping Lim, et Miao-Lin Hu. 2012. « Fucoxanthin Attenuates Rifampin-Induced Cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) and Multiple Drug Resistance 1 (MDR1) Gene Expression Through Pregnane X Receptor (PXR)-Mediated Pathways in Human Hepatoma HepG2 and Colon Adenocarcinoma LS174T Cells ». *Marine Drugs* 10(1):242-57. doi: 10.3390/md10010242.
- Liu, Fangzhou, Xiang Li, Muhua Zhao, Mengjian Guo, Kehong Han, Xinxin Dong, Jing Zhao, Wanlun Cai, Qifa Zhang, et Hongxia Hua. s. d. « Ultrabithorax Is a Key Regulator for the Dimorphism of Wings, a Main Cause for the Outbreak of Planthoppers in Rice ». *National Science Review*. doi: 10.1093/nsr/nwaa061.
- Liu, Xiaonan, Kari Salokas, Fitsum Tamene, Yaming Jiu, Rigbe G. Weldatsadik, Tiina Öhman, et Markku Varjosalo. 2018. « An AP-MS- and BioID-Compatible MAC-Tag Enables Comprehensive Mapping of Protein Interactions and Subcellular Localizations ». *Nature Communications* 9(1):1188. doi: 10.1038/s41467-018-03523-2.
- Liu, Yang, Margarita Ramos-Womack, Clair Han, Patrick Reilly, Kelly LaRue Brackett, William Rogers, Thomas M. Williams, Peter Andolfatto, David L. Stern, et Mark Rebeiz. 2019. « Changes throughout a Genetic Network Mask the Contribution of Hox Gene Evolution ». *Current Biology* 29(13):2157-2166.e6. doi: 10.1016/j.cub.2019.05.074.
- Liu, Ying, Kathleen S. Matthews, et Sarah E. Bondos. 2008. « Multiple Intrinsically Disordered Sequences Alter DNA Binding by the Homeodomain of the Drosophila Hox Protein Ultrabithorax ». *The Journal of Biological Chemistry* 283(30):20874-87. doi: 10.1074/jbc.M800375200.
- Liu, Zhen, Dong Xing, Qian Peter Su, Yun Zhu, Jiamei Zhang, Xinyu Kong, Boxin Xue, Sheng Wang, Hao Sun, Yile Tao, et Yujie Sun. 2014. « Super-Resolution Imaging and Tracking of Protein-Protein Interactions in Sub-Diffraction Cellular Space ». *Nature Communications* 5(1):4443. doi: 10.1038/ncomms5443.

- Llères, David, John James, Sam Swift, David G. Norman, et Angus I. Lamond. 2009. « Quantitative Analysis of Chromatin Compaction in Living Cells Using FLIM–FRET ». *Journal of Cell Biology* 187(4):481-96. doi: 10.1083/jcb.200907029.
- Löhr, U., M. Yussa, et L. Pick. 2001. « *Drosophila* Fushi Tarazu. a Gene on the Border of Homeotic Function ». *Current Biology: CB* 11(18):1403-12. doi: 10.1016/s0960-9822(01)00443-2.
- Lonfat, Nicolas, Thomas Montavon, Fabrice Darbellay, Sandra Gitto, et Denis Duboule. 2014. « Convergent Evolution of Complex Regulatory Landscapes and Pleiotropy at Hox Loci ». *Science (New York, N.Y.)* 346(6212):1004-6. doi: 10.1126/science.1257493.
- Longobardi, E., Miguel Torres, et Francesco Blasi. 2014. « Biochemistry of the tale transcription factors PREP, MEIS, and PBX in vertebrates ». *Developmental Dynamics* 243(1):59-75. doi: 10.1002/dvdy.24016.
- Lopez, A. J., et D. S. Hogness. 1991. « Immunochemical Dissection of the Ultrabithorax Homeoprotein Family in *Drosophila Melanogaster* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88(22):9924-28. doi: 10.1073/pnas.88.22.9924.
- Lubeckyj, Rachele A., Abdul Rehman Basharat, Xiaojing Shen, Xiaowen Liu, et Liangliang Sun. 2019. « Large-Scale Qualitative and Quantitative Top-Down Proteomics Using Capillary Zone Electrophoresis-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry with Nanograms of Proteome Samples ». *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 30(8):1435-45. doi: 10.1007/s13361-019-02167-w.
- van der Lugt, Nathalie M. T., Mark Alkema, Anton Berns, et Jacqueline Deschamps. 1996. « The Polycomb-Group Homolog Bmi-1 Is a Regulator of Murine Hox Gene Expression ». *Mechanisms of Development* 58(1):153-64. doi: 10.1016/S0925-4773(96)00570-9.
- Lunde, K., B. Biehs, U. Nauber, et E. Bier. 1998. « The Knirps and Knirps-Related Genes Organize Development of the Second Wing Vein in *Drosophila* ». *Development* 125(21):4145-54.
- Lunde, Karen, Jennifer L. Trimble, Annabel Guichard, Kirsten A. Guss, Ulrich Nauber, et Ethan Bier. 2003. « Activation of the Knirps Locus Links Patterning to Morphogenesis of the Second Wing Vein in *Drosophila* ». *Development* 130(2):235-48. doi: 10.1242/dev.00207.
- Luo, Ying, Anna Batalao, Helen Zhou, et Li Zhu. 1997. « Mammalian Two-Hybrid System: A Complementary Approach to the Yeast Two-Hybrid System ». *BioTechniques* 22(2):350-52. doi: 10.2144/97222pf02.
- Lutz, B., H. C. Lu, G. Eichele, D. Miller, et T. C. Kaufman. 1996. « Rescue of *Drosophila* Labial Null Mutant by the Chicken Ortholog Hoxb-1 Demonstrates That the Function of Hox Genes Is Phylogenetically Conserved ». *Genes & Development* 10(2):176-84. doi: 10.1101/gad.10.2.176.

- Maeda, Robert K., et François Karch. 2006. « The ABC of the BX-C: The Bithorax Complex Explained ». *Development* 133(8):1413-22. doi: 10.1242/dev.02323.
- Maeda, Robert K., et François Karch. 2010. « Cis-Regulation in the Drosophila Bithorax Complex ». P. 17-40 in *Hox Genes: Studies from the 20th to the 21st Century, Advances in Experimental Medicine and Biology*, édité par J. S. Deutsch. New York, NY: Springer.
- Maeda, Robert, et François Karch. 2009. « Chapter 1 The Bithorax Complex of Drosophila. An Exceptional Hox Cluster ». *Current topics in developmental biology* 88:1-33. doi: 10.1016/S0070-2153(09)88001-0.
- Mahaffey, J. W., C. M. Griswold, et Q. M. Cao. 2001. « The Drosophila genes disconnected and disco-related are redundant with respect to larval head development and accumulation of mRNAs from deformed target genes. » *Genetics* 157(1):225-36.
- Makhijani, Kalpana, Chilukuri Kalyani, Tamarisa Srividya, et L. S. Shashidhara. 2007. « Modulation of Decapentaplegic Gradient during Haltere Specification in Drosophila ». *Developmental Biology* 302(1):243-55. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.09.029.
- Mann, Richard S., et Markus Affolter. 1998. « Hox Proteins Meet More Partners ». *Current Opinion in Genetics & Development* 8(4):423-29. doi: 10.1016/S0959-437X(98)80113-5.
- Mann, Richard S., et Sean B. Carroll. 2002. « Molecular Mechanisms of Selector Gene Function and Evolution ». *Current Opinion in Genetics & Development* 12(5):592-600. doi: 10.1016/S0959-437X(02)00344-1.
- Mann, Richard S., et Siu-Kwong Chan. 1996. « Extra Specificity from Extradenticle: The Partnership between HOX and PBX/EXD Homeodomain Proteins ». *Trends in Genetics* 12(7):258-62. doi: 10.1016/0168-9525(96)10026-3.
- Mann, Richard S., Katherine M. Lelli, et Rohit Joshi. 2009. « Hox Specificity Unique Roles for Cofactors and Collaborators ». *Current Topics in Developmental Biology* 88:63-101. doi: 10.1016/S0070-2153(09)88003-4.
- Margueron, Raphael, Neil Justin, Katsuhito Ohno, Miriam L. Sharpe, Jinsook Son, William J. Drury, Philipp Voigt, Stephen R. Martin, William R. Taylor, Valeria De Marco, Vincenzo Pirrotta, Danny Reinberg, et Steven J. Gamblin. 2009. « Role of the Polycomb Protein EED in the Propagation of Repressive Histone Marks ». *Nature* 461(7265):762-67. doi: 10.1038/nature08398.
- Margueron, Raphaël, et Danny Reinberg. 2011. « The Polycomb Complex PRC2 and Its Mark in Life ». *Nature* 469(7330):343-49. doi: 10.1038/nature09784.
- Markmiller, Sebastian, Sahar Soltanieh, Kari L. Server, Raymond Mak, Wenhao Jin, Mark Y. Fang, En-Ching Luo, Florian Krach, Dejun Yang, Anindya Sen, Amit Fulzele, Jacob M. Wozniak, David J. Gonzalez, Mark W. Kankel, Fen-Biao Gao, Eric J. Bennett, Eric

- Lécuyer, et Gene W. Yeo. 2018. « Context-Dependent and Disease-Specific Diversity in Protein Interactions within Stress Granules ». *Cell* 172(3):590-604.e13. doi: 10.1016/j.cell.2017.12.032.
- Martell, Jeffrey D., Thomas J. Deerinck, Yasemin Sancak, Thomas L. Poulos, Vamsi K. Mootha, Gina E. Sosinsky, Mark H. Ellisman, et Alice Y. Ting. 2012. « Engineered Ascorbate Peroxidase as a Genetically Encoded Reporter for Electron Microscopy ». *Nature Biotechnology* 30(11):1143-48. doi: 10.1038/nbt.2375.
- Martín, Mercedes, Cristina M. Ostalé, et Jose F. de Celis. 2017. « Patterning of the Drosophila L2 Vein Is Driven by Regulatory Interactions between Region-Specific Transcription Factors Expressed in Response to Dpp Signalling ». *Development* 144(17):3168-76. doi: 10.1242/dev.143461.
- Martin, Presley F. 1982. « Direct Determination of the Growth Rate of Drosophila Imaginal Discs ». *Journal of Experimental Zoology* 222(1):97-102. doi: 10.1002/jez.1402220113.
- Matera, Ivana, Dawn E. Watkins-Chow, Stacie K. Loftus, Ling Hou, Arturo Incao, Debra L. Silver, Cecelia Rivas, Eugene C. Elliott, Laura L. Baxter, et William J. Pavan. 2008. « A Sensitized Mutagenesis Screen Identifies Gli3 as a Modifier of Sox10 Neurocristopathy ». *Human Molecular Genetics* 17(14):2118-31. doi: 10.1093/hmg/ddn110.
- Matharu, Navneet, Tanweer Hussain, Rajan Sankaranarayanan, et Rakesh Kumar Mishra. 2010. « Vertebrate homologue of Drosophila GAGA factor. » *Journal of molecular biology*. doi: 10.1016/j.jmb.2010.05.010.
- May, Danielle G., Kelsey L. Scott, Alexandre R. Campos, et Kyle J. Roux. 2020. « Comparative Application of BioID and TurboID for Protein-Proximity Biotinylation ». *Cells* 9(5). doi: 10.3390/cells9051070.
- Mayr, Hans G., Jeng-Hwa Yee, Marianne Mayr, et Robert Schnetzler. 2012. « Nature's Autonomous Oscillators ». 2012. doi: 10.4236/ns.2012.44034.
- Mazzoni, Valerio, Gianfranco Anfora, et Meta Virant-Doberlet. 2013. « Substrate Vibrations during Courtship in Three Drosophila species ». *PLoS ONE* 8(11). doi: 10.1371/journal.pone.0080708.
- McKenna, Duane D., et Brian D. Farrell. 2010. « 9-Genes Reinforce the Phylogeny of Holometabola and Yield Alternate Views on the Phylogenetic Placement of Strepsiptera ». *PloS One* 5(7):e11887. doi: 10.1371/journal.pone.0011887.
- McLAREN, A., et D. Michie. 1954. « Are Inbred Strains Suitable for Bio-Assay? » *Nature* 173(4406):686-87. doi: 10.1038/173686b0.
- Merabet, Samir, Hudry B, Saadaoui M, et Graba Y. 2009. « Classification of Sequence Signatures: A Guide to Hox Protein Function. » *Bioessays : News and Reviews in*

- Molecular, Cellular and Developmental Biology* 31(5):500-511. doi: 10.1002/bies.200800229.
- Merabet, Samir, et Amélie Dard. 2014. « Tracking Context-Specific Transcription Factors Regulating Hox Activity ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 243(1):16-23. doi: 10.1002/dvdy.24002.
- Merabet, Samir, et Brigitte Galliot. 2015. « The TALE face of Hox proteins in animal evolution ». *Frontiers in Genetics* 6. doi: 10.3389/fgene.2015.00267.
- Merabet, Samir, et Bruno Hudry. 2011. « On the Border of the Homeotic Function: Re-Evaluating the Controversial Role of Cofactor-Recruiting Motifs: The Role of Cofactor-Recruiting Motifs in Conferring Hox Evolutionary Flexibility May Critically Depend on the Protein Environment ». *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 33(7):499-507. doi: 10.1002/bies.201100019.
- Merabet, Samir, et Bruno Hudry. 2013. « Hox Transcriptional Specificity despite a Single Class of Cofactors: Are Flexible Interaction Modes the Key? ». *BioEssays* 35(2):88-92. doi: 10.1002/bies.201200146.
- Merabet, Samir, Zakaria Kambris, Maria Capovilla, Hélène Bérenger, Jacques Pradel, et Yacine Graba. 2003. « The Hexapeptide and Linker Regions of the AbdA Hox Protein Regulate Its Activating and Repressive Functions ». *Developmental Cell* 4(5):761-68. doi: 10.1016/S1534-5807(03)00126-6.
- Merabet, Samir, Isma Litim-Mecheri, Daniel Karlsson, Richa Dixit, Mehdi Saadaoui, Bruno Monier, Christine Brun, Stefan Thor, K. Vijayraghavan, Laurent Perrin, Jacques Pradel, et Yacine Graba. 2011. « Insights into Hox Protein Function from a Large Scale Combinatorial Analysis of Protein Domains ». *PLoS Genetics* 7(10):e1002302. doi: 10.1371/journal.pgen.1002302.
- Merabet, Samir, et Richard Mann. 2016. « To be specific or not: the critical relationship between Hox and TALE proteins ». *Trends in genetics : TIG* 32(6):334-47. doi: 10.1016/j.tig.2016.03.004.
- Merabet, Samir, Mehdi Saadaoui, Nagraj Sambrani, Bruno Hudry, Jacques Pradel, Markus Affolter, et Yacine Graba. 2007. « A Unique Extradenticle Recruitment Mode in the Drosophila Hox Protein Ultrabithorax ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(43):16946-51. doi: 10.1073/pnas.0705832104.
- Merabet, Samir, Nagraj Sambrani, Jacques Pradel, et Yacine Graba. 2010. « Regulation of Hox Activity: Insights from Protein Motifs ». P. 3-16 in *Hox Genes: Studies from the 20th to the 21st Century, Advances in Experimental Medicine and Biology*, édité par J. S. Deutsch. New York, NY: Springer.
- Micchelli, Craig A., et Seth S. Blair. 1999. « Dorsoventral Lineage Restriction in Wing Imaginal Discs Requires Notch ». *Nature* 401(6752):473-76. doi: 10.1038/46779.

- Micol, J. L., et A. García-Bellido. 1988. « Genetic Analysis of “Transvection” Effects Involving Contrabithorax Mutations in *Drosophila Melanogaster* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85(4):1146-50. doi: 10.1073/pnas.85.4.1146.
- Mihaly, J., I. Hogga, J. Gausz, H. Gyurkovics, et F. Karch. 1997. « In Situ Dissection of the Fab-7 Region of the Bithorax Complex into a Chromatin Domain Boundary and a Polycomb-Response Element ». *Development (Cambridge, England)* 124(9):1809-20.
- Miklos, George L. Gabor, et Gerald M. Rubin. 1996. « The Role of the Genome Project in Determining Gene Function: Insights from Model Organisms ». *Cell* 86(4):521-29. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80126-9.
- Mishra, Krishnaveni, Vivek S. Chopra, Arumugam Srinivasan, et Rakesh K. Mishra. 2003. « Trl-GAGA Directly Interacts with Lola like and Both Are Part of the Repressive Complex of Polycomb Group of Genes ». *Mechanisms of Development* 120(6):681-89. doi: 10.1016/S0925-4773(03)00046-7.
- Mishra, Rakesh K., Jozsef Mihaly, Stéphane Barges, Annick Spierer, François Karch, Kirsten Hagstrom, Susan E. Schweinsberg, et Paul Schedl. 2001. « The iab-7 Polycomb Response Element Maps to a Nucleosome-Free Region of Chromatin and Requires Both GAGA and Pleiohomeotic for Silencing Activity ». *Molecular and Cellular Biology* 21(4):1311-18. doi: 10.1128/MCB.21.4.1311-1318.2001.
- Mohit, Prasad, Kalpana Makhijani, M. B. Madhavi, V. Bharathi, Ashish Lal, Gururaj Sirdesai, V. Ram Reddy, Palaparthi Ramesh, Ramakrishnan Kannan, Jyotsna Dhawan, et L. S. Shashidhara. 2006. « Modulation of AP and DV Signaling Pathways by the Homeotic Gene Ultrabithorax during Haltere Development in *Drosophila* ». *Developmental Biology* 291(2):356-67. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.12.022.
- Mohler, J., M. Seecoomar, S. Agarwal, E. Bier, et J. Hsai. 2000. « Activation of Knot (Kn) Specifies the 3–4 Intervein Region in the *Drosophila* Wing ». *Development* 127(1):55-63.
- Morata, G. 2001. « How *Drosophila* Appendages Develop ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2(2):89-97. doi: 10.1038/35052047.
- Morata, G., et A. Garcia-Bellido. 1976. « Developmental Analysis of Some Mutants of the Bithorax System Of *Drosophila* ». *Wilhelm Roux’s Archives of Developmental Biology* 179(2):125-43. doi: 10.1007/BF00848298.
- Morell, Montse, Alba Espargaró, Francesc X. Avilés, et Salvador Ventura. 2007. « Detection of Transient Protein-Protein Interactions by Bimolecular Fluorescence Complementation: The Abl-SH3 Case ». *Proteomics* 7(7):1023-36. doi: 10.1002/pmic.200600966.
- Moreno, Eduardo, Konrad Basler, et Ginés Morata. 2002. « Cells Compete for Decapentaplegic Survival Factor to Prevent Apoptosis in *Drosophila* Wing Development ». *Nature* 416(6882):755-59. doi: 10.1038/416755a.

- Muijres, Florian T., Michael J. Elzinga, Johan M. Melis, et Michael H. Dickinson. 2014. « Flies Evade Looming Targets by Executing Rapid Visually Directed Banked Turns ». *Science* 344(6180):172-77. doi: 10.1126/science.1248955.
- Mukherjee, Krishanu, et Thomas R. Bürglin. 2007. « Comprehensive Analysis of Animal TALE Homeobox Genes: New Conserved Motifs and Cases of Accelerated Evolution ». *Journal of Molecular Evolution* 65(2):137-53. doi: 10.1007/s00239-006-0023-0.
- Müller, J., et M. Bienz. 1991. « Long range repression conferring boundaries of Ultrabithorax expression in the Drosophila embryo. » *The EMBO Journal* 10(11):3147-55.
- Mureli, Shwetha, et Jessica L. Fox. 2015. « Haltere Mechanosensory Influence on Tethered Flight Behavior in Drosophila ». *The Journal of Experimental Biology* 218(Pt 16):2528-37. doi: 10.1242/jeb.121863.
- Nagy, Peter, Ágnes Szabó, Tímea Váradi, Tamás Kovács, Gyula Batta, et János Szöllősi. 2014. « Maximum Likelihood Estimation of FRET Efficiency and Its Implications for Distortions in Pixelwise Calculation of FRET in Microscopy ». *Cytometry Part A* 85(11):942-52. doi: 10.1002/cyto.a.22518.
- Navas, Luis F. de, Daniel L. Garaulet, et Ernesto Sánchez-Herrero. 2006. « The Ultrabithorax Hox Gene of Drosophila Controls Haltere Size by Regulating the Dpp Pathway ». *Development* 133(22):4495-4506. doi: 10.1242/dev.02609.
- de Navas, Luis F., Daniel L. Garaulet, et Ernesto Sánchez-Herrero. 2006. « The ultrabithorax Hox gene of Drosophila controls haltere size by regulating the Dpp pathway. » *Development (Cambridge, England)* 133:4495-4506. doi: 10.1242/dev.02609.
- de Navas, Luis F., Hilary Reed, Michael Akam, Rosa Barrio, Claudio R. Alonso, et Ernesto Sánchez-Herrero. 2011. « Integration of RNA Processing and Expression Level Control Modulates the Function of the Drosophila Hox Gene Ultrabithorax during Adult Development ». *Development (Cambridge, England)* 138(1):107-16. doi: 10.1242/dev.051409.
- Nilsen, Steven P., Yick-Bun Chan, Robert Huber, et Edward A. Kravitz. 2004. « Gender-selective patterns of aggressive behavior in Drosophila melanogaster ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(33):12342-47. doi: 10.1073/pnas.0404693101.
- Noyes, Marcus B., Ryan G. Christensen, Atsuya Wakabayashi, Gary D. Stormo, Michael H. Brodsky, et Scot A. Wolfe. 2008. « Analysis of Homeodomain Specificities Allows the Family-Wide Prediction of Preferred Recognition Sites ». *Cell* 133(7):1277-89. doi: 10.1016/j.cell.2008.05.023.
- Ochoa-Espinosa, Amanda, Gozde Yucel, Leah Kaplan, Adam Pare, Noel Pura, Adam Oberstein, Dmitri Papatsenko, et Stephen Small. 2005. « The Role of Binding Site Cluster Strength in Bicoid-Dependent Patterning in Drosophila ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(14):4960-65. doi: 10.1073/pnas.0500373102.

- Ohde, Takahiro, Toshinobu Yaginuma, et Teruyuki Niimi. 2013. « Insect Morphological Diversification Through the Modification of Wing Serial Homologs ». *Science* 340(6131):495-98. doi: 10.1126/science.1234219.
- Ong, Chin-Tong, et Victor G. Corces. 2014. « CTCF: An Architectural Protein Bridging Genome Topology and Function ». *Nature reviews. Genetics* 15(4):234-46. doi: 10.1038/nrg3663.
- Ortiz-Lombardia, Miguel, Nicolas Foos, Corinne Maurel-Zaffran, Andrew J. Saurin, et Yacine Graba. 2017. « Hox Functional Diversity: Novel Insights from Flexible Motif Folding and Plastic Protein Interaction ». *BioEssays* 39(4):1600246. doi: 10.1002/bies.201600246.
- Papatsenko, Dmitri A., Vsevolod J. Makeev, Alex P. Lifanov, Mireille Régnier, Anna G. Nazina, et Claude Desplan. 2002. « Extraction of Functional Binding Sites from Unique Regulatory Regions: The Drosophila Early Developmental Enhancers ». *Genome Research* 12(3):470-81. doi: 10.1101/gr.212502.
- Passner, Jonathan M., Ryoo Hd, Shen L, Mann Rs, et Aggarwal Ak. 1999. « Structure of a DNA-Bound Ultrabithorax-Extradenticle Homeodomain Complex ». *Nature* 397(6721). Consulté 21 septembre 2020 (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10067897/>).
- Pastrana, Claudia C., Melissa B. DeBiasse, et Joseph F. Ryan. 2019. « Sponges Lack ParaHox Genes ». *Genome Biology and Evolution* 11(4):1250-57. doi: 10.1093/gbe/evz052.
- Patrício, Daniela, et Margarida Fardilha. 2020. « The Mammalian Two-Hybrid System as a Powerful Tool for High-Throughput Drug Screening ». *Drug Discovery Today* 25(4):764-71. doi: 10.1016/j.drudis.2020.01.022.
- Pavlopoulos, Anastasios, et Michael Akam. 2011. « Hox Gene Ultrabithorax Regulates Distinct Sets of Target Genes at Successive Stages of Drosophila Haltere Morphogenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(7):2855-60. doi: 10.1073/pnas.1015077108.
- Pearson, Joseph C., Derek Lemons, et William McGinnis. 2005. « Modulating Hox Gene Functions during Animal Body Patterning ». *Nature Reviews Genetics* 6(12):893-904. doi: 10.1038/nrg1726.
- Penkov, Dmitry, Daniel Mateos San Martín, Luis C. Fernandez-Díaz, Catalina A. Rosselló, Carlos Torroja, Fátima Sánchez-Cabo, H. J. Warnatz, Marc Sultan, Marie L. Yaspo, Arianna Gabrieli, Vsevolod Tkachuk, Andrea Brendolan, Francesco Blasi, et Miguel Torres. 2013. « Analysis of the DNA-Binding Profile and Function of TALE Homeoproteins Reveals Their Specialization and Specific Interactions with Hox Genes/Proteins ». *Cell Reports* 3(4):1321-33. doi: 10.1016/j.celrep.2013.03.029.
- Perkins, Lizabeth A., Laura Holderbaum, Rong Tao, Yanhui Hu, Richelle Sopko, Kim McCall, Donghui Yang-Zhou, Ian Flockhart, Richard Binari, Hye-Seok Shim, Audrey Miller, Amy Housden, Marianna Foos, Sakara Randkelv, Colleen Kelley, Pema Namgyal, Christians

- Villalta, Lu-Ping Liu, Xia Jiang, Qiao Huan-Huan, Xia Wang, Asao Fujiyama, Atsushi Toyoda, Kathleen Ayers, Allison Blum, Benjamin Czech, Ralph Neumuller, Dong Yan, Amanda Cavallaro, Karen Hibbard, Don Hall, Lynn Cooley, Gregory J. Hannon, Ruth Lehmann, Annette Parks, Stephanie E. Mohr, Ryu Ueda, Shu Kondo, Jian-Quan Ni, et Norbert Perrimon. 2015. « The Transgenic RNAi Project at Harvard Medical School: Resources and Validation ». *Genetics* 201(3):843-52. doi: 10.1534/genetics.115.180208.
- Perrimon, Norbert, et Anthony P. Mahowald. 1987. « Multiple Functions of Segment Polarity Genes in Drosophila ». *Developmental Biology* 119(2):587-600. doi: 10.1016/0012-1606(87)90061-3.
- Petruk, Svetlana, Yurii Sedkov, Kristen M. Riley, Jacob Hodgson, Francois Schweisguth, Susumu Hirose, James B. Jaynes, Hugh W. Brock, et Alexander Mazo. 2006. « Transcriptional elongation of non-coding bxd RNAs promoted by the Trithorax TAC1 complex represses Ubx by a transcriptional interference mechanism ». *Cell* 127(6):1209-21. doi: 10.1016/j.cell.2006.10.039.
- Philippidou, Polyxeni, et Jeremy S. Dasen. 2013. « Hox Genes: Choreographers in Neural Development, Architects of Circuit Organization ». *Neuron* 80(1):12-34. doi: 10.1016/j.neuron.2013.09.020.
- Phillips, Jennifer E., et Victor G. Corces. 2009. « CTCF: Master Weaver of the Genome ». *Cell* 137(7):1194-1211. doi: 10.1016/j.cell.2009.06.001.
- Picao-Osorio, Joao, Jamie Johnston, Matthias Landgraf, Jimena Berni, et Claudio R. Alonso. 2015. « MicroRNA-Encoded Behavior in Drosophila ». *Science* 350(6262):815-20. doi: 10.1126/science.aad0217.
- Piunti, Andrea, et Ali Shilatifard. 2016. « Epigenetic Balance of Gene Expression by Polycomb and COMPASS Families ». *Science (New York, N.Y.)* 352(6290):aad9780. doi: 10.1126/science.aad9780.
- Pix, W., G. Nalbach, et J. Zeil. 1993. « Strepsipteran Forewings Are Haltere-like Organs of Equilibrium ». *Naturwissenschaften* 80(8):371-74. doi: 10.1007/BF01138795.
- Plaza, Serge, Gerben Menschaert, et François Payre. 2017. « In Search of Lost Small Peptides ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 33:391-416. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100616-060516.
- Porcelli, Damiano, Bettina Fischer, Steven Russell, et Robert White. 2019. « Chromatin Accessibility Plays a Key Role in Selective Targeting of Hox Proteins ». *Genome Biology* 20(1):115. doi: 10.1186/s13059-019-1721-4.
- Poux, Sylvain, Béatrice Horard, Christian J. A. Sigrist, et Vincenzo Pirrotta. 2002. « The Drosophila Trithorax Protein Is a Coactivator Required to Prevent Re-Establishment of Polycomb Silencing ». *Development* 129(10):2483-93.

- Prasad, Mohit, Ruchi Bajpai, et L. S. Shashidhara. 2003. « Regulation of Wingless and Vestigial Expression in Wing and Haltere Discs of *Drosophila* ». *Development* 130(8):1537-47. doi: 10.1242/dev.00393.
- Prasad, Naveen, Shreeharsha Tarikere, Dhanashree Khanale, Farhat Habib, et L. S. Shashidhara. 2016. « A Comparative Genomic Analysis of Targets of Hox Protein Ultrabithorax amongst Distant Insect Species ». *Scientific Reports* 6(1):1-13. doi: 10.1038/srep27885.
- Prince, Frédéric, Tomonori Katsuyama, Yoshiteru Oshima, Serge Plaza, Diana Resendez-Perez, Meera Berry, Shoichiro Kurata, et Walter J. Gehring. 2008. « The YPWM Motif Links Antennapedia to the Basal Transcriptional Machinery ». *Development* 135(9):1669-79. doi: 10.1242/dev.018028.
- Procino, Alfredo, et Clemente Cillo. 2013. « The HOX Genes Network in Metabolic Diseases ». *Cell Biology International* 37(11):1145-48. doi: 10.1002/cbin.10145.
- Prokop, Jakub, Martina Pecharová, André Nel, Thomas Hörnschemeyer, Ewa Krzemińska, Wiesław Krzemiński, et Michael S. Engel. 2017. « Paleozoic Nymphal Wing Pads Support Dual Model of Insect Wing Origins ». *Current Biology: CB* 27(2):263-69. doi: 10.1016/j.cub.2016.11.021.
- Prud'homme, Benjamin, et Nicolas Gompel. 2019. « Evolution: Remodelling Animal Body Plans, Gene by Gene ». *Current Biology* 29(13):R623-25. doi: 10.1016/j.cub.2019.05.001.
- Prud'homme, Benjamin, Nicolas Gompel, Antonis Rokas, Victoria A. Kassner, Thomas M. Williams, Shu-Dan Yeh, John R. True, et Sean B. Carroll. 2006. « Repeated Morphological Evolution through Cis-Regulatory Changes in a Pleiotropic Gene ». *Nature* 440(7087):1050-53. doi: 10.1038/nature04597.
- Putnam, Nicholas H., Mansi Srivastava, Uffe Hellsten, Bill Dirks, Jarrod Chapman, Asaf Salamov, Astrid Terry, Harris Shapiro, Erika Lindquist, Vladimir V. Kapitonov, Jerzy Jurka, Grigory Genikhovich, Igor V. Grigoriev, Susan M. Lucas, Robert E. Steele, John R. Finnerty, Ulrich Technau, Mark Q. Martindale, et Daniel S. Rokhsar. 2007. « Sea Anemone Genome Reveals Ancestral Eumetazoan Gene Repertoire and Genomic Organization ». *Science (New York, N.Y.)* 317(5834):86-94. doi: 10.1126/science.1139158.
- Qi, Q., K. He, X. Liu, C. Pham, C. Meyerkord, H. Fu, et K. Ye. 2013. « Disrupting the PIKE-A/Akt interaction inhibits glioblastoma cell survival, migration, invasion and colony formation ». *Oncogene* 32(8). doi: 10.1038/onc.2012.109.
- Rajagopala, Seesandra V., et Peter Uetz. 2011. « Analysis of Protein-Protein Interactions Using High-Throughput Yeast Two-Hybrid Screens ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 781:1-29. doi: 10.1007/978-1-61779-276-2_1.
- Ramos, Andrea I., et Scott Barolo. 2013. « Low-affinity transcription factor binding sites shape morphogen responses and enhancer evolution ». *Philosophical Transactions of*

the Royal Society B: Biological Sciences 368(1632):20130018. doi: 10.1098/rstb.2013.0018.

- Ramos, Olivia Mendivil, Daniel Barker, et David E. K. Ferrier. 2012. « Ghost Loci Imply Hox and ParaHox Existence in the Last Common Ancestor of Animals ». *Current Biology* 22(20):1951-56. doi: 10.1016/j.cub.2012.08.023.
- Refki, Peter Nagui, David Armisé, Antonin Jean Johan Crumière, Séverine Viala, et Abderrahman Khila. 2014. « Emergence of tissue sensitivity to Hox protein levels underlies the evolution of an adaptive morphological trait ». *Developmental Biology* 392(2):441-53. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.05.021.
- Rezsohazy, René. 2014. « Non-Transcriptional Interactions of Hox Proteins: Inventory, Facts, and Future Directions ». *Developmental Dynamics* 243(1):117-31. doi: 10.1002/dvdy.24060.
- Rezsohazy, René, Andrew J. Saurin, Corinne Maurel-Zaffran, et Yacine Graba. 2015. « Cellular and Molecular Insights into Hox Protein Action ». *Development (Cambridge, England)* 142(7):1212-27. doi: 10.1242/dev.109785.
- Rhee, Hyun-Woo, Peng Zou, Namrata D. Udeshi, Jeffrey D. Martell, Vamsi K. Mootha, Steven A. Carr, et Alice Y. Ting. 2013. « Proteomic Mapping of Mitochondria in Living Cells via Spatially Restricted Enzymatic Tagging ». *Science* 339(6125):1328-31. doi: 10.1126/science.1230593.
- Rieckhof, Gabrielle E., Fernando Casares, Hyung Don Ryoo, Muna Abu-Shaar, et Richard S. Mann. 1997. « Nuclear Translocation of Extradenticle Requires Homothorax, Which Encodes an Extradenticle-Related Homeodomain Protein ». *Cell* 91(2):171-83. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80400-6.
- Riegel, Elisabeth, Thomas Heimbucher, Thomas Höfer, et Thomas Czerny. 2017. « A sensitive, semi-quantitative mammalian two-hybrid assay ». *BioTechniques* 62(5):206-14. doi: 10.2144/000114544.
- Rinaldi, Lucrezia, Andrew J. Saurin, et Yacine Graba. 2018. « Fattening the Perspective of Hox Protein Specificity through SLiMming ». *International Journal of Developmental Biology* 62(11-12):755-66. doi: 10.1387/ijdb.180306yg.
- Ringrose, Leonie, et Renato Paro. 2004. « Epigenetic Regulation of Cellular Memory by the Polycomb and Trithorax Group Proteins ». *Annual Review of Genetics* 38:413-43. doi: 10.1146/annurev.genet.38.072902.091907.
- Ringrose, Leonie, et Renato Paro. 2007. « Polycomb/Trithorax Response Elements and Epigenetic Memory of Cell Identity ». *Development* 134(2):223-32. doi: 10.1242/dev.02723.
- Rinn, John L., Michael Kertesz, Jordon K. Wang, Sharon L. Squazzo, Xiao Xu, Samantha A. Brugmann, Henry Goodnough, Jill A. Helms, Peggy J. Farnham, Eran Segal, et Howard Y. Chang. 2007. « Functional Demarcation of Active and Silent Chromatin Domains in

- Human HOX Loci by Non-Coding RNAs ». *Cell* 129(7):1311-23. doi: 10.1016/j.cell.2007.05.022.
- Robertson, Lisa K., Dana B. Bowling, James P. Mahaffey, Barbara Imiolczyk, et James W. Mahaffey. 2004. « An Interactive Network of Zinc-Finger Proteins Contributes to Regionalization of the Drosophila Embryo and Establishes the Domains of HOM-C Protein Function ». *Development* 131(12):2781-89. doi: 10.1242/dev.01159.
- Roch, F., et M. Akam. 2000. « Ultrabithorax and the Control of Cell Morphology in Drosophila Halteres ». *Development (Cambridge, England)* 127(1):97-107.
- Rodríguez-Carballo, Eddie, Lucille Lopez-Delisle, Ye Zhan, Pierre J. Fabre, Leonardo Beccari, Imane El-Idrissi, Thi Hanh Nguyen Huynh, Hakan Ozadam, Job Dekker, et Denis Duboule. 2017. « The HoxD Cluster Is a Dynamic and Resilient TAD Boundary Controlling the Segregation of Antagonistic Regulatory Landscapes ». *Genes & Development* 31(22):2264-81. doi: 10.1101/gad.307769.117.
- Rohs, Remo, Sean M. West, Alona Sosinsky, Peng Liu, Richard S. Mann, et Barry Honig. 2009. « The Role of DNA Shape in Protein–DNA Recognition ». *Nature* 461(7268):1248-53. doi: 10.1038/nature08473.
- Ronshaugen, Matthew, Nadine McGinnis, et William McGinnis. 2002. « Hox Protein Mutation and Macroevolution of the Insect Body Plan ». *Nature* 415(6874):914-17. doi: 10.1038/nature716.
- Roux, Kyle J., Dae In Kim, Manfred Raida, et Brian Burke. 2012. « A Promiscuous Biotin Ligase Fusion Protein Identifies Proximal and Interacting Proteins in Mammalian Cells ». *Journal of Cell Biology* 196(6):801-10. doi: 10.1083/jcb.201112098.
- Rudin, Charles M., Christine L. Hann, Edward B. Garon, Moacyr Ribeiro de Oliveira, Philip D. Bonomi, D. Ross Camidge, Quincy Chu, Giuseppe Giaccone, Divis Khaira, Suresh S. Ramalingam, Malcolm R. Ranson, Caroline Dive, Evelyn M. McKeegan, Brenda J. Chyla, Barry L. Dowell, Arunava Chakravartty, Cathy E. Nolan, Niki Rudersdorf, Todd A. Busman, Mack H. Mabry, Andrew P. Krivoschik, Rod A. Humerickhouse, Geoffrey I. Shapiro, et Leena Gandhi. 2012. « Phase II Study of Single-Agent Navitoclax (ABT-263) and Biomarker Correlates in Patients with Relapsed Small Cell Lung Cancer ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 18(11):3163-69. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3090.
- Ruiz-Losada, Mireya, David Blom-Dahl, Sergio Córdoba, et Carlos Estella. 2018. « Specification and Patterning of Drosophila Appendages ». *Journal of Developmental Biology* 6(3). doi: 10.3390/jdb6030017.
- Rux, Danielle R., Jane Y. Song, Ilea T. Swinehart, Kyriel M. Pineault, Aleesa J. Schlientz, Kelsey G. Trulik, Steve A. Goldstein, Ken M. Kozloff, Daniel Lucas, et Deneen M. Wellik. 2016. « Regionally Restricted Hox Function in Adult Bone Marrow Multipotent Mesenchymal Stem/Stromal Cells ». *Developmental Cell* 39(6):653-66. doi: 10.1016/j.devcel.2016.11.008.

- Ryoo, Hyung Don, et Richard S. Mann. 1999. « The control of trunk Hox specificity and activity by Extradenticle ». *Genes & Development* 13(13):1704-16.
- Saadaoui, Mehdi, Samir Merabet, Isma Litim-Mecheri, Elise Arbeille, Nagraj Sambrani, Wim Damen, Carlo Brena, Jacques Pradel, et Yacine Graba. 2011. « Selection of Distinct Hox-Extradenticle Interaction Modes Fine-Tunes Hox Protein Activity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(6):2276-81. doi: 10.1073/pnas.1006964108.
- Saenko, Suzanne V., Marta SP Marialva, et Patrícia Beldade. 2011. « Involvement of the conserved Hox gene *Antennapedia* in the development and evolution of a novel trait ». *EvoDevo* 2(1):9. doi: 10.1186/2041-9139-2-9.
- Saldi, Tassa, Michael A. Cortazar, Ryan M. Sheridan, et David L. Bentley. 2016. « Coupling of RNA Polymerase II Transcription Elongation with Pre-mRNA Splicing ». *Journal of Molecular Biology* 428(12):2623-35. doi: 10.1016/j.jmb.2016.04.017.
- Samandi, Sondos, Annie V. Roy, Vivian Delcourt, Jean-François Lucier, Jules Gagnon, Maxime C. Beaudoin, Benoît Vanderperre, Marc-André Breton, Julie Motard, Jean-François Jacques, Mylène Brunelle, Isabelle Gagnon-Arsenault, Isabelle Fournier, Aida Ouangraoua, Darel J. Hunting, Alan A. Cohen, Christian R. Landry, Michelle S. Scott, et Xavier Roucou. 2017. « Deep transcriptome annotation enables the discovery and functional characterization of cryptic small proteins » édité par N. Ben-Tal. *eLife* 6:e27860. doi: 10.7554/eLife.27860.
- Sambrani, Nagraj, Bruno Hudry, Corinne Maurel-Zaffran, Amel Zouaz, Rakesh Mishra, Samir Merabet, et Yacine Graba. 2013. « Distinct Molecular Strategies for Hox-Mediated Limb Suppression in *Drosophila*: From Cooperativity to Dispensability/Antagonism in TALE Partnership ». *PLoS Genetics* 9(3). doi: 10.1371/journal.pgen.1003307.
- Sánchez-Herrero, E., I. Vernós, R. Marco, et G. Morata. 1985. « Genetic Organization of *Drosophila* Bithorax Complex ». *Nature* 313(5998):108-13. doi: 10.1038/313108a0.
- Sánchez-Higueras, Carlos, Chaitanya Rastogi, Roumen Voutev, Harmen J. Bussemaker, Richard S. Mann, et James C. G. Hombría. 2019. « In Vivo Hox Binding Specificity Revealed by Systematic Changes to a Single Cis Regulatory Module ». *Nature Communications* 10(1):1-13. doi: 10.1038/s41467-019-11416-1.
- Sánchez-Higueras, Carlos, Sol Sotillos, et James Castelli-Gair Hombría. 2014. « Common Origin of Insect Trachea and Endocrine Organs from a Segmentally Repeated Precursor ». *Current Biology* 24(1):76-81. doi: 10.1016/j.cub.2013.11.010.
- Saraon, Punit, Ingrid Grozavu, Sang Hyun Lim, Jamie Snider, Zhong Yao, et Igor Stagljar. 2017. « Detecting Membrane Protein-Protein Interactions Using the Mammalian Membrane Two-Hybrid (MaMTH) Assay ». *Current Protocols in Chemical Biology* 9(1):38-54. doi: 10.1002/cpch.15.

- Saurin, Andrew J., Marie Claire Delfini, Corinne Maurel-Zaffran, et Yacine Graba. 2018. « The Generic Facet of Hox Protein Function ». *Trends in Genetics: TIG* 34(12):941-53. doi: 10.1016/j.tig.2018.08.006.
- Scherer, C. W. 1995. « Chapter 9: Fastest Wing Beat | The University of Florida Book of Insect Records | Department of Entomology & Nematology | UF/IFAS ». Consulté (http://entnemdept.ufl.edu/walker/ufbir/chapters/chapter_09.shtml).
- Schertel, Claus, Monica Albarca, Claudia Rockel-Bauer, Nicholas W. Kelley, Johannes Bischof, Korneel Hens, Erik van Nimwegen, Konrad Basler, et Bart Deplancke. 2015. « A Large-Scale, in Vivo Transcription Factor Screen Defines Bivalent Chromatin as a Key Property of Regulatory Factors Mediating Drosophila Wing Development ». *Genome Research* 25(4):514-23. doi: 10.1101/gr.181305.114.
- Scheuermann, Johanna C., Andrés Gaytán de Ayala Alonso, Katarzyna Oktaba, Nga Ly-Hartig, Robert K. McGinty, Sven Fraterman, Matthias Wilm, Tom W. Muir, et Jürg Müller. 2010. « Histone H2A Deubiquitinase Activity of the Polycomb Repressive Complex PR-DUB ». *Nature* 465(7295):243-47. doi: 10.1038/nature08966.
- Schneuwly, S., R. Klemenz, et W. J. Gehring. 1987. « Redesigning the Body Plan of Drosophila by Ectopic Expression of the Homoeotic Gene Antennapedia ». *Nature* 325(6107):816-18. doi: 10.1038/325816a0.
- Schopp, Isabel Myriam, Cinthia Claudia Amaya Ramirez, Jerneja Debeljak, Elisa Kreibich, Merle Skribbe, Klemens Wild, et Julien Béthune. 2017. « Split-BioID a Conditional Proteomics Approach to Monitor the Composition of Spatiotemporally Defined Protein Complexes ». *Nature Communications* 8(1):15690. doi: 10.1038/ncomms15690.
- Schorderet, Patrick, et Denis Duboule. 2011. « Structural and Functional Differences in the Long Non-Coding RNA Hotair in Mouse and Human ». *PLoS Genetics* 7(5). doi: 10.1371/journal.pgen.1002071.
- Schuettengruber, Bernd, Henri-Marc Bourbon, Luciano Di Croce, et Giacomo Cavalli. 2017. « Genome Regulation by Polycomb and Trithorax: 70 Years and Counting ». *Cell* 171(1):34-57. doi: 10.1016/j.cell.2017.08.002.
- Schuettengruber, Bernd, Mythily Ganapathi, Benjamin Leblanc, Manuela Portoso, Rami Jaschek, Bas Tolhuis, Maarten van Lohuizen, Amos Tanay, et Giacomo Cavalli. 2009. « Functional Anatomy of Polycomb and Trithorax Chromatin Landscapes in Drosophila Embryos ». *PLoS Biology* 7(1). doi: 10.1371/journal.pbio.1000013.
- Schwartz, Yuri B., Tatyana G. Kahn, David A. Nix, Xiao-Yong Li, Richard Bourgon, Mark Biggin, et Vincenzo Pirrotta. 2006. « Genome-Wide Analysis of Polycomb Targets in Drosophila Melanogaster ». *Nature Genetics* 38(6):700-705. doi: 10.1038/ng1817.
- Schwartz, Yuri B., Tatyana G. Kahn, Per Stenberg, Katsuhito Ohno, Richard Bourgon, et Vincenzo Pirrotta. 2010. « Alternative Epigenetic Chromatin States of Polycomb Target Genes ». *PLoS Genetics* 6(1):e1000805. doi: 10.1371/journal.pgen.1000805.

- Schwarz, Daniel, Sandra Varum, Martina Zemke, Anne Schöler, Arianna Baggiolini, Kalina Draganova, Haruhiko Koseki, Dirk Schübeler, et Lukas Sommer. 2014. « Ezh2 Is Required for Neural Crest-Derived Cartilage and Bone Formation ». *Development* 141(4):867-77. doi: 10.1242/dev.094342.
- Sekar, Rajesh Babu, et Ammasi Periasamy. 2003. « Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Microscopy Imaging of Live Cell Protein Localizations ». *The Journal of Cell Biology* 160(5):629-33. doi: 10.1083/jcb.200210140.
- Selleri, Licia, Marisa S. Bartolomei, Wendy A. Bickmore, Lin He, Lisa Stubbs, Wolf Reik, et Gregory S. Barsh. 2016. « A Hox-Embedded Long Noncoding RNA: Is It All Hot Air? ». *PLoS Genetics* 12(12). doi: 10.1371/journal.pgen.1006485.
- Seo, Hee-Chan, Rolf Brudvik Edvardsen, Anne Dorthea Maeland, Marianne Bjordal, Marit Flo Jensen, Anette Hansen, Mette Flaot, Jean Weissenbach, Hans Lehrach, Patrick Wincker, Richard Reinhardt, et Daniel Chourrout. 2004. « Hox Cluster Disintegration with Persistent Anteroposterior Order of Expression in *Oikopleura dioica* ». *Nature* 431(7004):67-71. doi: 10.1038/nature02709.
- Serano, Julia M., Arnaud Martin, Danielle M. Liubicich, Erin Jarvis, Heather S. Bruce, Konnor La, William E. Browne, Jane Grimwood, et Nipam H. Patel. 2016. « Comprehensive Analysis of Hox Gene Expression in the Amphipod Crustacean *Parhyale hawaiiensis* ». *Developmental Biology* 409(1):297-309. doi: 10.1016/j.ydbio.2015.10.029.
- Shashidhara, L. S., Namita Agrawal, Ruchi Bajpai, V. Bharathi, et Pradip Sinha. 1999. « Negative Regulation of Dorsoventral Signaling by the Homeotic Gene *Ultrabithorax* during Haltere Development in *Drosophila* ». *Developmental Biology* 212(2):491-502. doi: 10.1006/dbio.1999.9341.
- Shen, Jie, Christian Dorner, Angela Bahlo, et Gert O. Pflugfelder. 2008. « Optomotor-Blind Suppresses Instability at the A/P Compartment Boundary of the *Drosophila* Wing ». *Mechanisms of Development* 125(3):233-46. doi: 10.1016/j.mod.2007.11.006.
- Shen, Jing, Wenlu Zhang, Chunyang Gan, Xiafei Wei, Jie Li, Yuxue Sun, Yi Yuan, Xuefei Cai, Quanxin Long, Jing Cui, Haitao Guo, Ailong Huang, et Jieli Hu. 2020. « Strategies to Improve the Fluorescent Signal of the Tripartite SfGFP System ». *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*. doi: 10.1093/abbs/gmaa073.
- Shen, W. F., J. C. Montgomery, S. Rozenfeld, J. J. Moskow, H. J. Lawrence, A. M. Buchberg, et C. Largman. 1997. « AbdB-like Hox proteins stabilize DNA binding by the Meis1 homeodomain proteins. ». *Molecular and Cellular Biology* 17(11):6448-58.
- Shestakova, E. A., M. Boutin, S. Bourassa, E. Bonneil, et J. J. Bijl. 2017. « Identification of Proteins Associated with Transcription Factors HOXA9 and E2A-PBX1 by Tandem Affinity Purification ». *Molecular Biology* 51(3):432-44. doi: 10.1134/S002689331703013X.

- Shilatifard, Ali. 2012. « The COMPASS Family of Histone H3K4 Methylases: Mechanisms of Regulation in Development and Disease Pathogenesis ». *Annual review of biochemistry* 81:65-95. doi: 10.1146/annurev-biochem-051710-134100.
- Shyu, Y. John, et Chang-Deng Hu. 2008. « Fluorescence Complementation: An Emerging Tool for Biological Research ». *Trends in Biotechnology* 26(11):622-30. doi: 10.1016/j.tibtech.2008.07.006.
- Simon, J., A. Chiang, et W. Bender. 1992. « Ten Different Polycomb Group Genes Are Required for Spatial Control of the AbdA and AbdB Homeotic Products. » *Development* 114(2):493-505.
- Simon, J., M. Peifer, W. Bender, et M. O'Connor. 1990. « Regulatory elements of the bithorax complex that control expression along the anterior-posterior axis. » *The EMBO Journal* 9(12):3945-56.
- Simon, Jeffrey A., et Robert E. Kingston. 2013. « Occupying chromatin: Polycomb mechanisms for getting to genomic targets, stopping transcriptional traffic, and staying put ». *Molecular cell* 49(5):808-24. doi: 10.1016/j.molcel.2013.02.013.
- Sing, Angela, Dylan Pannell, Angelo Karaiskakis, Kendra Sturgeon, Malek Djabali, James Ellis, Howard D. Lipshitz, et Sabine P. Cordes. 2009. « A Vertebrate Polycomb Response Element Governs Segmentation of the Posterior Hindbrain ». *Cell* 138(5):885-97. doi: 10.1016/j.cell.2009.08.020.
- Singh, Savita, Ernesto Sánchez-Herrero, et L. S. Shashidhara. 2015. « Critical Role for Fat/Hippo and IIS/Akt Pathways Downstream of Ultrabithorax during Haltere Specification in Drosophila ». *Mechanisms of Development* 138 Pt 2:198-209. doi: 10.1016/j.mod.2015.07.017.
- Slattery, Matthew, Lijia Ma, Nicolas Nègre, Kevin P. White, et Richard S. Mann. 2011. « Genome-Wide Tissue-Specific Occupancy of the Hox Protein Ultrabithorax and Hox Cofactor Homothorax in Drosophila ». *PLOS ONE* 6(4):e14686. doi: 10.1371/journal.pone.0014686.
- Slattery, Matthew, Todd Riley, Peng Liu, Namiko Abe, Pilar Gomez-Alcala, Iris Dror, Tianyin Zhou, Remo Rohs, Barry Honig, Harmen J. Bussemaker, et Richard S. Mann. 2011. « Cofactor Binding Evokes Latent Differences in DNA Binding Specificity between Hox Proteins ». *Cell* 147(6):1270-82. doi: 10.1016/j.cell.2011.10.053.
- Smolik-Utlaut, S. M. 1990. « Dosage Requirements of Ultrabithorax and Bithoraxoid in the Determination of Segment Identity in Drosophila Melanogaster ». *Genetics* 124(2):357-66.
- Söderberg, Ola, Mats Gullberg, Malin Jarvius, Karin Ridderstråle, Karl-Johan Leuchowius, Jonas Jarvius, Kenneth Wester, Per Hydbring, Fuad Bahram, Lars-Gunnar Larsson, et Ulf Landegren. 2006. « Direct Observation of Individual Endogenous Protein Complexes in Situ by Proximity Ligation ». *Nature Methods* 3(12):995-1000. doi: 10.1038/nmeth947.

- Srivastava, Mansi, Oleg Simakov, Jarrod Chapman, Bryony Fahey, Marie Gauthier, Therese Mitros, Gemma S. Richards, Cecilia Conaco, Michael Dacre, Uffe Hellsten, Claire Larroux, Nicholas Putnam, Mario Stanke, et Maja Adamska. 2010. « The Amphimedon Queenslandica Genome and the Evolution of Animal Complexity ». *Nature*. doi: 10.1038/nature09201.
- Steiner, Emil. 1976. « Establishment of Compartments in the Developing Leg Imaginal Discs Of *Drosophila Melanogaster* ». *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology* 180(1):9-30. doi: 10.1007/BF00848882.
- Stevens, Katherine E., et Richard S. Mann. 2007. « A Balance Between Two Nuclear Localization Sequences and a Nuclear Export Sequence Governs Extradenticle Subcellular Localization ». *Genetics* 175(4):1625-36. doi: 10.1534/genetics.106.066449.
- Storz, Gisela, Yuri I. Wolf, et Kumaran S. Ramamurthi. 2014. « Small Proteins Can No Longer Be Ignored ». *Annual review of biochemistry* 83:753-77. doi: 10.1146/annurev-biochem-070611-102400.
- Struhl, G. 1982. « Genes Controlling Segmental Specification in the *Drosophila* Thorax ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79(23):7380-84. doi: 10.1073/pnas.79.23.7380.
- Struhl, G., K. Struhl, et P. M. Macdonald. 1989. « The Gradient Morphogen Bicoid Is a Concentration-Dependent Transcriptional Activator ». *Cell* 57(7):1259-73. doi: 10.1016/0092-8674(89)90062-7.
- Sturtevant, A. H. 1915. « Experiments on sex recognition and the problem of sexual selection in *Drosophila* ». *Journal of Animal Behavior* 5(5):351-66. doi: 10.1037/h0074109.
- Sturtevant, M. A., B. Biehs, E. Marin, et E. Bier. 1997. « The Spalt Gene Links the A/P Compartment Boundary to a Linear Adult Structure in the *Drosophila* Wing ». *Development* 124(1):21-32.
- Sturtevant, M. A., M. Roark, et E. Bier. 1993. « The *Drosophila* Rhomboid Gene Mediates the Localized Formation of Wing Veins and Interacts Genetically with Components of the EGF-R Signaling Pathway ». *Genes & Development* 7(6):961-73. doi: 10.1101/gad.7.6.961.
- Subramanian, Chitra, Yao Xu, Carl Hirschie Johnson, et Albrecht G. von Arnim. 2004. « In Vivo Detection of Protein-Protein Interaction in Plant Cells Using BRET ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 284:271-86. doi: 10.1385/1-59259-816-1:271.
- Szuperák, Milán, Sally Salah, Emily J. Meyer, Usha Nagarajan, Aissam Ikmi, et Matthew C. Gibson. 2011. « Feedback Regulation of *Drosophila* BMP Signaling by the Novel Extracellular Protein Larval Translucida ». *Development* 138(4):715-24. doi: 10.1242/dev.059477.

- Taghli-Lamallem, Ouarda. 2007. « Direct Interaction between Teashirt and Sex Combs Reduced Proteins, via Tsh's Acidic Domain, Is Essential for Specifying the Identity of the Prothorax in *Drosophila* | Request PDF ». *ResearchGate*. Consulté 21 septembre 2020
(https://www.researchgate.net/publication/6309252_Direct_interaction_between_Teashirt_and_Sex_combs_reduced_proteins_via_Tsh's_acidic_domain_is_essential_for_specifying_the_identity_of_the_prothorax_in_Drosophila).
- Taminiau, Arnaud, Amandine Draime, Janne Tys, Barbara Lambert, Julie Vandeputte, Nathan Nguyen, Patricia Renard, Dirk Geerts, et René Rezsöhazy. 2016. « HOXA1 Binds RBCK1/HOIL-1 and TRAF2 and Modulates the TNF/NF-KB Pathway in a Transcription-Independent Manner ». *Nucleic Acids Research* 44(15):7331. doi: 10.1093/nar/gkw606.
- Tamkun, J. W., R. Deuring, M. P. Scott, M. Kissinger, A. M. Pattatucci, T. C. Kaufman, et J. A. Kennison. 1992. « Brahma: A Regulator of *Drosophila* Homeotic Genes Structurally Related to the Yeast Transcriptional Activator SNF2/SWI2 ». *Cell* 68(3):561-72. doi: 10.1016/0092-8674(92)90191-e.
- Thomas-Chollier, Morgane, Valérie Ledent, Luc Leyns, et Michel Vervoort. 2010. « A non-tree-based comprehensive study of metazoan Hox and ParaHox genes prompts new insights into their origin and evolution ». *BMC Evolutionary Biology* 10(1):73. doi: 10.1186/1471-2148-10-73.
- Thomsen, Stefan, Ghows Azzam, Richard Kaschula, Lucy S. Williams, et Claudio R. Alonso. 2010. « Developmental RNA Processing of 3'UTRs in Hox MRNAs as a Context-Dependent Mechanism Modulating Visibility to MicroRNAs ». *Development* 137(17):2951-60. doi: 10.1242/dev.047324.
- Tie, Feng, Rakhee Banerjee, Alina R. Saiakhova, Benny Howard, Kelsey E. Monteith, Peter C. Scacheri, Michael S. Cosgrove, et Peter J. Harte. 2014. « Trithorax monomethylates histone H3K4 and interacts directly with CBP to promote H3K27 acetylation and antagonize Polycomb silencing ». *Development (Cambridge, England)* 141(5):1129-39. doi: 10.1242/dev.102392.
- Tomoyasu, Yoshinori. 2017. « Ultrabithorax and the Evolution of Insect Forewing/Hindwing Differentiation ». *Current Opinion in Insect Science* 19:8-15. doi: 10.1016/j.cois.2016.10.007.
- Tomoyasu, Yoshinori, Takahiro Ohde, et Courtney Clark-Hachtel. 2017. « What serial homologs can tell us about the origin of insect wings ». *F1000Research* 6. doi: 10.12688/f1000research.10285.1.
- Tomoyasu, Yoshinori, Scott R. Wheeler, et Robin E. Denell. 2005a. « Ultrabithorax Is Required for Membranous Wing Identity in the Beetle *Tribolium Castaneum* ». *Nature* 433(7026):643-47. doi: 10.1038/nature03272.

- Tomoyasu, Yoshinori, Scott R. Wheeler, et Robin E. Denell. 2005b. « Ultrabithorax is required for membranous wing identity in the beetle *Tribolium castaneum* ». *Nature* 433(7026):643-47. doi: 10.1038/nature03272.
- Topisirovic, Ivan, Alex Kentsis, Jacqueline M. Perez, Monica L. Guzman, Craig T. Jordan, et Katherine L. B. Borden. 2005. « Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Activity Is Modulated by HOXA9 at Multiple Levels ». *Molecular and Cellular Biology* 25(3):1100-1112. doi: 10.1128/MCB.25.3.1100-1112.2005.
- Tracy, Kirsten, et Eric H. Baehrecke. 2013. « The Role of Autophagy in *Drosophila* Metamorphosis ». *Current topics in developmental biology* 103:101-25. doi: 10.1016/B978-0-12-385979-2.00004-6.
- Tsai, Albert, Mariana RP Alves, et Justin Crocker. 2019. « Multi-enhancer transcriptional hubs confer phenotypic robustness » édité par D. N. Arnosti, J. K. Tyler, A. H. DePace, et H. Garcia. *eLife* 8:e45325. doi: 10.7554/eLife.45325.
- Tsai, Albert, Anand K. Muthusamy, Mariana RP Alves, Luke D. Lavis, Robert H. Singer, David L. Stern, et Justin Crocker. 2017. « Nuclear microenvironments modulate transcription from low-affinity enhancers » édité par D. N. Arnosti. *eLife* 6:e28975. doi: 10.7554/eLife.28975.
- Tsubota, Takuya, Kaoru Saigo, et Tetsuya Kojima. 2008. « Hox Genes Regulate the Same Character by Different Strategies in Each Segment ». *Mechanisms of Development* 125(9):894-905. doi: 10.1016/j.mod.2008.06.001.
- Tsukiyama, T., P. Becker, et C. Wu. 1994. « ATP-dependent nucleosome disruption at a heat-shock promoter mediated by binding of GAGA transcription factor ». *Nature*. doi: 10.1038/367525a0.
- Urh, Marjeta, Dan Simpson, et Kate Zhao. 2009. « Affinity Chromatography: General Methods ». *Methods in Enzymology* 463:417-38. doi: 10.1016/S0076-6879(09)63026-3.
- Vachon, G., B. Cohen, C. Pfeifle, M. E. McGuffin, J. Botas, et S. M. Cohen. 1992. « Homeotic Genes of the Bithorax Complex Repress Limb Development in the Abdomen of the *Drosophila* Embryo through the Target Gene *Distal-Less* ». *Cell* 71(3):437-50. doi: 10.1016/0092-8674(92)90513-c.
- Van der Meulen, Joni, Frank Speleman, et Pieter Van Vlierberghe. 2014. « The H3K27me3 demethylase UTX in normal development and disease ». *Epigenetics* 9(5):658-68. doi: 10.4161/epi.28298.
- Van Lijsebettens, Mieke, et Klaus D. Grasser. 2010. « The role of the transcript elongation factors FACT and HUB1 in leaf growth and the induction of flowering ». *Plant Signaling & Behavior* 5(6):715-17.

- Van Roey, K., Dinkel H, Weatheritt Rj, Gibson Tj, et Davey Ne. 2013. « The Switches.ELM Resource: A Compendium of Conditional Regulatory Interaction Interfaces. » *Science Signaling* 6(269):rs7-rs7. doi: 10.1126/scisignal.2003345.
- Vazquez, Julio, Martin Müller, Vincenzo Pirrotta, et John W. Sedat. 2006. « The Mcp Element Mediates Stable Long-Range Chromosome–Chromosome Interactions in *Drosophila* ». *Molecular Biology of the Cell* 17(5):2158-65. doi: 10.1091/mbc.e06-01-0049.
- Veraksa, Alexey, James Kennison, et William McGinnis. 2002. « DEAF-1 Function Is Essential for the Early Embryonic Development of *Drosophila* ». *Genesis (New York, N.Y.: 2000)* 33(2):67-76. doi: 10.1002/gene.10090.
- Vermeulen, Michiel, Klaas W. Mulder, Sergei Denissov, W. W. M. Pim Pijnappel, Frederik M. A. van Schaik, Radhika A. Varier, Marijke P. A. Baltissen, Henk G. Stunnenberg, Matthias Mann, et H. Th Marc Timmers. 2007. « Selective Anchoring of TFIID to Nucleosomes by Trimethylation of Histone H3 Lysine 4 ». *Cell* 131(1):58-69. doi: 10.1016/j.cell.2007.08.016.
- Vinagre, Tânia, Natalia Moncaut, Marta Carapuço, Ana Nóvoa, Joana Bom, et Moisés Mallo. 2010. « Evidence for a Myotomal Hox/Myf Cascade Governing Nonautonomous Control of Rib Specification within Global Vertebral Domains ». *Developmental Cell* 18(4):655-61. doi: 10.1016/j.devcel.2010.02.011.
- Vojtek, Anne B., Stanley M. Hollenberg, et Jonathan A. Cooper. 1993. « Mammalian Ras Interacts Directly with the Serine/Threonine Kinase Raf ». *Cell* 74(1):205-14. doi: 10.1016/0092-8674(93)90307-C.
- Walhout, Albertha J. M., Simon J. Boulton, et Marc Vidal. 2000. « Yeast Two-Hybrid Systems and Protein Interaction Mapping Projects for Yeast and Worm ». *Yeast* 17(2):88-94. doi: 10.1002/1097-0061(20000630)17:2<88::AID-YEA20>3.0.CO;2-Y.
- Wang, Kevin C., Yul W. Yang, Bo Liu, Amartya Sanyal, Ryan Corces-Zimmerman, Yong Chen, Bryan R. Lajoie, Angeline Protacio, Ryan A. Flynn, Rajnish A. Gupta, Joanna Wysocka, Ming Lei, Job Dekker, Jill A. Helms, et Howard Y. Chang. 2011. « A Long Noncoding RNA Maintains Active Chromatin to Coordinate Homeotic Gene Expression ». *Nature* 472(7341):120-24. doi: 10.1038/nature09819.
- Warren, Robert W., Lisa Nagy, Jane Selegue, Julie Gates, et Sean Carroll. 1994. « Evolution of Homeotic Gene Regulation and Function in Flies and Butterflies ». *Nature* 372(6505):458-61. doi: 10.1038/372458a0.
- Weatherbee, Scott D., H. Frederik Nijhout, Laura W. Grunert, Georg Halder, Ron Galant, Jayne Selegue, et Sean Carroll. 1999. « Ultrabithorax Function in Butterfly Wings and the Evolution of Insect Wing Patterns ». *Current Biology* 9(3):109-15. doi: 10.1016/S0960-9822(99)80064-5.
- Weatherbee, Scott D., Georg Halder, Jaeseob Kim, Angela Hudson, et Sean Carroll. 1998. « Ultrabithorax regulates genes at several levels of the wing-patterning hierarchy to

- shape the development of the *Drosophila* haltere ». *Genes & Development* 12(10):1474-82.
- Weaver, T. A., et R. A. White. 1995. « Headcase, an Imaginal Specific Gene Required for Adult Morphogenesis in *Drosophila Melanogaster* ». *Development* 121(12):4149-60.
- Weihe, Ulrich, Ruslan Dorfman, Mathias F. Wernet, Stephen M. Cohen, et Marco Milán. 2004. « Proximodistal Subdivision of *Drosophila* Legs and Wings: The Elbow-No Ocelli Gene Complex ». *Development (Cambridge, England)* 131(4):767-74. doi: 10.1242/dev.00979.
- Whitcomb, Sarah J., Amrita Basu, C. David Allis, et Emily Bernstein. 2007. « Polycomb Group Proteins: An Evolutionary Perspective ». *Trends in Genetics* 23(10):494-502. doi: 10.1016/j.tig.2007.08.006.
- White, R. A. H., et M. Wilcox. 1985. « Distribution of Ultrabithorax proteins in *Drosophila* ». *The EMBO Journal* 4(8):2035-43.
- White, Robert A. H., et Michael E. Akam. 1985. « Contrabithorax Mutations Cause Inappropriate Expression of Ultrabithorax Products in *Drosophila* ». *Nature* 318(6046):567-69. doi: 10.1038/318567a0.
- Wiegmann, Brian M., Michelle D. Trautwein, Jung-Wook Kim, Brian K. Cassel, Matthew A. Bertone, Shaun L. Winterton, et David K. Yeates. 2009. « Single-copy nuclear genes resolve the phylogeny of the holometabolous insects ». *BMC Biology* 7:34. doi: 10.1186/1741-7007-7-34.
- Wiellette, E. L., K. W. Harding, K. A. Mace, M. R. Ronshaugen, F. Y. Wang, et W. McGinnis. 1999. « Spen Encodes an RNP Motif Protein That Interacts with Hox Pathways to Repress the Development of Head-like Sclerites in the *Drosophila* Trunk ». *Development (Cambridge, England)* 126(23):5373-85.
- Wieschaus, Eric, et Walter Gehring. 1976. « Clonal Analysis of Primordial Disc Cells in the Early Embryo of *Drosophila Melanogaster* ». *Developmental Biology* 50(2):249-63. doi: 10.1016/0012-1606(76)90150-0.
- Wigglesworth, V. B. 1946. « Organs of Equilibrium in Flying Insects ». *Nature* 157:655. doi: 10.1038/157655a0.
- Williams, Thomas M., Melissa E. Williams, et Jeffrey W. Innis. 2005. « Range of HOX/TALE Superclass Associations and Protein Domain Requirements for HOXA13:MEIS Interaction ». *Developmental Biology* 277(2):457-71. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.10.004.
- Wittkopp, Patricia J., John R. True, et Sean B. Carroll. 2002. « Reciprocal Functions of the *Drosophila* Yellow and Ebony Proteins in the Development and Evolution of Pigment Patterns ». *Development (Cambridge, England)* 129(8):1849-58.

- Wollesen, Tim, Sonia Victoria Rodríguez Monje, André Luiz de Oliveira, et Andreas Wanninger. 2018. « Staggered Hox Expression Is More Widespread among Molluscs than Previously Appreciated ». *Proceedings. Biological Sciences* 285(1888). doi: 10.1098/rspb.2018.1513.
- Woltering, Joost M., Daan Noordermeer, Marion Leleu, et Denis Duboule. 2014. « Conservation and Divergence of Regulatory Strategies at Hox Loci and the Origin of Tetrapod Digits ». *PLOS Biology* 12(1):e1001773. doi: 10.1371/journal.pbio.1001773.
- Woo, Caroline J., Peter V. Kharchenko, Laurence Daheron, Peter J. Park, et Robert E. Kingston. 2010. « A Region of the Human HOXD Cluster That Confers Polycomb-Group Responsiveness ». *Cell* 140(1):99-110. doi: 10.1016/j.cell.2009.12.022.
- Wu, Min, Peng Fei Wang, Jung Shin Lee, Skylar Martin-Brown, Laurence Florens, Michael Washburn, et Ali Shilatifard. 2008. « Molecular Regulation of H3K4 Trimethylation by Wdr82, a Component of Human Set1/COMPASS ». *Molecular and Cellular Biology* 28(24):7337-44. doi: 10.1128/MCB.00976-08.
- Wu, Xinyan, Stephan Ellmann, Ethel Rubin, Minchan Gil, Kideok Jin, Liangfeng Han, Hexin Chen, Erika M. Kwon, Jianhui Guo, Hyo Chol Ha, et Saraswati Sukumar. 2012. « ADP Ribosylation by PARP-1 Suppresses HOXB7 Transcriptional Activity ». *PLOS ONE* 7(7):e40644. doi: 10.1371/journal.pone.0040644.
- Xu, Bei, Dirk Geerts, Zhiqin Bu, Jihui Ai, Lei Jin, Yufeng Li, Hanwang Zhang, et Guijin Zhu. 2014. « Regulation of Endometrial Receptivity by the Highly Expressed HOXA9, HOXA11 and HOXD10 HOX-Class Homeobox Genes ». *Human Reproduction* 29(4):781-90. doi: 10.1093/humrep/deu004.
- Xu, Xiang-Ru Shannon, Valentino Matteo Gantz, Natalia Siomava, et Ethan Bier. 2017. « CRISPR/Cas9 and Active Genetics-Based Trans-Species Replacement of the Endogenous Drosophila Kni-L2 CRM Reveals Unexpected Complexity ». *ELife* 6. doi: 10.7554/eLife.30281.
- Xu, Y., D. W. Piston, et C. H. Johnson. 1999. « A Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) System: Application to Interacting Circadian Clock Proteins ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(1):151-56. doi: 10.1073/pnas.96.1.151.
- Yarger, Alexandra M., et Jessica L. Fox. 2016. « Dipteran Halteres: Perspectives on Function and Integration for a Unique Sensory Organ ». *Integrative and Comparative Biology* 56(5):865-76. doi: 10.1093/icb/icw086.
- Yasukochi, Yuji, Laksmikutty A. Ashakumary, Chengcang Wu, Atsuo Yoshido, Junko Nohata, Kazuei Mita, et Ken Sahara. 2004. « Organization of the Hox Gene Cluster of the Silkworm, Bombyx Mori: A Split of the Hox Cluster in a Non-Drosophila Insect ». *Development Genes and Evolution* 214(12):606-14. doi: 10.1007/s00427-004-0441-1.

- Yeh, S. D., S. R. Liou, et J. R. True. 2006. « Genetics of Divergence in Male Wing Pigmentation and Courtship Behavior between *Drosophila Elegans* and *D. Gunungcola* ». *Heredity* 96(5):383-95. doi: 10.1038/sj.hdy.6800814.
- Yekta, Soraya, Clifford J. Tabin, et David P. Bartel. 2008. « MicroRNAs in the Hox network: an apparent link to posterior prevalence ». *Nature reviews. Genetics* 9(10):789-96. doi: 10.1038/nrg2400.
- Yin, Xiaoying. 2003. « Low molecular weight inhibitors of Myc–Max interaction and function | Oncogene ». Consulté 31 juillet 2020 (<https://www.nature.com/articles/1206641>).
- Young, Teddy, Jennifer Elizabeth Rowland, Cesca van de Ven, Monika Bialecka, Ana Novoa, Marta Carapuco, Johan van Nes, Wim de Graaff, Isabelle Duluc, Jean-Noël Freund, Felix Beck, Moises Mallo, et Jacqueline Deschamps. 2009. « Cdx and Hox Genes Differentially Regulate Posterior Axial Growth in Mammalian Embryos ». *Developmental Cell* 17(4):516-26. doi: 10.1016/j.devcel.2009.08.010.
- Yu, B. D., J. L. Hess, S. E. Horning, G. A. Brown, et S. J. Korsmeyer. 1995. « Altered Hox Expression and Segmental Identity in Mll-Mutant Mice ». *Nature* 378(6556):505-8. doi: 10.1038/378505a0.
- Yu, Benjamin D., Robin D. Hanson, Jay L. Hess, Susan E. Horning, et Stanley J. Korsmeyer. 1998. « MLL, a Mammalian Trithorax-Group Gene, Functions as a Transcriptional Maintenance Factor in Morphogenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(18):10632-36.
- Yu, Yan, et Leslie Pick. 1995. « Non-Periodic Cues Generate Seven Ftz Stripes in the *Drosophila* Embryo ». *Mechanisms of Development* 50(2):163-75. doi: 10.1016/0925-4773(94)00333-I.
- Yuan, Wen, Mo Xu, Chang Huang, Nan Liu, She Chen, et Bing Zhu. 2011. « H3K36 Methylation Antagonizes PRC2-Mediated H3K27 Methylation ». *The Journal of Biological Chemistry* 286(10):7983-89. doi: 10.1074/jbc.M110.194027.
- Zakany, Jozsef, et Denis Duboule. 2007. « The Role of Hox Genes during Vertebrate Limb Development ». *Current Opinion in Genetics & Development* 17(4):359-66. doi: 10.1016/j.gde.2007.05.011.
- Zalokar, M., et I. Erk. 1976. « Division and Migration of Nuclei during Early Embryogenesis of *Drosophila Melanogaster* ». *Journal de Microscopie et de Biologie Cellulaire*.
- Zappavigna, Vincenzo, Luca Falciola, Manuela Helmer Citterich, Fulvio Mavilio, et Marco E. Bianchi. 1996. « HMG1 Interacts with HOX Proteins and Enhances Their DNA Binding and Transcriptional Activation ». *EMBO Journal* 15(18):4981-91.
- Zdobnov, Evgeny M., et Peer Bork. 2007. « Quantification of Insect Genome Divergence ». *Trends in Genetics: TIG* 23(1):16-20. doi: 10.1016/j.tig.2006.10.004.

- Zecca, M., K. Basler, et G. Struhl. 1995. « Sequential Organizing Activities of Engrailed, Hedgehog and Decapentaplegic in the *Drosophila* Wing ». *Development* 121(8):2265-78.
- Zeiske, Tim, Nithya Baburajendran, Anna Kaczynska, Julia Brasch, Arthur G. Palmer, Lawrence Shapiro, Barry Honig, et Richard S. Mann. 2018. « Intrinsic DNA Shape Accounts for Affinity Differences between Hox-Cofactor Binding Sites ». *Cell Reports* 24(9):2221-30. doi: 10.1016/j.celrep.2018.07.100.
- Zeng, W., D. J. Andrew, L. D. Mathies, M. A. Horner, et M. P. Scott. 1993. « Ectopic Expression and Function of the Antp and Scr Homeotic Genes: The N Terminus of the Homeodomain Is Critical to Functional Specificity ». *Development (Cambridge, England)* 118(2):339-52.
- Zhang, Lei, Tao Yue, et Jin Jiang. 2009. « Hippo Signaling Pathway and Organ Size Control ». *Fly* 3(1):68-73. doi: 10.4161/fly.3.1.7788.
- Zhao, Jing, Bryan K. Sun, Jennifer A. Erwin, Ji-Joon Song, et Jeannie T. Lee. 2008. « Polycomb Proteins Targeted by a Short Repeat RNA to the Mouse X Chromosome ». *Science (New York, N.Y.)* 322(5902):750-56. doi: 10.1126/science.1163045.
- Zhou, Jun, Jian Lin, Cuihong Zhou, Xiaoyan Deng, et Bin Xia. 2011. « An Improved Bimolecular Fluorescence Complementation Tool Based on Superfolder Green Fluorescent Protein ». *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica* 43(3):239-44. doi: 10.1093/abbs/gmq128.
- Zouaz, Amel, Ankush Auradkar, Marie Claire Delfini, Meiggie Macchi, Marine Barthez, Serge Ela Akoa, Leila Bastianelli, Gengqiang Xie, Wu-Min Deng, Stuart S. Levine, Yacine Graba, et Andrew J. Saurin. 2017. « The Hox proteins Ubx and AbdA collaborate with the transcription pausing factor M1BP to regulate gene transcription ». *The EMBO Journal* 36(19):2887-2906. doi: 10.15252/emj.201695751.