



HAL
open science

Étude du rôle de modificateurs de marques d'histones sur l'établissement de la pigmentation abdominale et sa plasticité chez *Drosophila melanogaster*

Raphaël Narbey

► **To cite this version:**

Raphaël Narbey. Étude du rôle de modificateurs de marques d'histones sur l'établissement de la pigmentation abdominale et sa plasticité chez *Drosophila melanogaster*. Biologie du développement. Sorbonne Université, 2023. Français. NNT : 2023SORUS725 . tel-04573072

HAL Id: tel-04573072

<https://theses.hal.science/tel-04573072>

Submitted on 13 May 2024

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.



SORBONNE UNIVERSITE

Faculté des Sciences et Ingénierie

Ecole doctorale Complexité du Vivant ED515

IBPS – UMR7622, Laboratoire de Biologie du Développement, Sorbonne Université, CNRS

Equipe : « Contrôle épigénétique de l'homéostasie et de la plasticité du développement »

**Etude du rôle de modificateurs de marques d'histones sur
l'établissement de la pigmentation abdominale et sa plasticité chez
*Drosophila melanogaster***

Par Raphaël Narbey

Thèse de Doctorat de Génétique

Dirigée par Emmanuèle Mouchel-Vielh et Jean-Michel Gibert

Présentée et soutenue publiquement le 13 novembre 2023

Devant le jury composé de :

Pr. Mathieu MOLET

Professeur

Président

Pr. Patricia GIBERT

Professeur

Rapporteur

Pr. Benjamin LOPPIN

Directeur de recherche

Rapporteur

Pr. Delara SEBARAN-DJONEIDI

Professeur

Examinatrice

Pr. Emmanuèle MOUCHEL-VIELH

Professeur

Co-Directrice de thèse

Dr. Jean-Michel GIBERT

Chargé de recherche

Co-Directeur de thèse

RESUME

La plasticité phénotypique est la capacité d'un génotype à produire des phénotypes distincts en réponse à des environnements fluctuants, comme la température, la présence de prédateurs ou la durée du jour. Cela permet aux individus de s'adapter à leur milieu changeant. Par ailleurs, la plasticité phénotypique peut faciliter l'évolution en augmentant la gamme de phénotypes produits par un individu.

Pour étudier les mécanismes de la plasticité phénotypique, le laboratoire dans lequel j'ai effectué ma thèse utilise comme modèle la pigmentation abdominale des femelles *Drosophila melanogaster*, qui est sensible à la température. Les études précédentes du laboratoire ont permis de commencer à reconstruire le réseau de gènes impliqué dans la pigmentation abdominale et sa plasticité. On y retrouve en particulier le gène *tan* codant pour une enzyme de la pigmentation ainsi que deux de ses régulateurs, le facteur de transcription Bab1 et l'histone méthyl-transférase Trx déposant la marque d'histone activatrice H3K4me3. L'expression de *tan* ainsi que le niveau de H3K4me3 sur son promoteur sont modulés par la température. Pour compléter ce réseau, un crible génétique réalisé avant mon arrivée a permis d'identifier de nouveaux régulateurs transcriptionnels et chromatinien impliqués dans l'établissement de la pigmentation.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé au rôle de deux de ces régulateurs : la lysine-déméthylase Lid (Little imaginal disc) effaçant la marque H3K4me3 et l'histone méthyl-transférase Grappa (Gpp) déposant la marque activatrice H3K79me3.

J'ai ainsi confirmé, par des expériences génétiques et moléculaires, que *lid* et *gpp* régulent la pigmentation et j'ai identifié les gènes de synthèse des pigments médiant leurs effets. De façon remarquable, *gpp* joue des rôles opposés sur la pigmentation en régulant des gènes de pigmentation distincts à différents stades du développement. De son côté, *lid* a un rôle plus simple d'activateur de la pigmentation *via* la régulation de *tan*. J'ai également montré que le complexe chromatinien DotCom, dont Grappa est l'unité catalytique, est impliqué dans la

plasticité thermique de la pigmentation. Enfin, j'ai généré et analysé les transcriptomes d'épidermes abdominaux d'individus sous-exprimant *lid* ou *trx*. J'ai ainsi montré que *Lid* est impliquée dans la régulation de *bab1*. J'ai également identifié de nouveaux gènes candidats impliqués dans le réseau. Parmi ces candidats, je me suis focalisé sur deux gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des piRNA, *piwi* et *aub*, qui sont tous deux régulés positivement par *lid* et *trx*. J'ai montré qu'ils sont impliqués dans la pigmentation et que leur expression est modulée par la température. Mes travaux ont donc permis d'identifier de nouveaux composants du réseau de gènes médiant la plasticité thermique de la pigmentation et ouvrent de nouvelles perspectives sur les rôles de membres de la voie des piRNA dans le soma.

ABSTRACT

Phenotypic plasticity is the genotype's ability to produce distinct phenotypes in response to fluctuating environments, such as temperature, predator presence, or day length. This allows individuals to adapt to their changing surroundings. Additionally, phenotypic plasticity can facilitate evolution by increasing the range of phenotypes produced by an individual.

To study the mechanisms of phenotypic plasticity, the laboratory where I conducted my thesis research uses the abdominal pigmentation of female *Drosophila melanogaster* as a model, which is sensitive to temperature. Previous studies in the lab have begun to reconstruct the gene network involved in abdominal pigmentation and its plasticity. This includes *tan*, encoding a pigmentation enzyme, as well as two of its regulators: the transcription factor *Bab1* and the histone methyltransferase *Trx*, which deposits the activating histone mark H3K4me3. The expression of *tan* and the level of H3K4me3 on its promoter are both influenced by temperature. In addition to this network, a genetic screen

conducted before my arrival in the lab identified new transcriptional and chromatin regulators involved in pigmentation establishment.

During my thesis, I focused on the role of two of these regulators: the lysine demethylase Lid (Little imaginal disc), which erases the H3K4me3 mark, and the histone methyltransferase Grappa (Gpp), which deposits the activating mark H3K79me3. Through genetic and molecular experiments, I confirmed that *lid* and *gpp* regulate pigmentation and I identified the pigment synthesis genes mediating their effects. Interestingly, *gpp* plays opposite roles in pigmentation regulation by controlling distinct pigmentation genes at different stages of development. On the other hand, *lid* has a more straightforward role as an activator of pigmentation through the regulation of *tan*. I also demonstrated that the chromatin complex DotCom, of which Grappa is the catalytic unit, is involved in the thermal plasticity of pigmentation. Finally, I generated and analyzed the transcriptomes of abdominal epidermis from individuals underexpressing *lid* or *trx*. This revealed that Lid is involved in the regulation of *bab1*. I also identified new candidate genes involved in the network. Among these candidates, I focused on two genes involved in the piRNA biosynthesis pathway, *piwi* and *aub*, both of which are positively regulated by *lid* and *trx*. I showed that they are involved in pigmentation and that their expression is temperature-dependent. Therefore, my work identified new components of the gene network mediating thermal plasticity of pigmentation and opens up new perspectives on the roles of members of the piRNA pathway in the soma.

REMERCIEMENT

Je tiens tout d'abord à remercier Mathieu Molet, Patricia Gibert, Benjamin Loppin et Sebaran-Djoneidi d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et d'évaluer mon travail (et d'avoir répondu si vite pendant cette période un peu stressante). Je remercie aussi Sylvie Rimsky, Amir Yassin et Ines Drinnenberg qui ont accepté de faire partie de mon comité de thèse, m'ont suivi tout au long de ces 3 années de thèse et m'ont donné des super conseils pendant les comités de thèse.

Je tiens à remercier mes directeurs de thèse Emmanuèle et Jean-Michel pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ma thèse et surtout de m'avoir fait confiance pour se lancer tous les trois dans cette aventure. J'ai appris énormément de choses auprès de vous deux, la dissection d'abdomen (un peu compliquée au début je dois avouer), la BM, les présentations et merci de m'avoir permis d'être formé à la bio-info. Il me reste quand même pas mal d'efforts à faire sur certains points (l'écriture peut-être ?). Vous avez toujours été très disponibles, patients, en bref un vrai soutien en particulier depuis ces fameuses demandes de 4ème année. J'ai aussi beaucoup apprécié faire la fête de la science avec toi Jean-Michel ! Je vous remercie vraiment pour tout ce que vous m'avez apporté et j'ai passé trois années superbes en votre compagnie.

Je remercie aussi toute l'équipe de m'avoir accueilli chaleureusement, j'ai passé de très bons moments avec vous et j'ai beaucoup rigolé.

Frédérique, merci pour les conseils sur les présentations, en réunions de labo et aussi pour le papier !

Valérie, je te remercie pour tes conseils que tu as pu me donner dans la pièce à mouche, et surtout pour les moments qu'on a passés ensemble. Tes conseils pour les séries toujours au top (La dernière en date Silo, si vous lisez ces remerciements, n'hésitez pas à la regarder) et les bonnes tranches de rire qu'on a eues ensemble. Le meilleur de tout étant mon sac grenouille que tu m'as fait, je dois avouer que je l'utilise presque tous les jours !

Marco... Tu m'avais dit qu'on irait manger ensemble une bonne côte de bœuf à la rentrée, j'attends toujours. Ceci étant dit, même si on s'est peu vu, j'ai passé des moments pépites de ma vie en ta compagnie, le plus mémorable étant le coup de la serpillère et quelques autres bêtises que j'ai reçues sur WhatsApp. Je suis impatient de voir ton déguisement pour le prochain carnaval de Rio.

Hélène, merci pour tes conseils très utiles et aussi pour nos petites discussions la nuit tombée au labo, des projets scientifiques à nos histoires quotidiennes. C'est toujours un moment agréable.

Delphine, Yoda, Maître Chicken-run ? Je te remercie d'avoir été là pour moi, que ce soit la question la plus débile ou ces fichues mises au point pour les manips (je ne pense pas du tout au Cut&Run). J'ai adoré ces périodes de manips qu'on a faites tous les deux et aussi tous les autres moments qu'on a passés ensemble (la sortie bio-rad, les discussions sur les livres et aussi et surtout les tests de personnalité). Merci aussi pour ta bonne humeur et les fous rires.

Héloïse, merci beaucoup de m'avoir intégré très vite à l'équipe et aussi pour ces plans farfelus qu'on a montés ensemble. Je pense qu'il reste encore beaucoup de coups à faire.

Je remercie aussi l'équipe TERBio et Gho, les deux autres membres de la trinité des drosophilistes, pour tous les petits moments ou plus grands qu'on a passés ensemble (le denier Noël était très drôle). Je vous remercie aussi pour toutes les discussions que j'ai pu avoir avec vous.

Valérie et Bruno, merci pour votre bonne humeur et les fous rires qu'on a eus dans la pièce à mouches. J'avoue que la boîte à meuh-meuh (enfin le truc qui fait un bruit de vache) m'a bien fait rire.

Clément, je suis jaloux de ta chemise droso, mais bon, merci pour les petites discussions qu'on a eues et surtout le rhum, enfin je crois.

Laure, merci pour tout, je suis très content de t'avoir eue pendant mon cursus, surtout en M2, ça m'a fait beaucoup rire de me trouver dans le même couloir que toi. L'aide pour les small-seq aussi !

La Boiv....

Sophie, Jérôme et Agnès, merci pour votre aide pour la mise au point de mes manip, mais aussi pour nos discussions et de m'avoir soutenu pour la fin de ma thèse (par contre je ne sais pas qui va manger la confiture de cactus ?).

Enfin les doctorants que j'ai rencontrés tout au long de ma thèse, en particulier ceux du C5, les Poulhobbits. Toutes ces petites soirées, voyages, autres salades et filouteries qu'on a partagés ont été vraiment géniaux.

Julie, je suis très très content de t'avoir rencontrée pendant cette thèse (je te promets qu'on est des vrais amis hein). Il y a trop de choses à écrire sur toi mais le moment le plus mémorable pour moi reste notre déplacement pour le DrosoFrance, entre le stop, Dark Vador, le coup de la chambre, les fontaines à vin et évidemment les présentations, c'était une véritable pépite. Des manip à tout le reste, merci de m'avoir toujours soutenu et aidé pendant les périodes calmes et les plus difficiles, je suis super content de t'avoir rencontrée. On a vécu beaucoup de chose trop bien et c'est que le début.

Mira et la Pompe, bon je vous mets ensemble histoire de place hein. Je suis hyper content de vous avoir rencontrés tous les deux (Gros Big Up à la nuit dans la tente à 4). Mira, un peu la tante de l'étage, merci pour tous les points manip qu'on a fait tous les deux mais aussi pour tes conseils si sages et les briques miam miam. J'espère qu'on va continuer à manger des bonnes salades tout en dégustant du pinot. Antoine, merci pour une seule chose, c'est de m'avoir amené à VMVDC. Non et évidemment pleins d'autres choses mais ça on a passé des soirées à en parler en rentrant de la BAB, au C4, chez toi, chez moi. En bref je suis très content de vous avoir rencontrés et même si vous partez à l'autre bout du monde, j'espère qu'on pourra encore se voir.

Juste caille, bon bah la star du C5, le d'Artagnan du trio de 2020, j'en perds mes mots. Mais ce que je sais c'est qu'on a le même humour, hypothèse validée pendant VMVDC ou j'ai passé des moments géniaux avec toi, évidemment ce n'est pas les seuls. Et même si tu nous snobes je suis très content de t'avoir rencontrée.

Zohair Zariat, je ne sais toujours pas après 2 ans et demi ou nous en sommes dans notre relation tumultueuse. D'un timide chétif, tu t'es transformé en une armoire à glace, bon même si tu manges de la litière mais ça c'est autre chose. Trêve de plaisanteries, je suis content de t'avoir rencontré et je pense que tu vas très bientôt trouver ta voie.

La loche, bon bah tu m'aimes pas mais c'est comme ça, on choisit pas les goûts et les couleurs (la purée ketchup par contre oui). Néanmoins, j'ai découvert le bol hanse tasse et ça n'a pas de prix. Mais bon on aura quand même bien rigolé.

Je remercie aussi toutes mes petites potes de la fac, Coco, MA, flow, sarah, thif et lolotte de m'avoir soutenu pendant toutes ces années et pour s'être bien occupé de moi, love.

Rémy, Trundle, Britney, le jumeau maléfique (ou pas), tu es une des plus belles pépites que j'ai rencontré pendant ma thèse, mais ça tu le sais déjà, on se comprend sur beaucoup de choses (La malk y compris). Quand tu lis ce petit paragraphe envoie vidéo tourniqué de WW. C'est que le début qui commence et on va faire encore beaucoup de choses ensemble. Mais plus sérieusement, merci pour l'écriture, je pense que ça aurait été plus compliqué sans toi et pour tout le reste.

Spécial dédicace à tous les doctorants de VDVMC avec qui j'ai fait cette mission incroyable (très fatigante mais très drôle), j'ai passé des moments de zinzin avec vous et je suis très content de vous avoir tous rencontrés. Et aussi tous les autres que j'ai rencontrés pendant ces années de thèses, je suis désolé mais ce serait beaucoup trop long.

Je remercie aussi *Drosophila melanogaster* d'être juste le meilleur modèle et un certain Thomas H. Morgan d'avoir lancé la mode.

Un gros merci aussi au FC, même si aucun de vous ne lira ça, vous avez été d'un grand soutien pendant ces 3 années. En particulier pendant les petits moments intenses de ma vie personnelle et vous m'avez toujours soutenu et changé les idées quand il le fallait.

Evidemment Zoé, ma zozoi, j'ai eu énormément de chance de te rencontrer pendant cette thèse et je te remercie pour tout. Plus particulièrement du soutien que tu m'as apporté depuis le début même si tu le penses pas. Sans toi cette dernière année aurait vraiment été moins bien. Je suis impatient de voir ce que la suite nous réserve.

Enfin ma famille, je vous remercie tous pour le soutien que vous m'avez apporté pendant toutes ces années, les études, la thèse et tout le reste. De m'avoir encouragé dans mes choix.

Par contre, je ne remercie pas toutes les personnes à qui j'ai dit que je faisais une thèse et qui m'ont répondu « Ah, tu fais encore des études, c'est quand que tu commences à travailler ? »

MOTS CLES

Drosophile, plasticité phénotypique, pigmentation abdominale, *tan*, *DotCom*, *lid*, *piwi*, *aub*

KEY WORDS

Drosophila, phenotypic plasticity, abdominal pigmentation, *tan*, *DotCom*, *lid*, *piwi*, *aub*

NOM ET ADRESSE DU LABORATOIRE

UMR7622 – IBPS – CNRS – SORBONNE UNIVERSITE

Laboratoire de Biologie du Développement

Equipe « Contrôle épigénétique de l'homéostasie et de la plasticité du développement »

9 quai St Bernard

75005 Paris

France

TABLE DES MATIERES

RESUME

REMERCIEMENTS

MOTS CLES/KEY WORDS/NOM ET ADRESSE DU LABORATOIRE

TABLE DES MATIERES

TABLE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Introduction

Chapitre 1 - Chromatine et environnement.....	1
I) Structure de la chromatine	2
II) Principaux acteurs impliqués dans la régulation de la compaction de la chromatine.....	6
1) La méthylation de l'ADN.....	6
2) Les remodeleurs de la chromatine	7
3) Les protéines du groupe Polycomb et Trithorax	8
a. Les complexes PcG.....	9
b. Les complexes TrxG.....	12
4) Les modifications post-traductionnelles des histones (PTM) ou marques d'histones	14
a) PTM des histones et perturbations structurelles directes de la structure de la chromatine	17
b) PTM des histones et régulation de la fixation de facteurs de la chromatine	18
i) La marque H3K4me3	18
ii) La méthylation de H3K27	21
iii) La méthylation de H3K9	22
iv) La méthylation de H3K79	22
c) Le dialogue entre marques d'histones	23
5) Implication des ARN non codants dans la compaction de la chromatine.....	24
III) Les différents états de la chromatine.....	27
1) Les trois états de l'hétérochromatine	28
a) L'hétérochromatine « verte » associée à HP1	28
b) L'hétérochromatine « bleue » associée aux protéines PcG	29
c) L'hétérochromatine « noire »	30
2) Les deux états de l'euchromatine	30
3) Dynamique des états de la chromatine.....	31
IV) Effet de l'environnement sur l'état de la chromatine	33
Chapitre 2 - La plasticité phénotypique	36
I) Définition de la plasticité phénotypique	36
II) Les différents types de plasticité phénotypique.....	38
III) Quantification de la plasticité phénotypique : les normes de réaction.....	39
IV) Plasticité phénotypique et évolution	40
V) Coûts et limites de la plasticité phénotypique.....	44
VI) Les bases génétiques et moléculaires de la plasticité phénotypique	47
1) Gènes de la plasticité.....	47

2) Rôle des modifications épigénétiques et des voies hormonales dans la plasticité phénotypique	48
3) Autres mécanismes impliqués dans la plasticité phénotypique	50
Chapitre 3 - Mon modèle d'étude : la pigmentation abdominale des femelles <i>D. melanogaster</i> et sa plasticité thermique	52
I) Les gènes de pigmentation chez <i>D. melanogaster</i>	52
1) La voie de biosynthèse des pigments.....	53
2) Expression des gènes de pigmentation	54
3) Facteurs de transcription impliqués dans le contrôle de l'expression des gènes de pigmentation	57
4) Rôles possibles de la pigmentation abdominale	60
II) La plasticité thermique de la pigmentation abdominale.....	61
1) Mécanismes moléculaires de la plasticité thermique de la pigmentation abdominale	63
a) Le gène de pigmentation <i>tan</i>	64
b) Les facteurs de transcription Bab et Abd-B	66
c) La méthyl-transférase Trithorax (<i>Trx</i>).....	69
d) Reconstruction du réseau de gènes régulant la pigmentation abdominale et sa plasticité.....	73
III) Objectifs de ma thèse.....	75

Résultats

Résultats partie I - Etude du rôle du complexe DotCom sur la mise en place de la pigmentation et sa plasticité	77
I) Contexte de l'étude et principaux résultats.....	77
II) Article	77
Résultats partie II – Etude du rôle de <i>little imaginal disc (lid)</i> dans le réseau de régulation de la plasticité thermique de la pigmentation abdominale chez <i>Drosophila melanogaster</i>	97
I) L'histone déméthylase Lid/KDM5	97
II) <i>lid</i> est impliqué dans l'établissement de la pigmentation <i>via</i> la modulation de l'expression du gène de pigmentation <i>tan</i>	103
1) <i>lid</i> est un régulateur positif de la pigmentation abdominale.....	103
2) L'activité déméthylase de Lid est impliquée dans la mise en place de la pigmentation	105
3) <i>lid</i> active la production de mélanine grâce à la régulation de l'expression du gène de pigmentation <i>tan</i>	106
4) <i>tan</i> n'est pas une cible directe de <i>lid</i>	108
III) Identification des cibles transcriptionnelles de <i>lid</i> et <i>trx</i> dans les épidermes abdominaux de pupes âgées.....	109
1) Spécificité tissulaire des cibles transcriptionnelles de <i>lid</i>	110
2) <i>lid</i> et <i>trx</i> partagent de nombreuses cibles transcriptionnelles	112
3) Certains gènes cibles de <i>lid</i> et <i>trx</i> dans l'épiderme abdominal sont modulés par la température	113
4) Sélection par analyse « Gene Ontology » de gènes candidats issus des transcriptomes <i>lid KD</i> et <i>trx KD</i>	115
IV) La régulation de <i>bab1</i> par <i>lid</i> est impliquée dans l'établissement de la pigmentation abdominale	119

V) Certains gènes de la voie des piRNA sont-ils de nouveaux acteurs de l'établissement de la pigmentation abdominale ?.....	121
1) Les piRNA et les protéines PIWI chez <i>D. melanogaster</i>	121
2) Plusieurs gènes de la voie des piRNA jouent un rôle dans l'établissement de la pigmentation.....	127
3) <i>piwi</i> et <i>aub</i> régulent l'expression des gènes de pigmentation <i>tan</i> et <i>y</i>	132
VI) Etude du rôle de <i>lid</i> dans la plasticité thermique de la pigmentation.....	133
VII) Conclusion : enrichissement du réseau de régulation des gènes de pigmentation.....	135

Matériel et Méthodes

I) Stocks des lignées de drosophile	137
II) Préparation des cuticules pour la quantification de la pigmentation et l'acquisition des images	137
III) Analyse de l'expression de gènes par RT-qPCR sur épidermes abdominaux postérieurs de drosophiles femelles	139
IV) Immunoprécipitation de chromatine (ChIP)	140
V) Amorces utilisées pour les expériences de RT-qPCR et ChIP-qPCR.....	141
VI) Obtention par RNA-seq des transcriptomes <i>lid-KD</i> et <i>trx-KD</i> et analyse	142

Discussion et Perspectives

I) Régulation de l'établissement et la plasticité de la pigmentation abdominale par le complexe DotCom	145
II) Implication des protéines régulant la marque d'histone H3K4me3 dans la mise en place de la pigmentation et sa plasticité.....	146
1) Par quels mécanismes <i>aub</i> et <i>piwi</i> sont-ils impliqués dans la mise en place de la pigmentation et sa plasticité ?.....	147
2) Comment préciser la position de <i>lid</i> , <i>piwi</i> et <i>aub</i> dans le réseau de régulation des gènes de pigmentation ?	149
3) L'histone déméthylase Kdm2 est-elle redondante fonctionnellement avec Lid dans l'établissement de la pigmentation et sa plasticité ?.....	150

Bibliographie

Table des figures et tableaux

Figure 1 : Schéma des différents niveaux d'organisation de la chromatine dans le noyau d'une cellule eucaryote.

Figure 2 : Structure du nucléosome.

Figure 3 : Principaux rôles des remodeleurs de la chromatine.

Figure 4 : Compaction de la chromatine par les complexes PcG PRC1, M33 et PRC2.

Figure 5 : Les différentes modifications post-traductionnelles (PTM) des histones ou marques d'histones.

Figure 6: Distribution de certaines méthylations d'histones sur les gènes chez les animaux.

Figure 7 : Les méthyl-transférases et déméthylases de H3K4 chez l'homme.

Figure 8 : Exemples d'interactions entre marques d'histones.

Figure 9 : Régulation des éléments transposables (TE) par les piRNA chez *D. melanogaster*.

Figure 10 : Les différents états de la chromatine chez *D. melanogaster*.

Figure 11 : Dynamique des états chromatinien pendant le développement neural.

Figure 12 : Distribution de la marque H3K27me3 sur les gènes d'ouvrières *Apis mellifera* en présence ou absence de la reine.

Figure 13 : Exemples de plasticité phénotypique.

Figure 14 : Principe d'analyse des normes de réaction.

Figure 15 : L'hypothèse du « *Flexible stem* ».

Figure 16 : Limite de la fiabilité de l'information : exemple du lièvre variable.

Figure 17 : Exemples de plasticité phénotypique liés à des mécanismes hormonaux.

Figure 18: Exemples de plasticité phénotypique dus à des mécanismes non épigénétiques et non hormonaux.

Figure 19 : Dimorphisme sexuel de la pigmentation abdominale chez *D. melanogaster*.

Figure 20 : Voie de biosynthèse des pigments de la cuticule abdominale de *D. melanogaster*.

Figure 21 : Expression et régulation des gènes de pigmentation *tan (t)*, *yellow (y)*, *Ddc* et *ebony (e)* dans l'épiderme abdominal.

Figure 22 : *bab* réprime *tan* en régulant l'activité de son enhancer *t-MSE*.

Figure 23 : Evolution de la température corporelle de femelles *D. melanogaster* mutantes pour *ebony* et *yellow*.

Figure 24 : Plasticité phénotypique de la pigmentation abdominale des femelles *D. melanogaster* dans les segments A5, A6 et A7.

Figure 25 : Sensibilité de la pigmentation à la température pendant le développement.

Figure 26 : Modulation par la température de l'expression des gènes de la pigmentation dans les épidermes abdominaux de jeunes femelles ou de pupes élevées à 18°C ou 29°C.

Figure 27 : La modulation de l'expression de *tan* est essentielle pour la plasticité phénotypique de la pigmentation et implique une régulation de l'activité de son enhancer *t-MSE*.

Figure 28 : Les lignées *Pale* et *Dark* ont une pigmentation et une plasticité différentes.

Figure 29 : L'enhancer de *bab*, *b-DE*, des lignées *Pale* et *Dark* diffère en activité et plasticité, induisant une différence d'expression et de plasticité de *bab* et *tan* entre les deux lignées.

Figure 30 : La température et l'effet d'Abd-B sont impliqués dans la régulation de l'expression de *bab*.

Figure 31 : Compaction de la chromatine et abondance des marques H3K4me3 et H3K27ac sur le locus de *tan* dans les épidermes abdominaux de jeunes femelles élevées à 18°C et 29°C.

Figure 32 : L'histone méthyl-transférase Trx participe à l'établissement de la pigmentation et à sa plasticité thermique.

Figure 33 : Réseau de régulation de gènes médiant l'effet de la température sur la pigmentation abdominale des femelles *D. melanogaster*.

Figure 34 : Les domaines fonctionnels de Lid/KDM5.

Figure 35 - Mécanisme de coordination de Lid et ASH2 dans la régulation de la transcription au cours du développement.

Figure 36 : Effet sur la pigmentation abdominale de la diminution de l'expression de *lid*.

Figure 37 : Effet sur la pigmentation abdominale de la sur-expression de *lid*.

Figure 38 : Effet sur la pigmentation abdominale de la sur-expression d'une forme de Lid déficiente dans l'activité déméthylase.

Figure 39 : Quantification de l'expression des gènes de pigmentation en condition de dérégulation de *lid*.

Figure 40 : *tan* et *lid* interagissent génétiquement.

Figure 41 : La dérégulation de *lid* ne modifie pas le niveau de H3K4me3 sur *tan*.

Figure 42 ; Comparaison de transcriptomes de lignées sous-exprimant *lid* dans différents tissus.

Figure 43 : Comparaison des transcriptomes des épidermes abdominaux de pupes *lid KD* et *trx KD*.

Figure 44 : Comparaison des transcriptomes des épidermes abdominaux de pupes *lid KD* et de pupes *w¹¹¹⁸* élevées à 29°C.

Figure 45 : Analyse « Gene Ontology » (GO) des gènes sous-exprimés en commun dans les transcriptomes *lid KD*, *trx KD* et à 29°C.

Figure 46 : La régulation de *bab1* par *lid* est impliquée dans la pigmentation abdominale.

Figure 47 : Voie de biosynthèse des piRNA primaires et secondaires chez *D. melanogaster*.

Figure 48 : Autres mécanismes de régulation des gènes dans lesquels sont impliquées les protéines PIWI.

Figure 49 : Analyse par RT-qPCR de l'expression de gènes de la voie des piRNA dans l'épiderme abdominal de pupes.

Figure 50 : Phénotypes de pigmentation abdominale induits par une diminution d'expression de gènes de la voie des piRNA.

Figure 51 : Quantification des phénotypes de pigmentation induits par une diminution d'expression de gènes de la voie des piRNA.

Figure 52 : Phénotypes de pigmentation abdominale induits par une diminution d'expression de *rhi* et *moon*.

Figure 53 : Régulation de l'expression des gènes de pigmentation par *aub* et *piwi*.

Figure 54 : Normes de réaction des mutants perte de fonction hétérozygotes *lid^{k06801}* et *lid^{k06801}, trx^{J14A6}* isogénisés en fond *w¹¹¹⁸*.

Figure 55 : Enrichissement du réseau de régulation des gènes de pigmentation.

Figure 56 : Quantification de la pigmentation abdominale des héli-segments (A5, A6 et A7).

Figure 57 : Photo des segments A5, A6 et A7 après dissection pour extraction d'ARN.

Tableau 1 : Les complexes PcG et leurs constituants chez *D. melanogaster* et *H. sapiens*.

Tableau 2 : Les principaux complexes TrxG et leurs constituants chez *D. melanogaster* et *H. sapiens*.

Tableau 3 : Résumé des coûts et limites de la plasticité phénotypique.

Tableau 4 : Liste des gènes candidats sélectionnés après l'analyse des différents transcriptomes.

Tableau 5 : Listes des nouvelles amorces utilisées pour ce projet.

Tableau 6 : Nombres de « reads » totaux et utilisés pour l'analyse des transcriptomes *lid KD* et *trx KD*.

Introduction

Introduction

Chapitre 1 - Chromatine et environnement

L'histoire de la chromatine débute dans les années 1880. Walther Flemming, qui travaille sur la division du noyau des cellules, utilise pour la première fois le terme chromatine pour décrire la substance qui se trouve dans ce noyau (Flemming, 1882). Au début de la seconde moitié du XX^{ème} siècle, plusieurs travaux ont permis une importante avancée dans la compréhension du rôle de la chromatine et sa structure. Ces travaux concernent la découverte de la structure de l'ADN (Watson et Crick, 1953), la composition de la chromatide en une molécule d'ADN continue (Gall, 1963), le fractionnement des histones (Johns et al., 1969) ainsi que la possibilité de préparer des molécules de chromatine solubles (Zubay et Doty, 1959). En 1974, deux laboratoires montrent l'existence d'une interaction entre les histones qui composent le « cœur » de la sous-unité de la chromatine (Anna et Isenberg, 1974 ; Roark et al., 1974). La même année, un modèle de la structure de la chromatine est proposé : environ 200 paires de base d'ADN forment un complexe avec quatre paires d'histones. L'année suivante, le terme de nucléosome apparaît pour décrire cette sous-unité de la chromatine (Oudet et al., 1975). L'analyse en 1997 par cristallographie du nucléosome montre qu'il est composé de quatre paires d'histones entourées de 146-147 bases d'ADN (Luger et al., 1997). Aujourd'hui, on définit la chromatine comme une macromolécule dont l'unité de base est le nucléosome : un segment d'ADN de 146 paires de bases enroulé autour d'un octamère d'histones ((H2A-H2B-H3-H4)_{x2}). La chromatine constitue le support de l'information génétique. Son état est très régulé et cette régulation est essentielle pour de nombreux processus cellulaires et moléculaires.

I) Structure de la chromatine

Chez les eucaryotes, le génome nucléaire contient la majorité de l'information génétique. Ce génome est compacté, répliqué et transcrit dans le noyau des cellules. Pour être confiné dans le noyau, il doit être parfaitement organisé et condensé. De plus, il doit aussi être fonctionnel et permettre l'expression des gènes au bon moment et dans les bons tissus. Le génome nucléaire eucaryote est organisé en plusieurs chromosomes de tailles différentes, composés d'ADN et de protéines sous la forme de chromatine, qui forme une structure en 3 dimensions.

Il existe différents niveaux d'organisation de la chromatine dans le noyau (Figure 1). Tout au long de l'interphase, la chromatine de chaque chromosome occupe un espace spatialement restreint et non aléatoire dans le noyau : le territoire chromosomique. (Cremer and Cremer 2010). Un niveau d'organisation à plus petite échelle correspond aux domaines chromatiniens. Ils sont définis comme des régions du génome qui interagissent préférentiellement entre elles plutôt qu'avec les régions qui les entourent. On les appelle les domaines de topologie associée ou TAD (Dixon et al., 2016). La fibre de chromatine interagit avec elle-même pour former des boucles. Il existe des boucles de chromatine de tailles différentes allant de quelques kilobases à plusieurs mégabases (Dekker and Misteli, 2015). Les frontières des boucles et des TAD sont souvent occupées par des protéines architecturales qui se fixent sur des régions d'ADN : les insulateurs (Stadler et al., 2017). Les insulateurs sont des bordures ou frontières pouvant bloquer la communication entre des éléments de régulation adjacents tels que des enhanceurs et des promoteurs (Vogelmann et al., 2011). Enfin, l'unité de base de la fibre de chromatine est le nucléosome. En 1997, la première cristallographie aux rayons X de la structure du nucléosome révèle qu'il est composé de 146 paires de bases d'ADN enroulées en super-hélice autour d'un octamère d'histones. Celui-ci est constitué de deux molécules de chacune des histones H2A, H2B, H3

et H4 (Figure 2) (Luger et al 1997 ; Felsenfeld et al 2003). L'enroulement de la chromatine des nucléosomes est stabilisé par l'histone H1 de liaison, dont une molécule se trouve entre chaque nucléosome (Fyodorov et al., 2018). Des chaperonnes d'histones se fixent aux histones libres et assurent leur assemblage, stockage et renouvellement. Certaines chaperonnes sont aussi impliquées dans la mise en place de modifications post-traductionnelles des histones (Sauer et al., 2018).

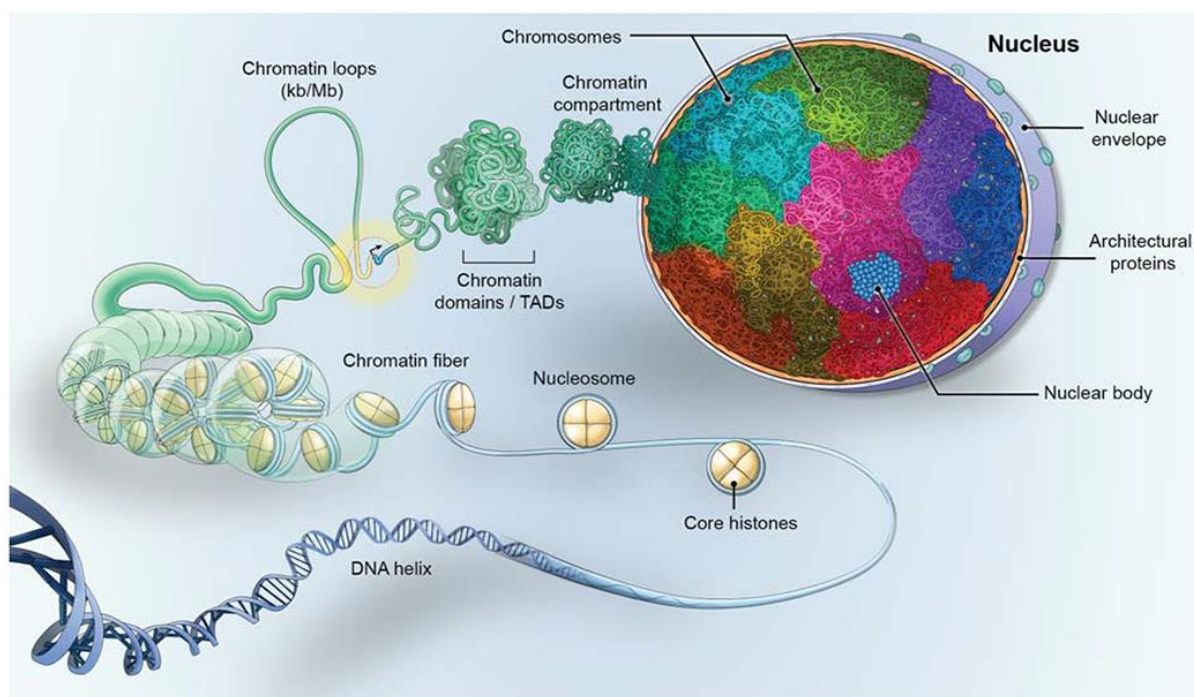


Figure 1 : Schéma des différents niveaux d'organisation de la chromatine dans le noyau d'une cellule eucaryote. L'ADN est enroulé autour des octamères d'histones pour former le nucléosome, qui constitue l'unité de base de la fibre de chromatine. La fibre de chromatine forme ensuite des boucles. Elle est repliée en domaines chromatinien ou TAD. Enfin, chacun des chromosomes occupe un espace distinct dans le noyau, les territoires chromosomiques (Misteli, 2020).

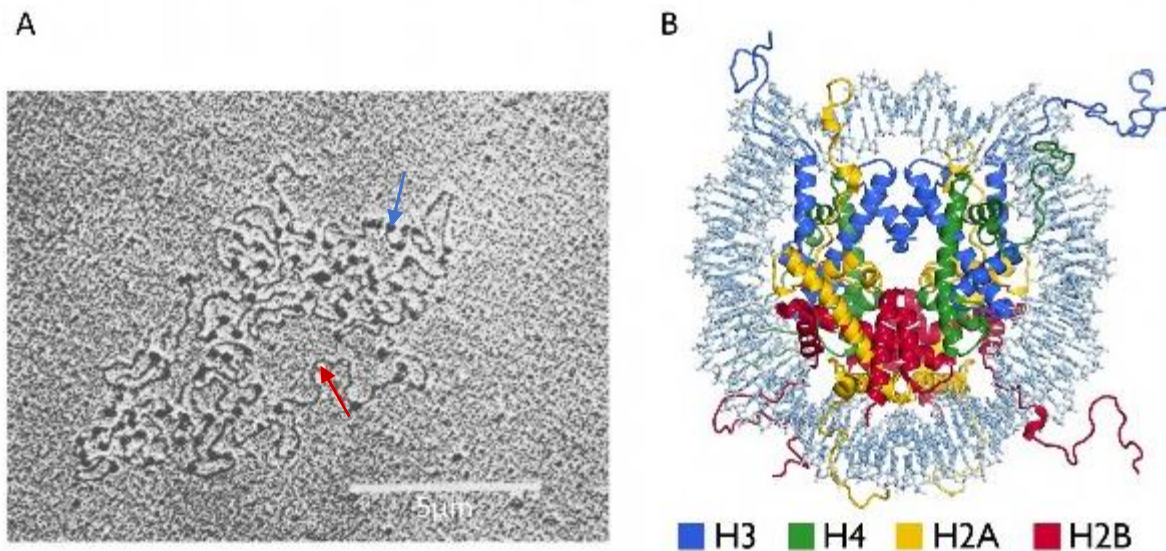


Figure 2 : Structure du nucléosome. A) Visualisation par microscopie à électrons (EM) de chromatine d'érythrocytes de poulet déplétée en histone H1. On observe l'ADN (flèche rouge) qui est lié aux octamères d'histones (flèche bleue) formant une structure en « collier de perles » (Oudet et al., 1975). B) Structure cristallographique d'un nucléosome. L'ADN (en gris) est enroulé autour de l'octamère d'histones qui est formé de deux molécules des quatre « core » histones H2A, H2B, H3 et H4. On observe les extrémités N-terminales des histones ou « queues » des histones qui sortent du centre du nucléosome (McGinty et Tan, 2015 ; Luger et al., 1997).

La chromatine ne sert pas qu'à la compaction de l'ADN génomique. En effet, la régulation de sa structure est impliquée dans de nombreux processus cellulaires comme la réplication, la réparation, la transcription et la ségrégation des chromosomes. Un point commun à ces processus cellulaires est qu'ils font intervenir des acteurs devant accéder à l'ADN. L'état de compaction de la chromatine est donc modulé par différents facteurs afin de permettre l'accessibilité à l'ADN. Les fibres de chromatine sont densément fixées par des protéines architecturales et la chromatine subit l'action de facteurs de remodelage de la chromatine facilitant l'accès de la machinerie transcriptionnelle (Brackley et al., 2016 ; Buckle et al., 2018). La chromatine est une structure dynamique pouvant exister sous différents états et niveaux de compaction.

Classiquement, la chromatine est divisée en deux grands états : l'hétérochromatine (constitutive ou facultative), qui est très condensée et peu ou pas active transcriptionnellement et l'euchromatine, qui est moins condensée et active transcriptionnellement (Grewal et Jia, 2007). L'hétérochromatine est localisée principalement en périphérie du noyau et autour du nucléole (Lieberman-Aiden et al., 2009). L'hétérochromatine constitutive est la plus condensée et la moins active transcriptionnellement, on la trouve dans des régions riches en séquence répétées, comme les régions sub-téломériques et péricentromériques ainsi que sur les éléments transposables (Britten et Kohne, 1968 ; McClintock, 1951). Cette chromatine est caractérisée par la marque d'histone H3K9me3. L'hétérochromatine facultative est retrouvée notamment sur des gènes qui vont passer d'un état transcriptionnellement actif vers un état transcriptionnellement inactif (ou inversement) au cours du développement et de la différenciation. Un exemple de répression par la mise en place d'hétérochromatine facultative est l'inactivation d'un des deux chromosomes X chez les femelles mammifères (Wutz, 2011). L'hétérochromatine facultative est caractérisée par la marque d'histone H3K27me3 qui est associée aux protéines du groupe Polycomb (PcG). L'euchromatine est caractérisée par une chromatine moins condensée, c'est-à-dire présentant une plus grande distance entre les nucléosomes ce qui permet une meilleure accessibilité de la machinerie transcriptionnelle. Cette chromatine est active transcriptionnellement, notamment grâce à des modifications post-traductionnelles des histones et la présence de variants d'histones (Venkatesh et Workman, 2015).

II) Principaux acteurs impliqués dans la régulation de la compaction de la chromatine

1) La méthylation de l'ADN

La méthylation des bases de l'ADN est un mécanisme essentiel intervenant dans la régulation de la compaction de la chromatine et de la transcription des gènes. C'est notamment le cas de la 5-méthylcytosine (5-mC) (Robertson, 2002), qui peut impacter l'accessibilité et la structure de la chromatine. La 5-mC est la méthylation de base la plus commune dans le génome et concerne plus de 4% des cytosines dans le génome humain (Breiling and Lyko, 2015). Cette modification existe chez de nombreux organismes (plantes, mammifères, certains insectes comme l'abeille) mais est absente chez les espèces modèles *D. melanogaster* et *C. elegans*. Elle est localisée notamment au niveau des îlots CpG, qui sont des séquences d'ADN riches en di-nucléotides CG présentes dans certains promoteurs de transcription. La méthylation sur les îlots CpG interfère avec la fixation de facteurs de transcriptions (Iguchi-Arigo et al., 1989. Prendergast et Ziff 1991) et le positionnement des nucléosomes (Huff et Zilbermann, 2014) et induit une répression transcriptionnelle. La méthylation 5-mC peut aussi se produire sur des enhancers, réduisant la fixation du facteur de transcription TCF4 (Charlet et al., 2016). Pour étudier le rôle de la méthylation de l'ADN sur l'accessibilité de la chromatine, le niveau de compaction de la chromatine a été mesuré par ATAC-seq chez 18 mutants de la méthylation de l'ADN chez *Arabidopsis thaliana*. L'effet majoritaire observé chez les mutants est une augmentation de l'accessibilité. Ces résultats montrent que la méthylation de l'ADN est essentielle pour réguler la compaction de la chromatine et son accessibilité (Zhong et al 2021).

2) Les remodeleurs de la chromatine

Les protéines de remodelage de la chromatine ATP-dépendantes se répartissent dans 4 familles, CHD, SWI/SNF, ISWI et INO80 (Clapier et al., 2017). Ce sont des enzymes qui contrôlent la densité et l'espace des nucléosomes en repositionnant les histones et en les échangeant avec des variants d'histones (Figure 3). Les protéines des familles ISWI et CHD permettent au pré-nucléosome de mûrir en nucléosome octamérique et assurent la disposition des nucléosomes à une distance quasiment constante les uns des autres (Fei et al., 2015 ; Ito et al., 1997 ; Lusser et al., 2005). Les protéines des familles SWI/SNF peuvent déplacer ou éjecter des nucléosomes, ce qui permet l'accessibilité à la chromatine de facteurs de transcription, de réparation et de recombinaison (Boeger et al., 2004 ; Wang et al., 2018). Les protéines de la famille INO80 permettent de remplacer une histone du nucléosome par un variant d'histone. L'ajout d'un variant d'histone peut modifier le recrutement ou l'activité de certains facteurs (Goldberg et al., 2010 ; Li et al., 2023).

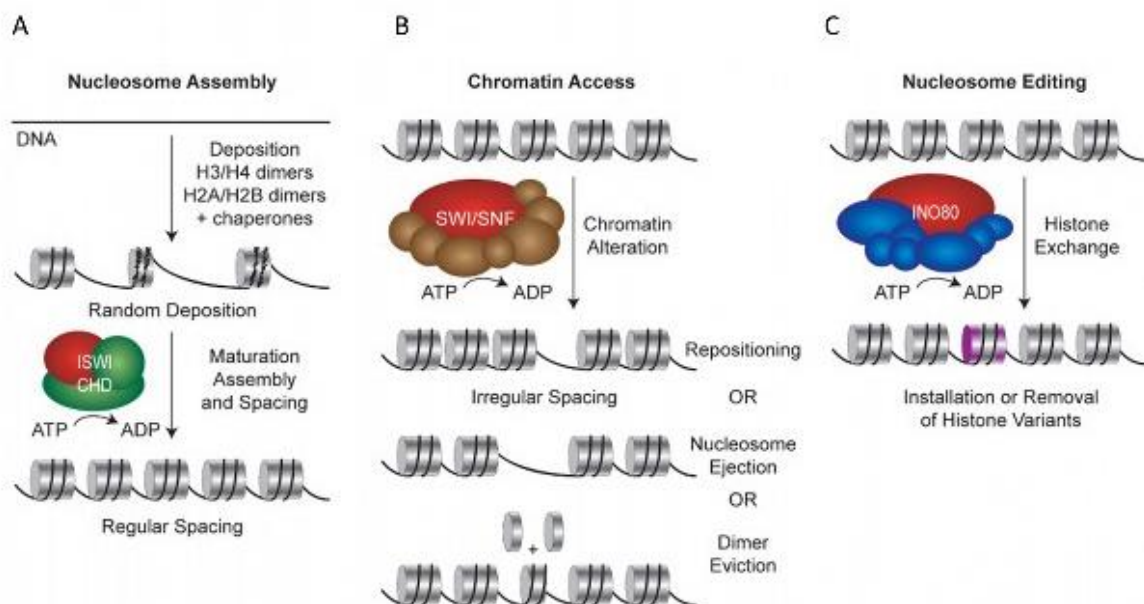


Figure 3 : Principaux rôles des remodeleurs de la chromatine. A) Les protéines des familles ISWI et CHD permettent l'assemblage, la maturation et l'espace des nucléosomes. B) Les protéines de la famille SWI/SNF peuvent repositionner, éjecter ou modifier la composition des nucléosomes. C) Les protéines de la famille INO80 peuvent échanger des « core » histones du nucléosome avec des variants d'histone (Clapier, 2017).

3) Les protéines du groupe Polycomb et Trithorax

Les protéines du groupe Polycomb (PcG) et du groupe Trithorax (TrxG) sont des régulateurs de la structure et de la compaction de la chromatine, très bien conservés au cours de l'évolution. Les premiers membres de ces groupes ont été identifiés chez *D. melanogaster*, d'après les phénotypes homéotiques induits par leurs mutations, ce qui a permis de montrer qu'ils interviennent dans la régulation de l'expression des gènes Hox (d'après revue Kassis et al., 2017). En 1991, la première connexion entre la chromatine et ces acteurs est établie avec la mise en évidence d'un domaine d'interaction entre une protéine PcG (Polycomb) et la chromatine (Paro et Hogness, 1991). Les protéines PcG et TrxG sont organisées en complexes hétéro-multimériques. Les complexes PcG et TrxG ont des actions antagonistes sur la compaction de la chromatine et la régulation de la transcription de nombreux gènes: les PcG répriment l'activité transcriptionnelle et augmentent la compaction de la chromatine (Figure 4), tandis que les TrxG participent à l'activation de la transcription. Ils agissent soit par le remodelage de la chromatine, soit par des modifications post-traductionnelles des histones. En effet, certains résidus des histones peuvent être modifiés post-traductionnellement par méthylation, acétylation, phosphorylation ou ubiquitinylation. Ces modifications post-traductionnelles (PTM) des histones, aussi appelées marques d'histones, sont réversibles et modifient la fixation de protéines à la chromatine. Je reviendrai plus en détail sur ces PTM dans un paragraphe suivant. La régulation des PTM fait intervenir 3 catégories de protéines: les « writers » qui sont les enzymes apposant les PTM, les « readers » qui sont recrutées sur la chromatine grâce à la reconnaissance spécifique de certaines PTM, et les « erasers » qui sont des enzymes

supprimant des PTM. Un grand nombre de « readers », « writers » et « erasers » font partie de complexes PcG et TrxG (d'après revue).

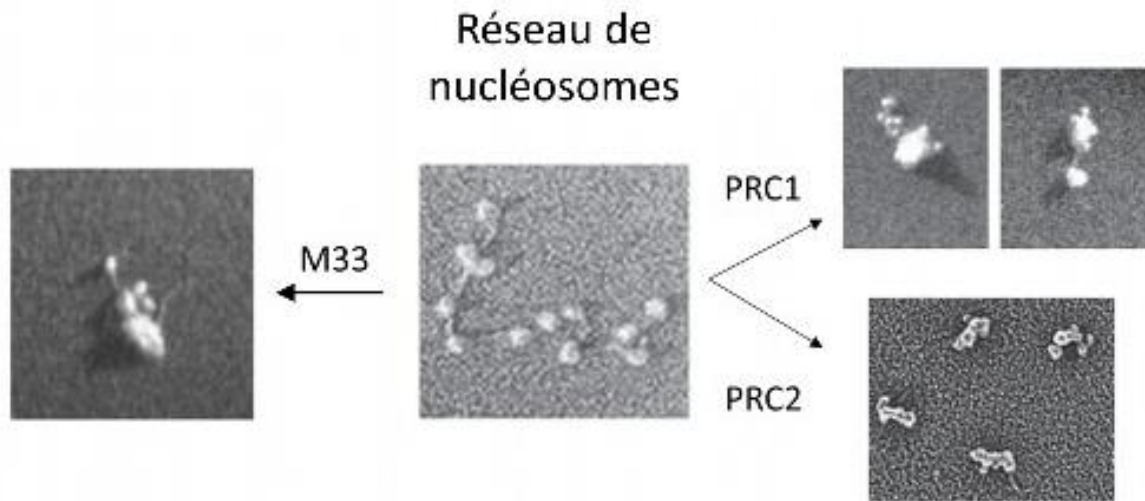


Figure 4 : Compaction de la chromatine par les complexes PcG PRC1, M33 et PRC2. Analyse par microscopie à électrons de la compaction d'un réseau de nucléosomes en absence et en présence de PRC1, PRC2 et M33, l'homologue chez la souris de PRC1. On observe une condensation du réseau de nucléosomes en présence des complexes PcG (Francis et al., 2004 ; Grau et al., 2011).

a. Les complexes PcG

Les premiers complexes PcG identifiés sont PRC1 (Polycomb Repressive Complex 1) (Shao et al., 1999) et PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2) (O'Connell et al., 2001 ; Tie et al., 2003). PRC1 a une composition canonique et plusieurs variants, PRC2 possède un groupe de protéines «core » auquel plusieurs protéines accessoires peuvent être associées. Trois autres complexes PcG ont été identifiés ultérieurement, PhoRC, PR-DUB et dRAF (Tableau 1) (Klymenko et al., 2006; Ayala Alonso et al., 2007). Les PcG sont recrutés au niveau de séquences appelées PRE (Polycomb Response Elements) (Brown et al., 1998). Chez la Drosophile, le complexe PRC2, recruté sur la chromatine grâce à la protéine Suz12, dépose la PTM H3K27me3 grâce à l'histone méthyl-transférase E(z). Cette marque est reconnue par le chromodomaine de Polycomb (Pc), un composant de PRC1, permettant ainsi le

recrutement de PRC1 (Wang et al., 2004). Un mécanisme alternatif de recrutement des PcG concerne une forme variante de PRC1 (PRC1.1) qui dépose la PTM H2A119ub. Celle-ci permet le recrutement de PRC2 qui dépose à son tour H3K27me3 et sert de point d'ancrage pour le recrutement de PRC1 (Blackledge et al., 2014). Une fois recrutés sur leur locus cible, les PcG répriment la transcription en rendant la chromatine inaccessible aux complexes de remodelage ATP dépendants (Shao et al., 1999). Les PcG bloquent aussi l'initiation et l'élongation de l'ARN polymérase II et inhibent le dépôt de marques activatrices (Zhou et al., 2008 ; Tie et al., 2016).

Complexe	Protéines composant le complexe		Fonction connue dans le complexe
	<i>D. melanogaster</i>	<i>H. Sapiens</i>	
PRC1 cannonique	dRing/Sce	RING1A/B	H2AK119 ubiquitination
	Psc/Suz(2)	PCGF1-PCGF6	H2AK119 ubiquitination, oligomérisation
	Pc	CBX2, CBX4, CBX6-CBX8	Fixation à H3K27me3
	Ph	PHC1-PHC3	Oligomérisation/interaction protéine-protéine
	Scm	SCMH1/2	Oligomérisation/interaction protéine-protéine
PRC1 non- cannonique	dRing/Sce	RING1A/B	H2AK119 ubiquitination
	Psc/Suz(2)	PCGF1-PCGF6	H2AK119 ubiquitination, oligomérisation
	dRybp	RYBP/YAF2	Fixation à l'ADN
	Kdm2	KDM2A/B	Déméthylation de H3K4me3, H3K36me3 et fixation à l'ADN
	Wap	DCAF7	Protéine échafaudage
	Wds	WDR5	Protéine échafaudage
PRC2 core	E(z)	EZH1/2	H3K27 méthyl-transférase, fixation aux histones
	Suz(12)	SUZ12	Fixation à l'ADN/ARN
	Esc/Escl	EED164	Fixation à H3K27me3
	Nurf55/Caf1	RBBP4/7	Fixation à H3K36me3
PRC2 protéines « accessoires »	Pcl	PCL1-PCL3	Fixation à H3K36me3
	Jarid2	JARID2	Fixation à H2Aub et à l'ARN
	Jing	AEBP2	Fixation à H2Aub et à l'ADN
Pho-RC	Sfmbt	?	Fixation à la chromatine (lysines mono- et diméthylées de plusieurs histones)
	Pho	?	C2H2 zinc finger
PR-DUB core	Calypso	BAP1	Ubiquitine H2AK118 C-terminal hydrolase
	Asx	ASXL1/2	Fixation à la chromatine
PR-DUB protéines « accessoires »	FoxK	FOXK1/2	Fixation à l'ADN
	Sxc	OGT1	O-GlcNAcylation
	Lsd1	KDM1B	H3K4me3/2/1 déméthylation
	Sba	MBD5/6	Fixation à l'ADN
dRAF	Psc/Suz(2)	PCGF1-PCGF6	H2AK119 ubiquitination
	dRing/Sce	RING1A/B	H2AK119 ubiquitination, oligomérisation
	Kdm2	KDM2A/B	Déméthylation de H3K4me3, H3K36me3 et fixation à l'ADN

Tableau 1 : Les complexes PcG et leurs constituants chez *D. melanogaster* et *H. sapiens*, adapté de Schuettengruber et al., 2017 (d'après revue Kassis et al., 2017, Schuettengruber et al., 2017 ; Lewis, 1947 ; Margueron et Reinberg, 2010 ; Klymenko et al., 2006 ; Ayala Alonso et al., 2007).

b. Les complexes TrxG

Les complexes TrxG les plus connus sont COMPASS, COMPASS-like, ASH1, SWI/SNF, DotCom (Tableau 2). Ils activent la transcription par différents mécanismes dont les PTM des histones, le remodelage de la chromatine ATP-dépendant et le recrutement de l'ARN polymérase II. Par exemple, le complexe DotCom active la transcription via le dépôt de la marque d'histone activatrice H3K79me3. Les mécanismes de recrutement des TrxG sont moins connus que ceux des PcG. Chez la drosophile, des complexes TrxG peuvent co-occuper des PRE avec des complexes PcG en étant recrutés par les mêmes facteurs de transcription (Beisel et al., 2007). Chez l'homme, FOXA1 recrute MLL3 sur les enhancers, ce qui permet de déposer les PTM H3K4me1 et H3K4me2 (Jozwik et al., 2016). De plus, un long ARN non codant (lncRNA), HOXA, recrute COMPASS en interagissant avec sa sous-unité WDR5 (Yang et al., 2014). Enfin, la présence de la marque H3K4me3 permet le recrutement de COMPASS grâce à sa sous-unité MLL1 qui reconnaît cette marque (Milne et al., 2010). Une fois recrutés, les complexes TrxG peuvent déposer des PTM telles que H3K4me3, H3K36me3 ou H3K79me3 qui participent à l'activation et l'élongation de la transcription (Yuan et al., 2011 ; Schwartz et Pirota 2007 ; Schuettengruber et al., 2007).

Complexe TrxG	Protéines composant le complexe		Fonction connue dans le complexe
	<i>D. melanogaster</i>	<i>H. Sapiens</i>	
SET1/COMPASS	Wds	WDR5	Fixation aux histones
	Ash2	ASH2L	Fixation à l'ADN
	Rbbp5	RBBP5	Fixation aux histones
	Dpy30	DPY30	
	dSet1	SET1A/B	H3K4 méthyl-transférase
	Hcf1	HCF1	Fixation aux histones
	Wdr82	WDR82	Fixation à l'ADN
	Cfp1	CFP1	
MLL1/2 COMPASS-like Trx complex	Wds	WDR5	Fixation aux histones
	Ash2	ASH2L	Fixation à l'ADN
	Rbbp5	RBBP5	Fixation aux histones
	Dpy30	DPY30	
	Trx	MLL1/2	H3K4 méthyl-transférase
	Hcf1	HCF1	
	Menin	MENIN	
MLL3/4 COMPASS-like Trr complex	Wds	WDR5	Fixation aux histones
	Ash2	ASH2L	Fixation à l'ADN
	Rbbp5	RBBP5	Fixation aux histones
	Dpy30	DPY30	
	Trr	MLL3/4	H3K4 méthyl-transférase
	Ncoa6	NCOA6	
	Pa1	PA1	
	Utx	UTX	H3K27 déméthylase
	Ptip	PTIP	
DotCom	Gpp	DOT1L	H3K79me3 méthylation
	Alh	AF10/17	Zinc finger
	EAR	ENL/AF9	Facteur de transcription
	NippedA	TRRAP	
ASH1	Ash1	ASH1L	H3K36 méthyl-transférase
	dCbp	CBP	H3K27 acétyl-transférase
SWI/SNF Complex	Brm	BRM/BRG1	Remodeleur de la chromatine ATP-dépendant
	Osa	BAF250A/B	Possible fixation à l'ADN
	Mor	BAF155/170	Possible fixation à l'ADN et aux histones
	Snr1	BAF47	Possible fixation à l'ADN
	Sayp	BAF45A-D	Possible fixation à l'ADN
	Actin5C	β-ACTIN	
	Bap55	BAF53A/B	
	Bap180	BAF180/BAF200	Fixation aux histones
	Bap60	BAF60A-C	
Bap111	BAF57	Possible fixation à l'ADN	

Tableau 2 : Les principaux complexes TrxG et leurs constituants chez *D. melanogaster* et *H. sapiens*, adapté de Schuettengruber et al., 2017 (d'après Schuettengruber et al., 2017 ; Milne et al., 2010).

4) Les modifications post-traductionnelles des histones (PTM) ou marques d'histones

Les travaux de Vincent Allfrey dans les années 1960 ont montré que les histones sont modifiées post-traductionnellement (Allfrey et al., 1964). Il existe un grand nombre de modifications post-traductionnelles (PTM) différentes. Les extrémités N-terminales des histones (aussi appelées queues des histones) (Figure 2) sont des régions faciles d'accès au sein du nucléosome et qui peuvent entrer en contact avec les nucléosomes adjacents. Les modifications des queues des histones servent d'ancrage pour des protéines telles que des facteurs de transcription, des chaperonnes d'histones, des modificateurs de la chromatine et des remodeleurs de la chromatine (Hyun et al., 2017 ; Schuettengruber et al., 2017 ; Stillman et al., 2018). Des PTM d'histones existent aussi dans les domaines globulaires centraux des histones mais leur fonction est moins bien connue. Les PTM sont déposées ou enlevées respectivement par des protéines «writers» et «erasers» et reconnues de manière spécifique par des protéines «readers». Les principales PTM des queues d'histones sont des acétylations, méthylations et ubiquitinations de lysines. Il existe également d'autres modifications moins fréquentes des lysines (la sumoylation, la déamination, la β -N-acetylglucosamination, l'ADP ribosylation). De plus, d'autres acides aminés que des lysines peuvent être modifiés, en particulier par phosphorylation (Figure 5).

Dans les années 1990 émerge l'hypothèse que chaque marque d'histone délivre son propre message et que l'ensemble de ces marques sert de code épigénétique (Turner, 1993). Dans les années 2000, l'hypothèse du code histone est renforcée suite à différents travaux : différentes modifications sur une ou plusieurs queues d'histones agiraient de façon combinatoire ou séquentielle, et chacune de ces combinaisons aurait une fonction unique et

spécifique (Strahl and Allis, 2000 ; Jenuwein et Allis, 2001). Ces marques d'histones étant associées à l'état transcriptionnel des gènes, on les appelle marques répressives ou activatrices. Les modifications des histones exercent leurs effets par deux mécanismes principaux : (1) elles peuvent influencer directement la structure globale de la chromatine ; (2) elles peuvent réguler la liaison à la chromatine de molécules effectrices. Le rôle des PTM des histones a pu être testé en mutant des résidus particuliers des histones. Il a ainsi été montré que la méthylation de H3K27 était essentielle à la répression par les PcG et que celle de H3K9 était fondamentale pour la formation de l'hétérochromatine constitutive (Penke et al., 2016 ; Pengelly et al., 2013). En revanche, des marques d'histones associées à l'état actif des gènes ne sont pas essentielles pour l'expression de certains gènes sur lesquels elles sont présentes (Hödl et Basler, 2012).

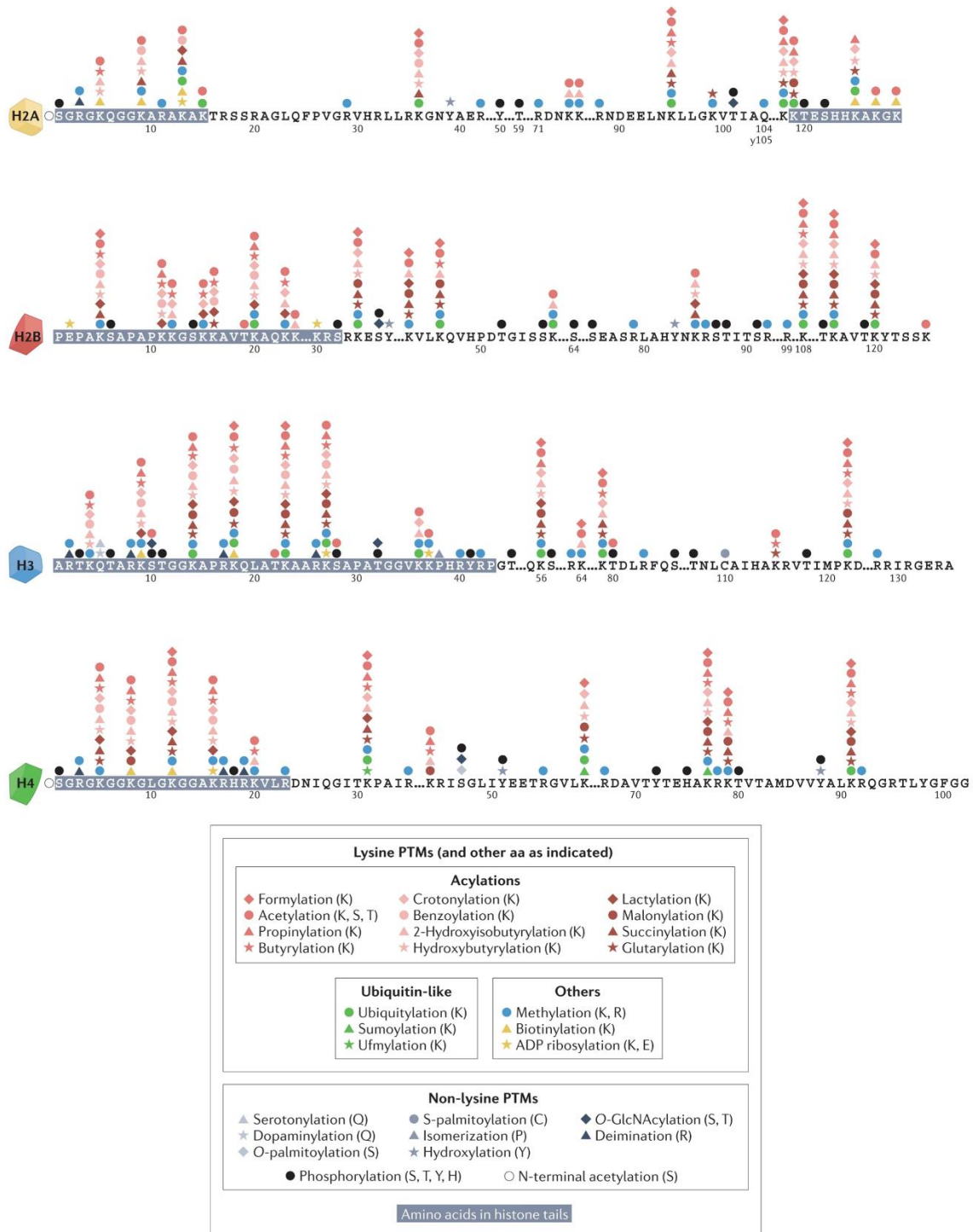


Figure 5 : Les différentes modifications post-traductionnelles (PTM) des histones ou marques d’histones. Séquences des histones H2A, H2B, H3, H4 montrant les différentes modifications post-traductionnelles. Les queues N-terminales des histones sont surlignées en gris. Les modifications les plus fréquentes sont la méthylation (rond bleu), l’acétylation (rond rouge) et la phosphorylation (rond noir). Plusieurs types d’acides aminés sont modifiables, même si ces modifications concernent majoritairement des lysines (K) (Millan-Zambrano et al., 2022).

a) PTM des histones et perturbations structurelles directes de la structure de la chromatine

L'acétylation et la phosphorylation de résidus réduisent la charge positive des histones, ce qui perturbe les interactions électrostatiques entre celles-ci et l'ADN. Ceci conduit à une structure moins compacte de la chromatine, facilitant ainsi l'accès à l'ADN de la machinerie transcriptionnelle (Bannister et Kouzarides, 2011). De ce fait, l'acétylation des queues des histones est considérée généralement comme une marque activatrice. De nombreuses lysines des histones peuvent être acétylées, les plus connues étant H3K9, H3K14, H3K18, H3K27, H4K5, H4K8 et H4K12 et H4K16 (Bannister et Kouzarides, 2011). Les acétylations multiples d'histones sont enrichies au niveau des enhanceurs et des promoteurs des gènes et facilitent l'accès aux facteurs de transcription (Shahbazian et Grunstein, 2007). Il y a beaucoup moins de sites phosphorylés que de sites acétylés. Des modifications sur un seul site peuvent être associées à des changements structurels importants au sein de la chromatine. Par exemple, la phosphorylation de H3S10 pendant la mitose se produit à l'échelle du génome entier et est associée à une plus grande condensation de la chromatine (Wei et al., 1998).

L'ubiquitination est une PTM beaucoup plus volumineuse que les autres (ajout d'un polypeptide de 76 acides aminés). Il est probable que cela induise un changement important dans la conformation globale du nucléosome et donc la structure de la chromatine. Deux sites ubiquitinés bien caractérisés se trouvent dans H2A et H2B. H2AK119ub1 est impliquée dans la répression transcriptionnelle des gènes (Wang et al., 2004), tandis que H2BK120ub joue un rôle important dans l'initiation et l'élongation de la transcription (Kim et al., 2009).

b) PTM des histones et régulation de la fixation de facteurs de la chromatine

La méthylation des lysines des histones a été décrite pour la première fois en 1964 (Murray, 1964). Il existe 3 niveaux de méthylation de la lysine, la mono-, di- et triméthylation (me1, me2 et me3). Les méthylation sont déposées par des lysine méthyl-transférases (KMT) et retirées par des lysine déméthylases (KDM). Contrairement à l'acétylation, la méthylation ne change pas la charge de la chaîne secondaire de l'acide aminé et n'a donc pas un effet direct sur la conformation du nucléosome. Les effets de la méthylation des lysines des histones sont dus à des protéines effectrices qui reconnaissent les sites méthylés (Musselman et al., 2014).

La méthylation des histones peut avoir des effets opposés sur l'état de la chromatine. En effet, certaines méthylation compactent la chromatine et répriment la transcription (méthylation de H3K9, H3K27 et H3K20) alors que d'autres permettent un accès plus facile à l'ADN et activent la transcription (méthylation de H3K4, H3K36 et H3K79) (Black et al., 2012). Plusieurs domaines protéiques reconnaissent les lysines méthylées. Il s'agit notamment des domaines « PHD finger » et de la famille "royale" des domaines Tudor, qui comprend les chromodomaines, les domaines Tudor, PWWP et MBT (Sanchez et Zhou 2011). Je vais parler plus en détails uniquement de la méthylation dans les paragraphes suivants car, pendant ma thèse, je me suis intéressé principalement à cette PTM en étudiant le rôle d'une histone méthyl-transférase et d'une histone déméthylase.

[i\) La marque H3K4me3](#)

La marque activatrice H3K4me3, de même que H3K4me2, est majoritairement localisée au niveau des promoteurs et des sites de début de transcription (TSS) des gènes actifs transcriptionnellement (Shilatifard, 2012). H3K4me1 est quant à elle enrichie sur les enhancers actifs (Figure 6) (Kim et Buratowski, 2009 ; Heintzman et al., 2007 ; Mikkelsen et al., 2007). Chaque niveau de méthylation de H3K4 est reconnu par des effecteurs

spécifiques qui régulent l'expression des gènes par des mécanismes tels que le remodelage de la chromatine ou le recrutement de facteurs de transcription. Par exemple, en condition de stress, la mono-méthylation de H3K4 permet de recruter différents remodeleurs de la chromatine (RSC ou Swr1) au niveau des gènes de réponse au stress, ce qui permet une réponse mieux ajustée (Nadal-Ribelles et al., 2015). Un exemple de facteur de transcription reconnaissant la marque H3K4me3 est TAFIID qui est recruté sur les promoteurs enrichis en cette marque grâce à sa sous-unité TAF3 et son domaine PHD. Ceci facilite la formation du complexe de pré-initiation de la transcription (Vermeulen et al., 2007 ; Lauberth et al., 2013).

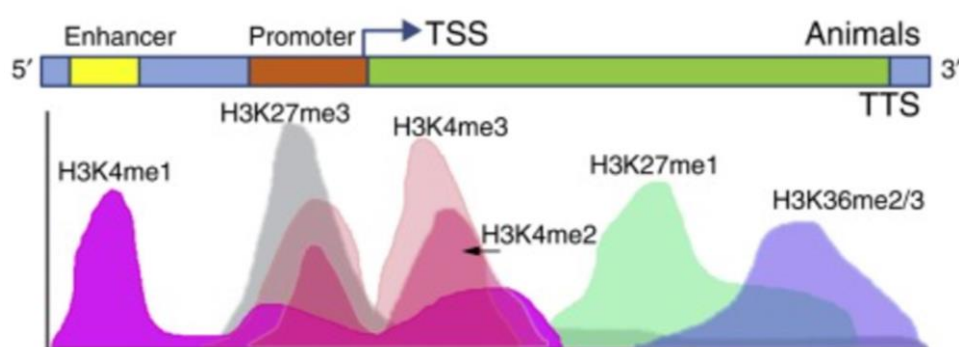


Figure 6: Distribution de certaines méthylations d'histones sur les gènes chez les animaux. Chaque méthylation est représentée par une couleur, la taille du pic représente la quantité de marque retrouvée dans chaque région (Xiao et al., 2016).

Les méthyl-transférases spécifiques de H3K4 ont d'abord été découvertes chez la levure qui en possède une seule, Set1, une protéine à domaine Set. Set1 agit au sein du complexe COMPASS « Complex of Proteins Associated with Set1 » responsable de la mono-, di- et tri-méthylation de H3K4 (Prunier et al., 2008 ; Kim et al., 2013). Chez *D. melanogaster* il existe trois homologues de Set1 nommés dSet1, Trithorax (Trx) et Trithorax-related (Trr) (Mohan et al., 2011).

Les méthylation de H3K4 étaient considérées comme stables et héréditaires avant la découverte de la première histone déméthylase chez l'humain, LSD1 (Shi et al., 2004). LSD1 et LSD2/KDM1B, peuvent déméthyliser H3K4me1 et H3K4me2 (Figure 7) (Ciccone et al., 2009 ; Shi et al., 2004). Chez *D. melanogaster*, il existe trois déméthylases de H3K4me3 qui sont Su(var)3-3/LSD1, KDM2 et Lid/KDM5. Même si ces déméthylases ont la même cible H3K4me3, elles régulent la transcription par des mécanismes différents (Liu et Secombe, 2015). Su(var)3-3 a été identifiée dans le complexe Brahma qui est responsable du remodelage de la chromatine pendant le développement (Tamkun, 1995). KDM2 a une activité déméthylase pour les marques H3K4me3 et H3K36me2 (Lagarou et al., 2008 ; Zheng et al., 2014). KDM2 a aussi un effet suppresseur de Trx et active la répression médiée par les PcG (Lagarou et al., 2008). Enfin Lid/KDM5, codée par le gène *little imaginal discs*, est une déméthylase spécifique de H3K4me3 (Lloret-Llinares et al., 2008 ; Lee et al., 2007). Il a été montré par ChIP-seq (immunoprécipitation de chromatine suivie de séquençage) que Lid se fixe au niveau du TSS des gènes du développement (Lloret-Llinares et al., 2012). Des expériences d'analyses de transcriptomes comparant des cellules de drosophile S2 déficientes pour Lid ou sauvage indiquent que Lid est impliquée, suivant ses cibles, dans l'activation ou la répression de la transcription, même si son rôle dans l'activation semble prépondérant (Liu et al., 2014).

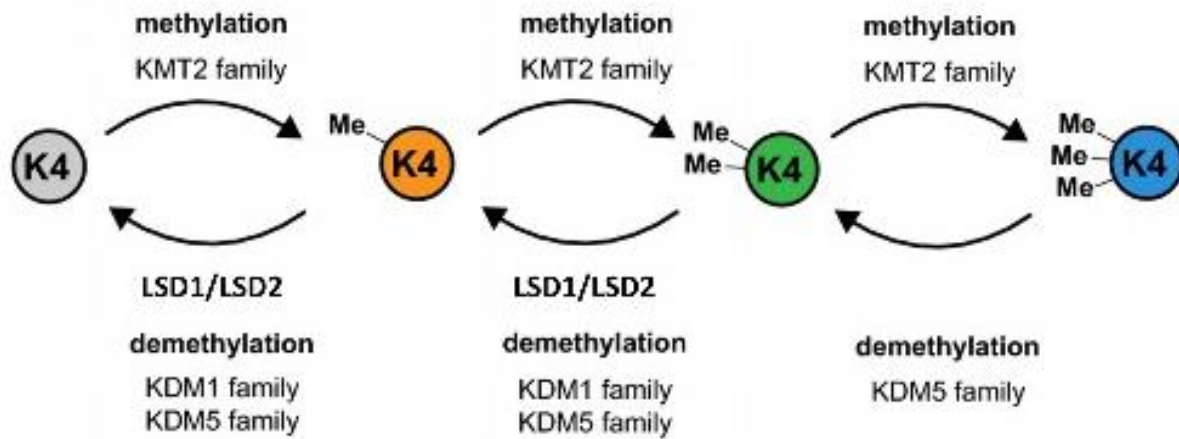


Figure 7 : Les méthyl-transférases et déméthylases de H3K4 chez l'homme. Schéma des réaction de méthylation et déméthylation chez l'homme. Toutes les méthylations sont faites par les membres de la famille des KMT2. La famille KDM5 peut déméthyle tous les états de méthylation alors que la famille KDM1 retire H3K4me1/2 (Collins et al., 2019).

ii) La méthylation de H3K27

La marque H3K27me3 est une marque cruciale pour la répression transcriptionnelle. Elle est présente au niveau des promoteurs des gènes (Figure 6). C'est la marque de la répression médiée par les complexes PcG. Chez la drosophile, elle est déposée par la méthyl-transférase Enhancer of zeste (E(z)) qui est l'unité catalytique du complexe PcG PRC2 apposant les trois niveaux de méthylation de H3K27 (Cao et al., 2002 ; Czermin et al., 2002 ; Müller et al., 2002). La fixation du complexe PcG PRC1 sur les régions enrichies en H3K27me3 permet la propagation de cette marque sur les nucléosomes voisins, assurant le maintien de la répression transcriptionnelle (Margueron et al., 2009 ; Hansen et al., 2008 ; Yuan et al., 2012). Un exemple du rôle de H3K27me3 dans la maintenance de la répression est l'inactivation d'un des deux chromosomes X chez les femelles mammifères. Dans ce processus, un long ARN non-codant, Xist, recrute PRC2 qui dépose la marque H3K27me3 et permet de stabiliser la chromatine dans un état transcriptionnellement inactif (Simon et al., 2013 ; Engreitz et al., 2013). La déméthylation de H3K27me3 est réalisée par l'histone déméthylase UTX qui existe chez la drosophile et les mammifères (Herz et al., 2010 ; Smith

et al., 2008). La perte de fonction totale d'UTX est létale et les individus mutants présentent des défauts d'expression des gènes HOX notamment (Herz et al., 2010 ; Copur et Müller 2013).

iii) La méthylation de H3K9

La méthylation de H3K9 est définie comme un indicateur de la répression de la transcription et d'une chromatine très condensée (Barski et al., 2007). Chez la levure, l'enzyme KMT1 est responsable des trois niveaux de méthylation de H3K9 (Nakayama et al., 2001). Chez la drosophile, il existe trois enzymes capables de méthyler ce résidu, Su(var)3-9, Eggless/dSETDB1 et DG9A (Czermin et al., 2001 ; Schultz et al., 2002 ; Tachibana et al., 2001). La marque H3K9me3 est reconnue par la protéine HP1. HP1 induit la compaction de la chromatine et la répression transcriptionnelle par différents mécanismes tels que le recrutement d'autres protéines de l'hétérochromatine, ou des petits ARN (Ninova et al., 2019 ; Tatsumi et al., 2018 ; Holoch and Moazed, 2015).

iv) La méthylation de H3K79

A la différence des méthylations présentées précédemment, la méthylation de H3K79 se trouve dans la zone globulaire de l'histone H3. Elle est catalysée par une méthyl-transférase, Dot1, qui n'a pas de domaine SET (Nguyen et Zhang 2011). Dot1 a été identifiée initialement chez la levure (Singer et al., 1998) mais elle est conservée évolutivement et possède notamment un homologue chez la drosophile, Grappa (Gpp) (Mohan et al., 2010). H3K79 peut être mono-, di- ou tri-méthylée. On retrouve la marque H3K79me_{2/3} sur le corps des gènes transcriptionnellement actifs, avec un pic au niveau du TSS puis une diminution progressive le long du corps du gène (Marson et al., 2008 ; Huff et al., 2010 ; Wang et al., 2008). De plus, des études chez *D. melanogaster* ont montré que H3K79me₃ est un marqueur des enhancers actifs pendant l'embryogenèse, et que la présence de cette marque est essentielle au bon fonctionnement des enhancers (Bonn et al., 2012 ; Godfrey et al.,

2019). Plusieurs études ont montré que le niveau global de méthylation de H3K79 change au cours de la transition G1/S et que la disparition de cette marque en G2 implique l'activité d'une lysine déméthylase (Sawada et al., 2004 ; Feng et al., 2002). Des expériences sur les modèles cellulaires mammifères ont montré que KDM2B avait une activité déméthylase sur la marque H3K79me3 (Kang et al., 2018).

c) Le dialogue entre marques d'histones

Le nombre conséquent de PTM des histones permet un contrôle très spécifique de la structure de la chromatine et des mécanismes associés à celle-ci. Mais il existe un niveau de complexité supérieur dû à l'interaction entre les différentes PTM. En effet, certaines PTM peuvent agir en synergie ou être nécessaires pour la mise en place d'autres PTM (Figure 8). Ces interactions entre PTM peuvent se produire par le biais de plusieurs mécanismes. Il peut s'agir d'une compétition pour un même site de modification, ce qui est le cas pour les lysines qui peuvent être acétylées, méthylées ou ubiquitinées comme par exemple la lysine 9 de l'histone 3. Un autre mécanisme est l'interaction au niveau du nucléosome entre différentes PTM. Par exemple, la méthylation de H3K79 par Dot1 est stimulée très fortement par la présence des marques H2B120ub et H4K16ac qui modifient la structure du nucléosome (Valencia-Sanchez et al., 2021). Une PTM peut aussi modifier une interaction entre le nucléosome et une protéine qui s'y fixe. C'est le cas de la protéine HP1a qui ne reconnaît plus, pendant la mitose, la marque H3K9me2/3 à cause de la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone 3 (H3S10) (Fischle et al., 2005). Enfin il peut y avoir une coopération entre plusieurs PTM permettant le recrutement plus efficace de certains facteurs. Ainsi, PHF8, une histone lysine déméthylase spécifique de H3K4me3, interagit plus fortement avec la chromatine lorsque sur la même histone H3K9 et H3K14 sont acétylées (Vermeulen et al., 2010).

Il existe aussi une interaction entre l'ADN méthylé et les PTM. La méthylation d'ADN peut empêcher la fixation d'une protéine sur une PTM. Ainsi KDM2A se fixe sur la marque H3K9me3 uniquement lorsque l'ADN n'est pas méthylé (Bartke et al., 2010). D'autres travaux ont montré que les PTM et la méthylation de l'ADN peuvent aussi s'influencer, rendant la compréhension de ces interactions entre marques plus complexe (Zhang and Reinberg, 2001 ; Fischle et al., 2003).

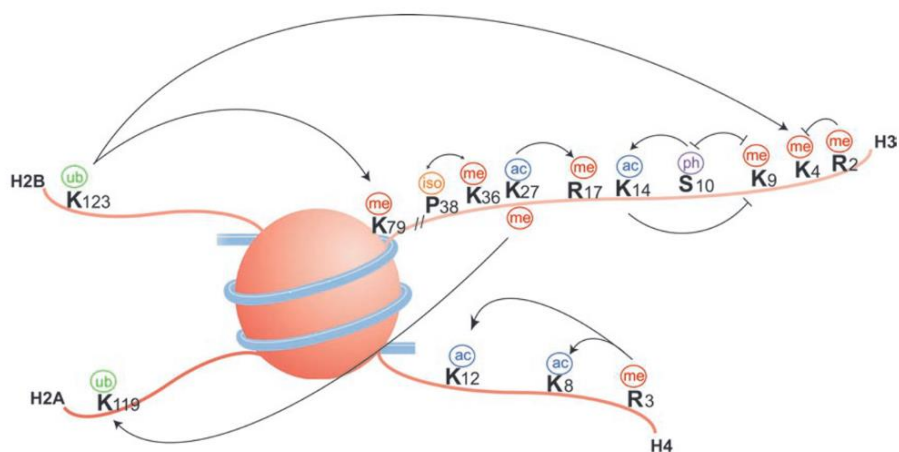


Figure 8 : Exemples d'interactions entre marques d'histones. Les interactions positives entre marques sont indiquées par une flèche et les interactions négatives par un trait (Bannister et Kouzadires, 2011).

5) Implication des ARN non codants dans la compaction de la chromatine

Beaucoup d'ARN non codants sont impliqués dans la régulation de la chromatine en permettant le recrutement de protéines intervenant dans la structure de la chromatine (Liu et al., 2017 ; Mishra et Kanduri, 2019). C'est en particulier le cas de certains longs ARN non codants (lncRNA) (Ransohoff et al., 2018). Un des exemples les plus étudiés est le lncRNA Xist impliqué dans l'inactivation d'un des deux chromosomes X chez les femelles mammifères (Pinheiro et Heard, 2017). Xist s'étend sur le chromosome X à partir duquel il

est transcrit et induit rapidement une disparition de la machinerie transcriptionnelle sur les gènes qu'il recouvre. Ensuite, Xist recrute le complexe PcG PRC2 pour déposer la marque H3K27me3 et réprimer de manière durable l'expression des gènes (Simon et al., 2013 ; Engreitz et al., 2013). Le rôle essentiel de Xist dans l'inactivation du chromosome X a été prouvé par des travaux montrant que des cellules différenciées retrouvent une conformation active du chromosome X lors d'une déplétion de l'ARN Xist (Minajigi et al., 2015). L'inactivation du chromosome X est un exemple qui illustre bien le dialogue entre les différents acteurs de la compaction de la chromatine. En effet, le chromosome X inactivé est caractérisé par la disparition des marques activatrices H3K4me3 et H3K36me3, l'apparition des marques répressives H3K27me3, H3K9me3, H2AK129ub1 et un fort niveau de méthylation de l'ADN aux niveaux des îlots CpG (Pour revue Brockdorff et al., 2020). De plus, les niveaux d'accessibilité de la chromatine aux facteurs de transcription et aux protéines insultrices sont réduits (Pour revue Brockdorff et al., 2020). Chez la drosophile, de longs ARN non codants sont impliqués dans la compensation de dose du chromosome X chez les mâles. En effet, les mâles sur-expriment les gènes de leur unique chromosome X pour compenser la dose deux fois plus faible de ce chromosome par rapport aux femelles. Dans ce système, le complexe MSL (Male Specific Lethal) est recruté sur le chromosome X des mâles et, grâce à sa sous-unité MOF, dépose la marque H4K16ac qui augmente la transcription des gènes du chromosome X (Akhtar et al., 2000). Deux ARN non codants, RNA on X 1 (RoX1) et RNA on X 2 (RoX2), permettent l'adressage du complexe MSL sur le chromosome X des mâles (Meller et Rattner, 2002). Des petits ARN non codants participent également à la régulation de la structure de la chromatine. C'est le cas chez la drosophile des « PIWI-interacting RNA » (piRNA). Les piRNA sont impliqués dans la répression des transposons. Les ARN issus des transposons sont reconnus par homologie de séquence par des piRNA chargés par la protéine PIWI, ce qui induit le recrutement de la méthyl-

transférase Eggless (Sienski et al., 2015 ; Yu et al., 2015). Eggless réalise la méthylation des résidus H3K9 au niveau des transposons puis recrute HP1 pour compacter la chromatine et empêcher ainsi la transcription des transposons (Figure 9) (Moshkovich and Lei, 2010).

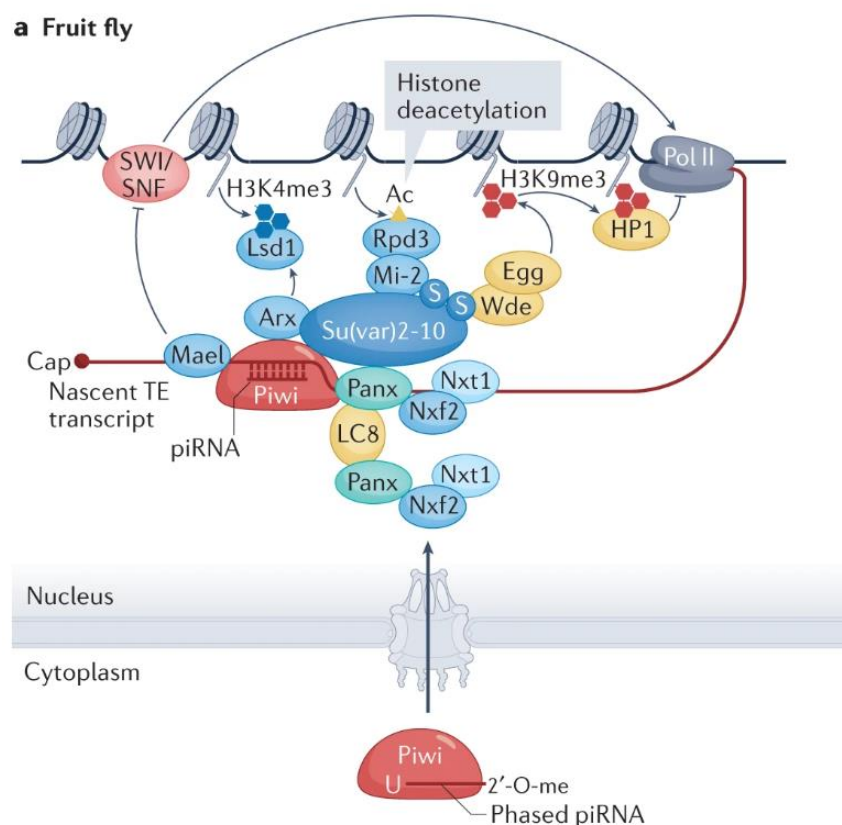


Figure 9 : Régulation des éléments transposables (TE) par les piRNA chez *D. melanogaster*. Les piRNA guident PIWI vers les transcrits des TE. Dans les cellules somatiques, le recrutement par PIWI de certains facteurs comme Maelstrom (Mael) réprime la transcription des TE en recrutant le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF. Dans les cellules germinales et somatiques, Piwi recrute Asterix (Arx) qui recrute le complexe Panoramic (Panx)-Nxf2-Nxf3 auquel se fixe Su(var)2-10. Su(var)2-10 recrute à son tour la méthyl-transférase Eggless (Egg) qui dépose la marque H3K9me3. HP1 se fixe sur la marque H3K9me3, permettant la compaction de la chromatine et la répression transcriptionnelle des TE (Wang et al., 2023).

En conclusion, tous ces acteurs modifient la chromatine et en changeant les propriétés physiques, la structure et l'accès à l'ADN. Ils permettent donc d'établir différents états de la chromatine.

III) Les différents états de la chromatine

Historiquement, la chromatine est divisée en deux grands états, l'euchromatine et l'hétérochromatine, qui correspondent aux régions respectivement actives et inactives transcriptionnellement. Lors de la dernière décennie, plusieurs études ont utilisé de nouvelles approches pour décrire plus précisément les états de la chromatine, en se basant sur les combinaisons de marques d'histones et de protéines. Une première étude chez *D. melanogaster* a décrit la distribution de 53 protéines fixées à la chromatine dans des cellules Kc167 par la technique de DamID (« DNA adenine methyltransferase identification ») (Filion et al., 2010). Ce travail a permis de définir 5 états de chromatine. Par la suite, d'autres études intégrant des résultats d'expériences d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP-seq) ont décrit 7, 9 et 17 catégories différentes de chromatine se regroupant en 5 grands états (Figure 10) (Karchenko et al., 2010 ; Ho et al., 2014 ; Marshall et Brand, 2017). Parmi ces 5 états, 3 étaient déjà bien connus et décrits dans la littérature : la chromatine active associée aux protéines TrxG (chromatine « rouge »), la chromatine répressive associée aux protéines PcG (chromatine « bleue ») et l'hétérochromatine constitutive associée à HP1 retrouvée principalement dans les régions centromériques et répétées (chromatine « verte »). Le 4^{ème} état est la chromatine « jaune » qui est un second état actif de la chromatine associé à des gènes du métabolisme et aux gènes de ménages (Filion et al., 2010). Enfin, la chromatine « noire » est une chromatine transcriptionnellement inactive qui ne possède aucune des marques et protéines trouvées dans les autres états de la chromatine (Filion et al., 2010).

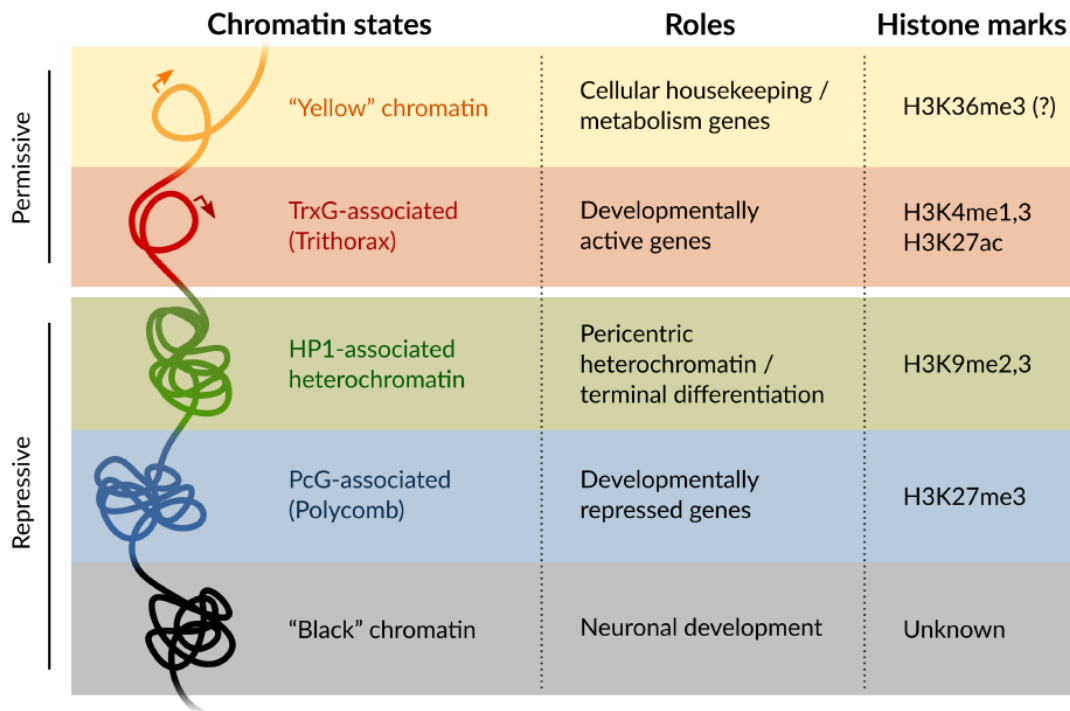


Figure 10 : Les différents états de la chromatine chez *D. melanogaster*. Les chromatines « jaune » et « rouge » sont permissives à la transcription tandis que les chromatines « verte », « bleue » et « noire » correspondent à des régions transcriptionnellement inactives. Chaque état est caractérisé par la présence de marques d’histones et de protéines de la chromatine particulières (Delandre et Marshall, 2019).

1) Les trois états de l’hétérochromatine

a) L’hétérochromatine « verte » associée à HP1

L’hétérochromatine associée à HP1 correspond aux régions de l’hétérochromatine constitutive, très condensées dans le génome. Cet état de chromatine induit une répression de l’expression des gènes et cela est mis en évidence par l’analyse de réarrangements chromosomiques relocalisant des gènes au voisinage de l’hétérochromatine constitutive (Schotta et al., 2003). Cependant, il existe quelques gènes naturellement inclus dans l’hétérochromatine constitutive qui ont besoin de cet environnement pour s’exprimer correctement (Lu et al., 2000). L’hétérochromatine associée à HP1 s’étend sur de vastes régions du génome dans les cellules différenciées chez les mammifères et *D. melanogaster*

(Marshall et Brand, 2017). Un rôle important de cet état pourrait être de bloquer la différenciation des cellules. En effet, chez la drosophile, de nombreux gènes actifs dans les noyaux suprachiasmiques (NSC) sont sous forme de chromatine TrxG « rouge ». C'est le cas notamment de gènes codant des facteurs de transcription jouant un rôle clé dans le destin cellulaire. Ces gènes sont réprimés par établissement d'une hétérochromatine « verte » associée à HP1 dans les neurones mature après différenciation (Marshall et Brand, 2017). L'hétérochromatine associée à HP1 empêche également la réactivation des gènes impliqués dans la pluripotence pendant l'induction des cellules souches pluripotentes (Chen et al., 2013 ; Lister et al., 2011).

b) L'hétérochromatine « bleue » associée aux protéines PcG

L'hétérochromatine « bleue » est formée par deux complexes PcG principaux: PRC2 (Polycomb repressive complex 2) et PRC1 (Polycomb repressive complex 1). Cette chromatine est depuis longtemps associée à la régulation de gènes du développement comme les gènes HOX (Beuchle et al., 2001). De façon surprenante, très peu de gènes sont régulés par la chromatine PcG. En effet, chez la drosophile, environ 2% du génome seulement contient la marque H3K27me3 et est fixé par des protéines PcG (Schwartz et al., 2006). Ceci suggère que la chromatine PcG a des fonctions très précises, notamment pour la régulation de l'expression de facteurs de transcriptions impliqués dans la régulation de gènes du développement (Schwartz et al., 2006 ; Schertel et al., 2015). L'idée la plus communément admise est que cette chromatine régulerait les principaux facteurs de transcription et les gènes impliqués dans les changements du destin cellulaire (Mohn et al., 2008 ; Bracken et al., 2006). Mais d'autres travaux suggèrent qu'elle pourrait avoir d'autres rôles comme le contrôle de l'expression de gènes impliqués dans le maintien des lignées neuronales (Marshall et Brand, 2017).

c) L'hétérochromatine « noire »

L'hétérochromatine « noire » est la plus abondante puisqu'elle recouvre 48% du génome chez la drosophile. De plus, elle recouvre des domaines plus longs que les autres types d'hétérochromatine (Filion et al., 2010). Son rôle reste obscur mais des études récentes chez la drosophile ont montré que beaucoup de gènes neuronaux sont réprimés par cette chromatine au stade larvaire et que ces gènes passent dans un état permissif à la transcription pendant la différenciation des neurones immatures. Les neurones différenciés ne possèdent quasiment plus de chromatine « noire » (Marshall et Brand, 2017). Ces résultats suggèrent donc que cet état pourrait exister pendant le développement et serait ensuite remplacé dans les cellules différenciées par de l'hétérochromatine HP1 pour réprimer les gènes de différenciation.

2) Les deux états de l'euchromatine

Trois études ont permis de diviser en deux états la chromatine permissive, ou euchromatine. La chromatine TrxG « rouge » est associée aux marques H3K4me1/2/3 et H3K27ac et aux protéines TrxG qui sont présentes sur les gènes actifs transcriptionnellement, en particulier les gènes du développement et les gènes impliqués dans le destin cellulaire (Filion et al., 2010 ; Van Bemmelen et al., 2013 ; Marshall et Brand, 2017). La chromatine « jaune » est associée principalement à des gènes impliqués dans le cycle cellulaire et le métabolisme basal (les gènes « de ménage ») (Filion et al., 2010). Elle est moins enrichie en protéines TrxG que la chromatine « rouge », avec notamment l'absence totale du remodelleur de la chromatine Brahma (Brm). En revanche, on y trouve un enrichissement de la marque H3K36me3 et de la protéine MRG15 qui la reconnaît et aide à son dépôt (Filion et al., 2010 ; Van Bemmelen et al., 2013).

3) Dynamique des états de la chromatine

La chromatine change dynamiquement d'état en réponse à des facteurs de développement et à l'environnement des cellules. C'est par exemple le cas chez la drosophile au cours de la différenciation des cellules souches neurales en neurones matures (Figure 11) (Marshall et Brand, 2017). L'architecture 3D de la chromatine change aussi durant le développement neural des cellules souches pluripotentes. La chromatine est plus accessible dans les cellules souches embryonnaires (ESC) et se condense lors de la différenciation en cellules progénitrices des neurones (NPC) (Meshorer et al., 2006). Des études sur l'accessibilité de la chromatine ont montré des changements pendant la différenciation neurale (Frank et al., 2015 ; Fraser et al., 2015 ; Preissl et al., 2018). Ainsi, pendant la différenciation des ESC en NPC, les frontières des TAD ne changent pas mais les interactions inter-TAD, entre la chromatine et les TAD et les boucles de chromatines sont modifiées (Fraser et al., 2015 ; Dixon et al., 2015). Ces résultats soulignent l'importance de la dynamique de la chromatine dans les processus développementaux. Mais l'importance des TAD dans la régulation de l'expression des gènes est controversée, comme le montre une étude chez la drosophile utilisant des chromosomes balanceurs pour perturber l'organisation des TAD (Ghavi-Helm et al., 2019). En effet, les réarrangements chromosomiques des chromosomes balanceurs affectent la taille et la topologie des TAD. Pour comprendre l'effet de ces réarrangements sur les TAD, les frontières des TAD de chromosomes sauvages et balanceurs ont été comparées par des expériences de capture de conformation de chromosome (Hi-C). Les frontières de 12% des TAD sont perdues ou déplacées de plus de 25kb dans les chromosomes balanceurs. Mais l'expression des gènes présents dans ces TAD est très peu modifiée : pour les gènes présents dans les 10kb autour d'une frontière perturbée, seuls 12% ont leur expression modifiée (Ghavi-Helm et al., 2019). Dans cet exemple, la perturbation de l'organisation des TAD n'a donc que peu d'effet sur l'expression des gènes.

Ce dynamisme de la chromatine permet au génome de s'adapter et de répondre rapidement à des variations de l'environnement.

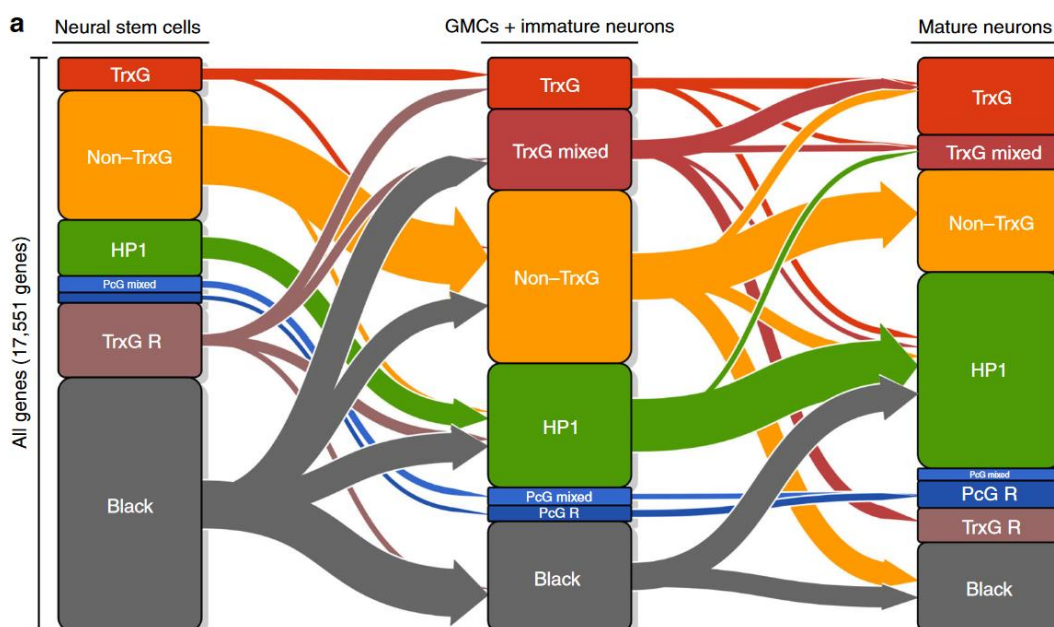


Figure 11 : Dynamique des états chromatinien pendant le développement neural. La taille des barres de chacune des couleurs est proportionnelle au nombre de gènes pour chacun des états chromatinien. Les flèches indiquent les changements d'état au cours de la différenciation des cellules souches neurales en neurones. La chromatine « noire », très abondante dans les cellules souches, diminue pendant la différenciation. La dynamique inverse est observée pour la chromatine « verte » (Marshall et Brand, 2017).

IV) Effet de l'environnement sur l'état de la chromatine

De nombreux exemples chez différents organismes montrent que l'environnement peut agir sur la structure de la chromatine en faisant intervenir plusieurs mécanismes comme la modification de la méthylation de l'ADN ou des PTM des histones. Ainsi, chez les mammifères, des études pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à l'obésité, au diabète et à la NASH (stéato-hépatite non alcoolique) se sont intéressées aux effets d'une alimentation riche en graisse sur le foie des souris (Leung et al., 2014). Après avoir soumis des souris à un régime riche en graisse, le niveau de compaction de la chromatine du foie a été mesuré par FAIRE-seq (« Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements »). Le nombre de régions décondensées augmente, induisant une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et la voie de l'insuline qui pourrait, chez l'homme, participer au développement de pathologies (Leung et al., 2014).

Chez l'abeille *Apis mellifera*, l'environnement agit sur l'état de la chromatine au cours des processus développementaux chez les ouvrières. Les ovaires de celles-ci sont atrophiés sous l'effet d'une hormone produite par la reine, la QMP (« Queen Mandibular Pheromone ») (Hover et al., 2003). Lorsque les ouvrières ne sont plus en présence de QMP, les niveaux chromatinien de PRC2, PRC1 et TAC (un complexe du groupe TrxG) augmentent et la distribution de la marque H3K27me3 change (Figure 12) (Duncan et al., 2020). Par ailleurs, l'inactivation au cours du développement larvaire de la méthyl-transférase DNMT3, impliquée dans la méthylation de l'ADN, conduit à un développement en reines de larves qui auraient dû normalement se métamorphoser en ouvrières (Kucharski et al., 2008). La méthylation de l'ADN est donc nécessaire pour le développement des larves en ouvrières. Dans la ruche, le phénotype « reine » est obtenu en nourrissant les larves avec de la gelée royale. L'alimentation induit donc une reprogrammation du transcriptome larvaire. Pour

comprendre le rôle de la méthylation de l'ADN dans ce processus, les méthylomes de cerveaux d'ouvrières et de reines, aux stades larves ou adultes, ont été comparés. Parmi les 6086 gènes méthylés chez la larve, 2399 ont un profil de méthylation différent entre reines et ouvrières. Parmi les gènes enrichis en méthylation chez l'ouvrière se trouvent des gènes codant des hormones impliquées dans la détermination de castes comme l'hormone juvénile et l'insuline. Certains gènes méthylés présentent des différences d'épissage entre reine et ouvrière (Foret et al., 2012).

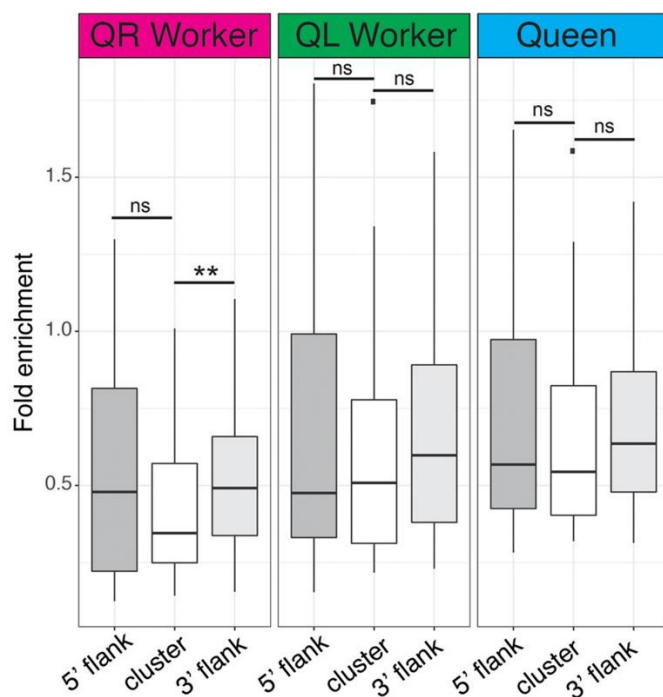


Figure 12 : Distribution de la marque H3K27me3 sur les gènes d'ouvrières *Apis mellifera* en présence ou absence de la reine. Chez des ouvrières en présence de reine (« QR Worker »), la marque H3K27me3 est enrichie dans la région 3' des gènes. Cet enrichissement n'est pas observé chez des ouvrières en absence de reine (« QL Worker ») (Duncan et al., 2020).

Chez la fourmi *Temnothorax rugatulus*, l'acétylation des histones est nécessaire pour le développement des ovarioles des ouvrières (Choppin et al., 2021). Lorsque la reine meurt, les ouvrières développent leurs ovaires et pondent des œufs. Le développement des ovaires et la fécondité d'ouvrières privées de reine ont été analysés en absence ou en présence d'un inhibiteur de l'acétylation (C646) ou de la désacétylation (TSA) des histones. Le traitement avec les deux drogues induit une diminution de la fécondité des ouvrières ce qui indique qu'un changement de la structure de la chromatine est nécessaire pour permettre aux ouvrières de se reproduire à la mort de la reine. De plus ces ouvrières traitées au C646 partagent avec des ouvrières naturellement stériles de nombreux gènes sur-exprimés.

Ces exemples, ainsi que d'autres chez différents organismes, montrent que l'environnement (cellulaire ou de l'organisme) module la structure de la chromatine et l'expression des gènes par différents mécanismes. Cette plasticité transcriptionnelle participe à la capacité d'un génotype donné à produire des phénotypes distincts adaptés à leur environnement. On appelle ce phénomène la plasticité phénotypique (Pugliucci, 2001).

Chapitre 2 - La plasticité phénotypique

I) Définition de la plasticité phénotypique

Les conditions environnementales sont fluctuantes dans la nature et les organismes peuvent s'adapter à ces changements de différentes façons. Dans les populations, des changements de fréquences alléliques peuvent avoir lieu sous l'effet de la sélection naturelle au cours des générations successives. Cependant cette évolution prend un certain temps et les changements environnementaux peuvent être rapides et avoir lieu au cours de la vie d'un individu. La plasticité phénotypique permet de répondre directement à une modification de l'environnement. Elle se définit comme « la propriété d'un génotype donné à produire des phénotypes différents en réponse à des conditions environnementales distinctes » (Pigliucci, 2001). La plasticité phénotypique est observée chez de nombreuses espèces aussi bien végétales qu'animales (Pfennig et al., 2010). Des exemples de facteurs environnementaux pouvant induire une réponse plastique sont la nutrition, la température, la présence de prédateurs ou la densité de la population (Figure 13) (Leung et al., 2014 ; Gibert et al., 2016 ; Argawal et al., 1999 ; Moczek et al., 2011). Par exemple, la plante *Ranunculus aquatilis* produit des feuilles de formes différentes si elles se développent dans l'eau ou à l'air. Les salamandres tigrées (*Ambystoma tigrinum*) se métamorphosent, perdent leurs branchies et développent des poumons si leur environnement aquatique devient inhabitable en cas d'assèchement. Chez certains amphibiens, si la densité dans la marre est trop importante, certains têtards vont développer un phénotype carnivore et se nourrir d'autres têtards.

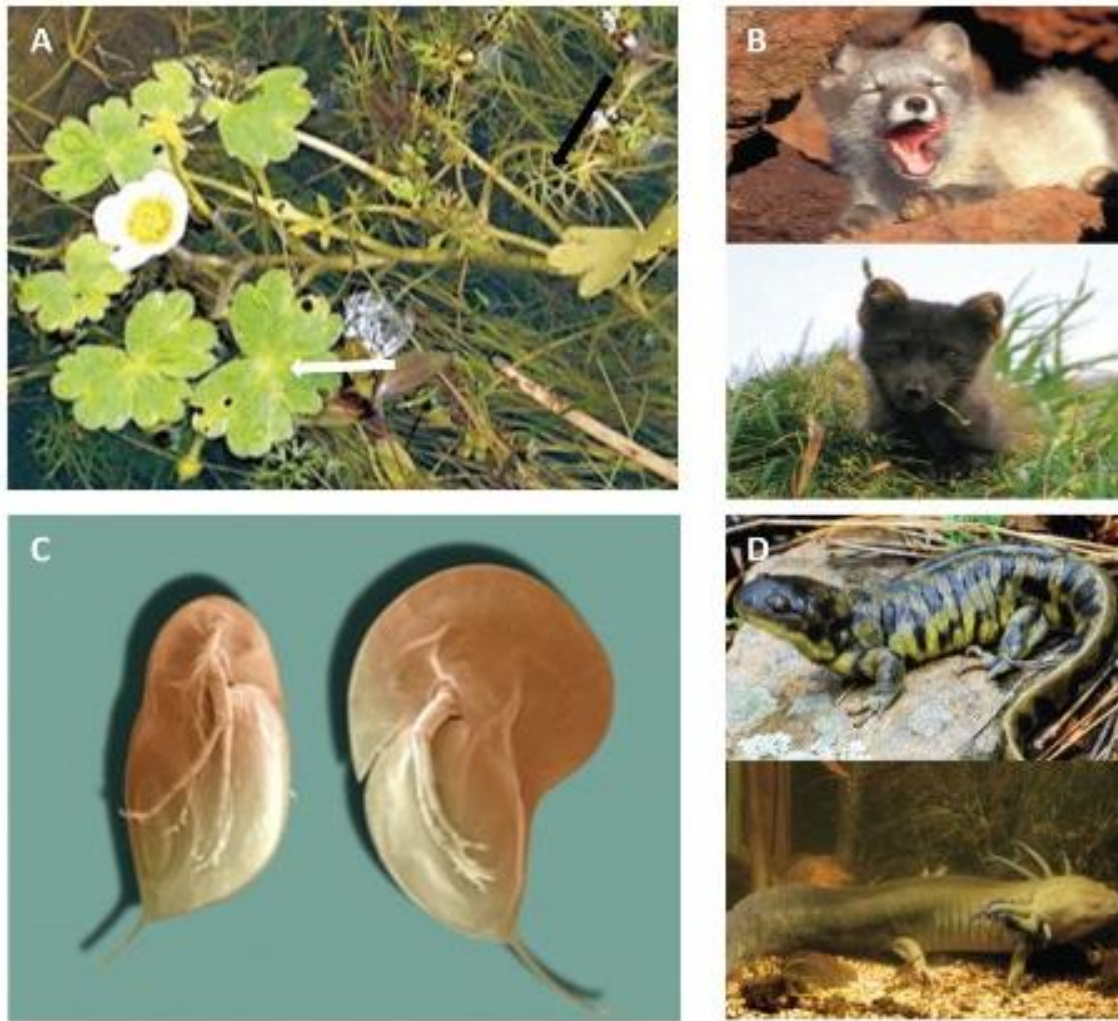


Figure 13 : Exemples de plasticité phénotypique. A) La renoncule *Ranunculus aquatilis* a des feuilles dont la forme est différente lorsqu'elles sont produites dans l'eau (flèche noire) ou dans l'air (flèche blanche). B) Le renard polaire *Vulpes lagopus* change de couleur de pelage en fonction des saisons. Il arbore un pelage blanc pendant l'hiver (haut) et un pelage marron foncé pendant l'été (bas). C) La daphnie *Daphnia longicephala* développe une crête protectrice et une longue épine caudale en présence de son prédateur *Notonecta* (droite). D) La salamandre tigre *Ambystoma tigrinum* a des branchies (bas) qu'elle perd en absence d'eau (haut) (Moczek et al., 2011).

Dans la plupart des cas, la plasticité phénotypique a un rôle adaptatif. Elle permet à un même génotype de produire des phénotypes différents qui sont optimaux dans leurs environnements respectifs. Mais elle peut aussi dans certains cas être une réponse mal-adaptative ou non-adaptative (Smith-Gill, 1983; Stearns, 1989). La plasticité phénotypique est souvent impliquée dans la réponse à des variations de l'environnement prédictibles comme les fluctuations saisonnières. Un exemple de cette réponse concerne les renards

polaires (*Vulpes lagopus*) qui changent de couleur et de texture de fourrure pendant les différentes saisons (Figure 13) (Moczek et al., 2011). La plasticité phénotypique permet donc d'améliorer la « fitness » des individus en augmentant leur survie et leur reproduction (la « fitness » d'un individu est mesurée par la proportion de ses descendants qui atteignent la maturité et peuvent se reproduire). Mais la plasticité phénotypique permet aux individus d'avoir des niches écologiques plus vaste (Schneider et Meyer, 2017).

II) Les différents types de plasticité phénotypique

La plasticité phénotypique peut-être continue c'est-à-dire que les variations du phénotype sont progressives (Stearns, 1989). Par exemple, chez les femelles drosophiles, la pigmentation abdominale diminue progressivement quand la température pendant le développement augmente (Gibert et al., 2000). A l'inverse, la plasticité phénotypique peut-être discontinue lorsqu'elle permet de produire un ou plusieurs phénotypes discrets sans formes intermédiaires. On parle aussi dans ce cas de polyphénisme (Nijhout, 2003). On observe de la plasticité discontinue chez beaucoup d'insectes sociaux qui ont plusieurs castes. Un exemple est la différenciation des larves de l'abeille *Apis mellifera* en reine ou en ouvrière. Des différences dans l'alimentation des larves (gelée royale fournie ou non à un certain stade de développement) induisent deux phénotypes distincts, ouvrière ou reine, sans phénotype intermédiaire (Kucharski et al., 2008). La plasticité phénotypique peut aussi être aussi flexible, c'est-à-dire que les phénotypes sont réversibles. C'est le cas du changement saisonnier du pelage du renard polaire qui a lieu tous les ans. De manière opposée, la plasticité phénotypique peut aussi être qualifié d'inflexible, dans ce cas le phénotype est irréversible. C'est le cas de la plasticité développementale comme par

exemple la pigmentation abdominale chez les femelles *Drosophila melanogaster* qui est irréversible une fois les adultes éclos (Gibert et al., 2000 ; Debat et David, 2001).

III) Quantification de la plasticité phénotypique : les normes de réaction

Pour étudier la plasticité phénotypique, un outil essentiel est la norme de réaction. La norme de réaction représente les phénotypes produits par un génotype donné en fonction de l'environnement (Figure 14) (Woltereck, 1909). La norme de réaction est tracée sous la forme d'une courbe pour chacun des génotypes étudiés. Lorsqu'il s'agit de droites, les pentes des courbes permettent de déterminer si le génotype (G), l'environnement (E) et/ou l'interaction entre le génotype et l'environnement (GxE) ont un effet sur le phénotype (Figure 14). Pour comparer deux génotypes entre eux, il faut comparer les deux courbes. Lorsque les deux courbes sont parallèles et horizontales, cela signifie que la différence de phénotype est uniquement due à la différence de génotype (Figure 14 A). Dans ce cas, le phénotype n'est pas plastique. Lorsque les deux courbes sont parallèles mais non horizontales, cela signifie que le phénotype change en fonction du génotype et de l'environnement, mais que la réponse des deux génotypes à l'environnement est identique (Figure 14 B). Il y a une plasticité du phénotype, mais elle est la même pour les deux génotypes. Par contre si les courbes ne sont pas parallèles, les deux génotypes répondent différemment à l'environnement, il y a une interaction entre génotype et environnement (Figure 14 C). Cela veut dire qu'il y a une différence de plasticité phénotypique entre les deux génotypes. On analyse les normes de réactions à l'aide de tests statistiques d'analyse de variance (ANOVA).

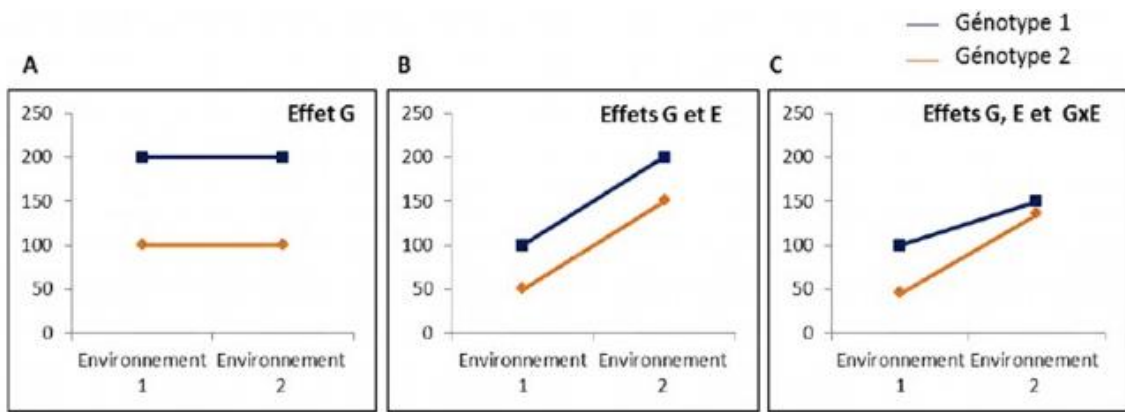


Figure 14 : Principe d'analyse des normes de réaction. La courbe bleue représente le génotype contrôle (Génotype 1) et la courbe orange le génotype mutant (Génotype 2). A. Exemple de l'effet du génotype uniquement. B. Exemple de l'effet du génotype et de l'effet de l'environnement. C. Exemple de l'effet du génotype, de l'environnement et d'une interaction entre le génotype et l'environnement traduisant une différence de plasticité phénotypique entre les deux génotypes (G : génotype, E : environnement, GxE : interaction entre le génotype et l'environnement) (D'après Pigliucci 2001).

IV) Plasticité phénotypique et évolution

La plasticité phénotypique permet de produire des phénotypes différents entre les individus d'une même espèce qui peuvent ressembler aux phénotypes observés entre différentes espèces. Depuis le 19^{ème} siècle et la mise en évidence de la plasticité phénotypique, plusieurs études se sont intéressées au rôle joué par celle-ci dans les processus d'évolution des espèces.

Le premier exemple de plasticité a été présenté par James Baldwin en 1896, sous le nom d'« effet Baldwin », bien que le terme plasticité n'ait pas été explicitement utilisé dans sa publication. L'« effet Baldwin » propose que la capacité d'un organisme à apprendre et à s'adapter à de nouveaux environnements puisse potentiellement influencer sa condition physique et, par conséquent, le processus de sélection naturelle (Baldwin, 1896). En 1909, Richard Woltereck a étudié l'effet de la concentration de nutriments sur le phénotype de plusieurs lignées de Daphnies. Il a constaté que les lignées avaient des morphologies différentes dans un même environnement, mais cette modification de morphologie pouvait

aussi être observée pour une même lignée placée dans différents environnements. Il a représenté ces effets de l'environnement en un graphe, qu'il a appelé « Reaktionorm » ou norme de réaction (Woltereck, 1909). Malgré cette découverte, Woltereck a néanmoins commis une erreur d'interprétation en ne faisant pas de distinction entre le génotype et le phénotype lors de ses observations. En 1911, le généticien Wilhelm Johannsen a réintroduit le concept de la norme de réaction. Il a été le premier à faire une distinction théorique et expérimentale entre les bases génétiques qui composent un individu, le génotype, et l'expression de ce génotype qui conduit à l'ensemble des caractères observables chez un organisme dans un environnement spécifique, le phénotype (Johannsen, 1911). L'idée d'une possible interaction entre l'environnement et le génotype pour la production du phénotype était née. Cependant, l'effet de l'environnement sur le phénotype n'a pas été réellement pris en compte dans la théorie synthétique de l'évolution. Pendant le XXème siècle très peu de chercheurs s'y sont intéressés. En 1952, Waddington a démontré chez la drosophile que des caractères induits initialement dans un environnement spécifique (dans son cas par la température) pouvaient être fixés dans la population par l'assimilation génétique. Ces nouveaux caractères étaient ensuite maintenus dans la population en l'absence du facteur environnemental initial (Waddington, 1952). Néanmoins, il a été montré quelques années plus tard que l'assimilation génétique n'est possible que lorsqu'il y a de la variation génétique au sein de la population (notamment des mutations initialement cryptiques, c'est à dire ne produisant pas de phénotype sans changement environnemental) (Bateman, 1959). De récentes études ont également démontré que des mutations causées par l'environnement peuvent jouer un rôle dans le processus d'assimilation génétique (Fanti et al., 2017). La découverte de l'assimilation génétique par Waddington, qui permet de stabiliser un phénotype initialement induit par l'environnement, a des implications significatives en biologie évolutive. Quelques années plus tard en 1965, le concept de

plasticité phénotypique est proposé par Anthony Bradshaw suite à son étude sur l'effet des variations de l'environnement sur les plantes (Bradshaw, 1965). Il a ainsi écrit : "La mesure dans laquelle les expressions des caractéristiques d'un génotype sont modifiées par différents environnements est une mesure de la plasticité de ces caractères. La plasticité est montrée par un génotype lorsque son expression est capable d'être modifiée par les influences de l'environnement" (Bradshaw, 1965). Anthony Bradshaw a été le premier à soutenir que différents traits d'un même génotype peuvent présenter différentes formes de plasticité en réponse à des conditions environnementales variées et être régulés par des mécanismes génétiques (Bradshaw, 1965).

Plus récemment, en 2003, Mary Jane West-Eberhard a proposé l'hypothèse du « Flexible stem » (West-Eberhard, 2003). Selon cette hypothèse, dans certains cas, une espèce ancestrale plastique pourrait donner naissance à des lignées présentant des phénotypes divergents et stables. En effet, cette espèce ancestrale plastique, en réponse à son environnement, aurait généré des phénotypes alternatifs qui auraient ensuite été stabilisés et fixés dans la population par assimilation génétique. Cette hypothèse postule un rôle significatif de la plasticité dans le processus d'évolution et de diversification des espèces, en particulier par le phénomène de radiation adaptative (Figure 15) (Schneider et Meyer, 2017). Ce type de radiation adaptative se caractérise par une diversification rapide des espèces à partir d'une espèce ancestrale plastique. Ce processus évolutif est favorisé notamment lorsque de nouveaux habitats deviennent disponibles (Schneider et Meyer, 2017).

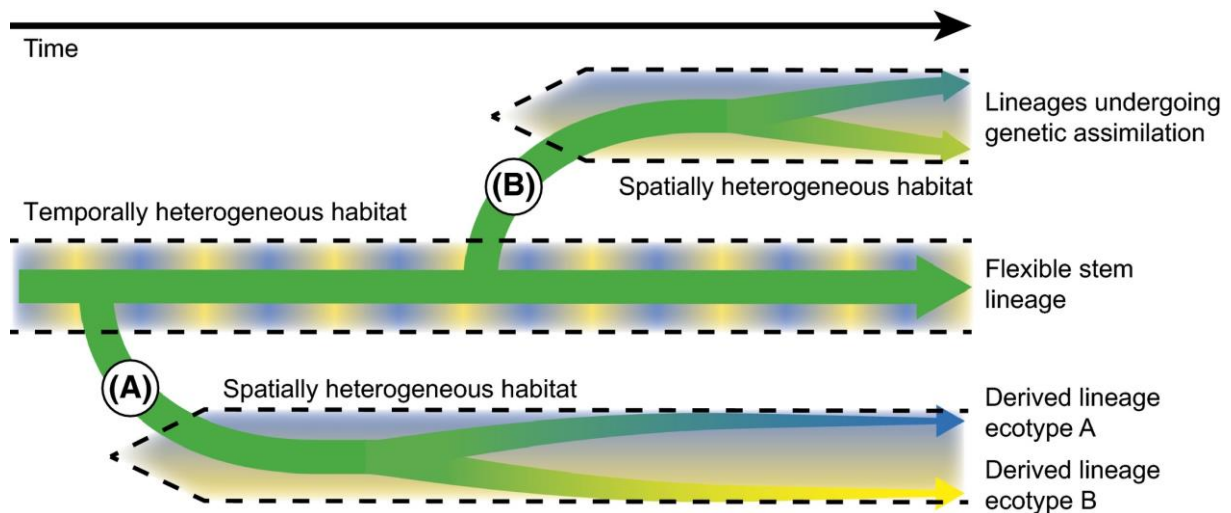


Figure 15 : L'hypothèse du « Flexible stem ». Une espèce ancestrale vivant dans un environnement dont les conditions fluctuent temporellement montre de la plasticité phénotypique. En A) et (B) des populations de cette espèce se trouvent séparées dans des environnements spatialement hétérogènes. Elles produisent des phénotypes différents par plasticité phénotypique en réponse à ces environnements. Dans le cas où la « fitness » des phénotypes est élevée, ces phénotypes divergents peuvent être renforcés et fixés par assimilation génétique (Schneider and Meyer, 2017).

Depuis la publication de l'hypothèse du « Flexible stem », plusieurs études ont montré que cette hypothèse ou une de ses variantes, appelée « Plasticity first evolution », pouvait expliquer l'évolution de certaines populations ou espèces. La tête de jeunes serpents de l'espèce « *Notechis scutatus* » a été comparée dans sept populations isolées sur des îles depuis 9000 ans à 40 ans. L'augmentation de la taille du crâne chez les serpents isolés depuis peu de temps est due à la plasticité phénotypique, alors que celle des populations isolées depuis longtemps est due à des changements génétiques (Aubret et al., 2009). En 2005, Mary Jane West-Eberhard propose une nouvelle théorie selon laquelle l'environnement aurait dans certains cas un rôle plus important sur le développement que la génétique. Les gènes agiraient plutôt comme des « suiveurs » que des « leaders » dans le processus de l'évolution des caractères (West-Eberhard, 2005). Selon cette hypothèse, l'« accommodation phénotypique » est un mécanisme adaptatif des individus face à l'hétérogénéité de leur environnement, conduisant à un nouveau phénotype, et qui ne nécessite pas de modifications génétiques (West-Eberhard, 2005). Cet ajustement peut

prendre différentes formes, telles que des adaptations physiologiques, comportementales ou morphologiques. Un exemple spectaculaire est celui du développement d'une chèvre dépourvue de pattes avant et ayant uniquement ses deux pattes arrières. Elle avait adopté une posture de locomotion bipède et développé des comportements et spécialisations morphologiques similaires à ceux des kangourous et des autres mammifères bipèdes (le fait de bondir rapidement en réponse à une perturbation, une colonne vertébrale courbée, une nuque très large, un élargissement des pattes arrières) (Slijper, 1942 ; West-Eberhard, 2005). Ce type d'accommodation a aussi été observé chez des babouins paralysés des pattes avant (West-Eberhard, 2005). Après avoir subi une adaptation et une sélection, il est possible qu'une « accommodation génétique » se produise si des variations génétiques apparaissent et contribuent à l'établissement de ce nouveau phénotype. Dans son ensemble, ce processus participe à l'évolution des espèces (West-Eberhard, 2005).

V) Coûts et limites de la plasticité phénotypique

Il existe des coûts et des limites à la plasticité phénotypique (Tableau 3). Ces contraintes empêchent les organismes d'avoir une plasticité maximale conduisant à la « fitness » la plus forte (Auld et al., 2010; Murren et al., 2015). Les limites sont définies comme les phénotypes les plus optimum qui ne sont jamais atteints par un individu (Dewitt et al., 1998; Murren et al., 2015). Les coûts sont les problèmes et défauts de « fitness » que présente un individu plastique comparé à un individu robuste lors d'un changement de phénotype lié à l'environnement.

Coûts de la plasticité phénotypique	Coût de maintien : énergie nécessaire au maintien des mécanismes sensoriels et régulateurs
	Coût de production : coût nécessaire à la production du phénotype plastique
	Coût d'acquisition de l'information : énergie utilisée pour détecter les variations de l'environnement au détriment d'autres fonctions
	Coût de l'instabilité développementale : coût lié à l'ensemble des erreurs de développement en réponse aux changements
	Coût génétique : coût dû aux effets négatifs de loci impliqués dans la plasticité
Limites de la plasticité phénotypique	Limite développementale : capacité des spécialistes à produire plus de phénotypes extrêmes que les plastiques
	Limite de fiabilité de l'information : mauvaise évaluation des variations de l'environnement
	Limite de latence : temps nécessaire entre la détection du changement environnemental et la production du nouveau phénotype
	Limites épiphénotypiques : détection tardive des conditions environnementales changeantes qui a pour conséquence la production d'un phénotype inadapté au nouvel environnement

Tableau 3 : Résumé des coûts et limites de la plasticité phénotypique. Adapté de Dewitt et al., 1998.

Les contraintes et limites majeures de la plasticité phénotypique se rapportent à la façon dont l'information environnementale est perçue par l'organisme pour que le phénotype obtenu dans ce milieu soit optimal. Par exemple, les lièvres variables *Lepus americanus* vivent en majorité dans les forêts boréales américaines (Canada et Etats-Unis). Ils ont un pelage blanc en hiver pour se camoufler sur la neige et muent au printemps pour arborer un pelage brun. La transformation de leur pelage est liée au changement de la durée du jour. Aujourd'hui, dans ces régions, il y a une diminution de la quantité de neige et de la période d'enneigement à cause du réchauffement climatique. Les lièvres se retrouvent donc plus visibles pour leurs prédateurs en hiver ce qui impacte leur « fitness ». Cette fluctuation de l'environnement (la longueur des jours) n'est donc plus une information robuste et sûre pour prédire la présence de neige (Figure 16) (Mills et al., 2013 ; Zimova et al., 2016).

A**B****C****D**

Figure 16 : Limite de la fiabilité de l'information : exemple du lièvre variable. Le lièvre variable peut changer de couleur de pelage en fonction de son environnement. A) Lièvre variable avec son pelage blanc en hiver. B) Lièvre variable avec son pelage brun en été. C et D) Lièvre variable avec un pelage blanc alors qu'il n'y a plus de neige, le changement de couleur de pelage en fonction de la durée des jours n'est donc plus adaptif dans le contexte du réchauffement climatique (Mills et al., 2013).

VI) Les bases génétiques et moléculaires de la plasticité phénotypique

1) Gènes de la plasticité

Pendant longtemps, la question de l'existence de « gènes de la plasticité » a fait débat. En 1995, l'existence de ces gènes est acceptée communément (Via et al., 1995). Deux effets génétiques, la « sensibilité allélique » et la présence de « gènes régulateurs » ont été proposés pour expliquer les mécanismes génétiques associés à la plasticité phénotypique. Les gènes dont l'expression est modulée par l'environnement sont associés à la « sensibilité allélique ». Les gènes dont l'activité de régulation est modulée par l'environnement, ce qui module donc la régulation de leurs cibles, sont qualifiés de « gènes régulateurs » (Via et al., 1995). Cependant ces deux catégories peuvent fusionner, par exemple dans le cas d'un gène codant un facteur de transcription dont l'expression serait modulée par l'environnement. Pour identifier les « gènes de la plasticité », des études à l'échelle du génome entier ont été réalisées en utilisant deux types d'approches expérimentales. La première a consisté en la recherche de « Quantitative Trait Loci » (QTL) ayant des effets différents sur le phénotype en fonction de l'environnement (Bergland et al., 2008; ; Yadav et al., 2016). Pour la seconde approche, des analyses de transcriptomes ont été réalisées pour trouver des gènes impliqués dans des phénotypes plastiques dont l'expression est modulée par l'environnement. C'est ce qui a été fait chez le papillon *Junonia coenia* dont la pigmentation des ailes varie en fonction des saisons. La comparaison des transcriptomes de papillons développés dans des conditions saisonnières différentes a permis d'identifier des gènes de la pigmentation exprimés différemment dans les disques d'aile des deux morphes (Daniels et al., 2014).

2) Rôle des modifications épigénétiques et des voies hormonales dans la plasticité phénotypique

Comme détaillé plus haut (chapitre 1, IV), plusieurs exemples chez différentes espèces montrent que des mécanismes épigénétiques modifiant la structure de la chromatine sont impliqués dans la réponse des individus à l'environnement. Par ailleurs, dans certains cas, ces modifications épigénétiques sont transmises à la descendance sur plusieurs générations (Klosin et al., 2017 ; Casier et al., 2019). Par exemple, chez *D. melanogaster*, l'activité d'un « cluster » producteur de piRNA peut être induite par une forte température pendant le développement des individus et transmise aux cours des générations successives (Casier et al., 2019).

La modulation des voies hormonales est également souvent impliquée dans la plasticité phénotypique. C'est notamment le cas chez des insectes via des mécanismes liés à l'ecdysone, l'hormone juvénile ou l'insuline. Ainsi, chez le papillon *Bicyclus anynana*, la température affecte le taux d'ecdysone, ce qui modifie la pigmentation des ailes (Figure 17A) (Monteiro et al., 2015). Chez les insectes, la voie insuline est nécessaire à la croissance et au développement. Si les individus ne sont pas assez nourris, cette voie est inactivée et la croissance des organes ainsi que la taille du corps est réduite. Chez la drosophile *D. melanogaster*, les organes génitaux des mâles ne répondent pas à cette carence nutritionnelle et sont insensibles à la voie insuline à cause de l'expression très faible de Foxo, une cible négative de la voie insuline (Tang et al., 2011).

Chez les vertébrés, des mécanismes hormonaux sont aussi impliqués dans certains cas de plasticité phénotypique. Chez les amphibiens, la croissance et la vitesse de développement des têtards dépendent en grande partie de la production d'hormones comme l'hormone thyroïdienne (Shi, 2013 ; Kulkarni et al., 2012). En cas de sécheresse des étangs, chez certaines espèces, un phénomène d'accélération de la métamorphose est déclenché. Pour

trois de ces espèces, cette plasticité est due à une variation des taux d'hormone thyroïdienne et des corticostéroïdes (Figure 17B, C) (Kulkarni et al., 2017). Un autre exemple chez les mammifères est celui du hamster russe ou *Phidopus sungorus*. Celui-ci a en hiver un pelage blanc et en été un pelage brun, en réponse à la durée des jours et l'ensoleillement différents qui modifient la sécrétion d'hormones stéroïdes et de prolactine (Duncan et Goldman, 1984).

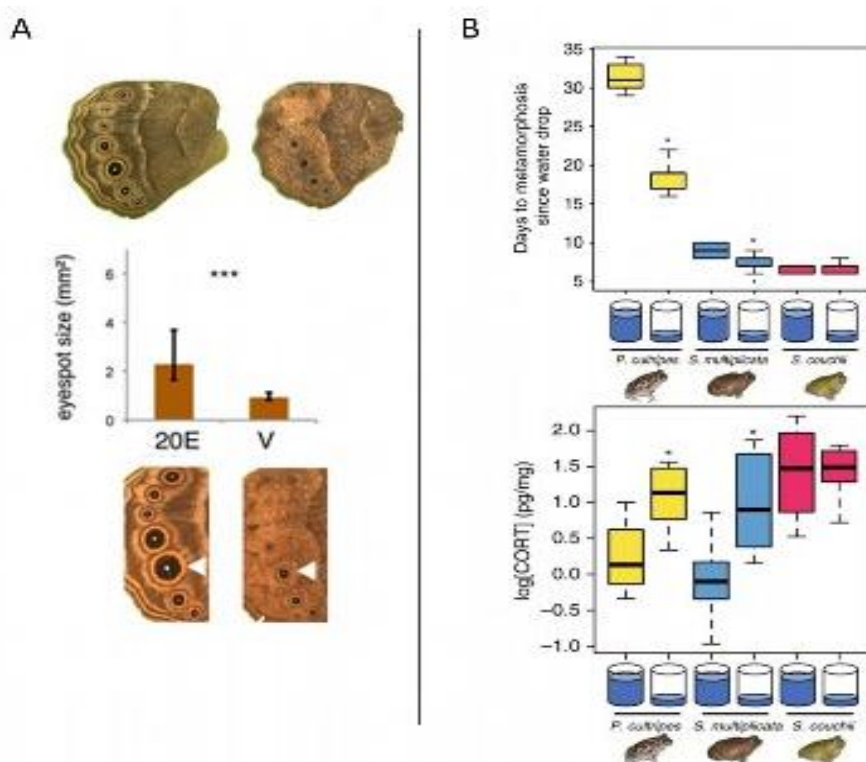


Figure 17 : Exemples de plasticité phénotypiques liés a des mécanismes hormonaux. A) Chez le papillon *Bicyclus anynana*, les ailes de papillons nés pendant la saison chaude (haut, à gauche) ont de plus grands ocelles que celles de papillons nés pendant une saison moins chaude (haut, droite). L'injection d'ecdysone (20E) permet l'apparition d'ocelles sur les ailes de papillons développés en saison peu chaude (20E: bas, gauche ; V: bas, droite, contrôle négatif). L'augmentation de la concentration d'ecdysone mise en évidence en cas de développement à température plus élevée est

donc impliquée dans la formation des ocelles (Monteiro et al., 2015). (B) Chez les amphibiens *P. cultripipes* et *S. multiplicata* la vitesse de développement augmente en condition de sécheresse alors qu'elle reste constante et très rapide chez *S. couchii* (haut). Le taux de corticoïdes (CORT) est plus élevé en condition de sécheresse chez *P. cultripipes* et *S. multiplicata*. Il est très élevé quelles que soient les conditions chez *S. couchii* (Kulkarni et al., 2017).

Les mécanismes hormonaux et épigénétiques ne sont pas forcément exclusifs et peuvent contribuer ensemble dans certains exemples de plasticité phénotypique. Ainsi, chez l'abeille *Apis mellifera*, la différenciation entre castes implique des modifications de la méthylation de l'ADN de gènes impliqués dans différents processus médiés par l'hormone juvénile ou l'insuline (Foret et al., 2012).

3) Autres mécanismes impliqués dans la plasticité phénotypique

La plasticité phénotypique n'est pas nécessairement liée à des mécanismes épigénétiques ou hormonaux. Chez certaines espèces d'oiseaux, les différences de coloration du plumage, notamment la présence de plumes rouges, oranges ou jaunes, dépendent de l'alimentation. En effet les pigments caroténoïdes incorporés dans le plumage sont issus directement de la nourriture. Les caroténoïdes issus de l'alimentation peuvent aussi être transformés en autres caroténoïdes (Lopes et al., 2016 ; Toomey et al., 2017 ; Price, 2006). Le plumage du pinçon du Michigan est jaune ou rouge en fonction de la présence dans l'alimentation de certains caroténoïdes (Figure 18A) (Price, 2006). Un second exemple est celui des chats siamois dont le pelage est blanc sur tout le corps sauf aux extrémités dont le pelage est noir. Chez ce chat, une mutation dans le gène codant la tyrosinase impliquée dans la synthèse de mélanine rend l'enzyme thermosensible (Lyons et al., 2005). A cause de cette sensibilité à la température, la tyrosinase n'est active que dans les parties les plus froides du corps, c'est-à-dire les extrémités. Dans ces parties du corps (oreilles, pattes, museau et queue), la synthèse

de mélanine conduit donc à une pigmentation noire. Le pelage des parties du corps plus chaudes n'est pas pigmenté car l'enzyme est inactive (Figure 18B) (Lyons et al., 2005).



Figure 18 : Exemples de plasticité phénotypique dus à des mécanismes non épigénétiques et non hormonaux. A) Deux pinçons du Michigan dont l'alimentation est pauvre (gauche) ou riche (droite) en certains caroténoïdes (Price, 2006). B) Chez le chat siamois, le pelage présente une pigmentation noire uniquement au niveau des extrémités comme le museau ou les oreilles. Ceci est dû à une mutation dans le gène codant la tyrosinase qui l'a rendue thermosensible. Celle-ci est active uniquement dans les zones plus froides du corps, c'est-à-dire les extrémités (Lyons et al., 2005).

Chapitre 3 - Mon modèle d'étude : la pigmentation abdominale des femelles *D. melanogaster* et sa plasticité thermique

Pour mieux comprendre comment l'environnement peut affecter le développement en modulant l'expression de réseaux de gènes, je me suis intéressé au cours de ma thèse à la plasticité thermique de la pigmentation abdominale chez les femelles *D. melanogaster*. Ce caractère présente l'intérêt d'être directement observable et a été l'objet de nombreuses études concernant son établissement au cours du développement, son dimorphisme sexuel ou sa variation intra- et inter-spécifique. Dans la nature, la pigmentation abdominale des femelles *D. melanogaster* montre de la variation génétique, surtout dans les deux derniers segments (A6 et A7) (Kopp et al., 2003; Robertson et al., 1977). C'est par ailleurs un phénotype plastique, sensible à différentes modifications de l'environnement comme la température et la nutrition (Gibert et al., 2000; Shakhmantsir et al., 2014).

I) Les gènes de pigmentation chez *D. melanogaster*

La pigmentation abdominale est due à la présence de pigments présents dans la cuticule. La cuticule est sécrétée par l'épiderme et est formée au stade pupal. Les précurseurs des pigments sont synthétisés dans les cellules épidermiques puis sont transportés dans la cuticule où les pigments sont produits dans les quelques heures après l'éclosion. Les enzymes impliquées dans les voies de biosynthèse des pigments sont codées par des gènes appelés gènes de pigmentation. La pigmentation abdominale est sexuellement dimorphique.

Les mâles ont l'abdomen postérieur (A5 et A6) entièrement noir, tandis que chez les femelles tous les segments sont jaunes avec une bande noire sur le bord postérieur (Figure 19) (Jeong et al., 2006).

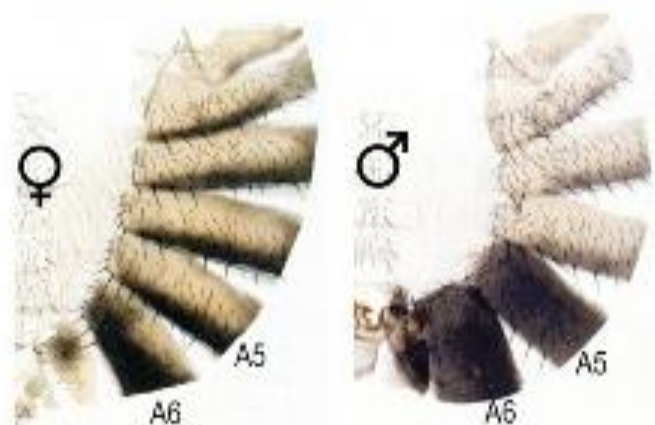


Figure 19 : Dimorphisme sexuel de la pigmentation abdominale chez *D. melanogaster*. (Jeong et al., 2006).

1) La voie de biosynthèse des pigments

La pigmentation de la cuticule est due à la présence de trois pigments : un pigment jaune (la N β AD-sclérotine) et les dopamine-mélanines brune et noire (Wittkopp et al., 2003; pour revue, True, 2003). Ces trois pigments sont synthétisés par une voie de biosynthèse dont le précurseur est la tyrosine (Figure 20). La tyrosine est assimilée par les cellules épidermiques puis transformée en DOPA (dihydroxyphenylalanine) par la tyrosine hydroxylase (TH) codée par le gène *pale* (Riedel et al., 2011). La DOPA est ensuite modifiée en dopamine par la Dopa Décarboxylase (DDC). La dopamine peut être métabolisée dans deux voies différentes pour produire les trois types de pigments. Substrat de la Laccase 2, elle permet de produire la dopamine-mélanine noire grâce à l'enzyme Yellow et la dopamine-mélanine brune par une voie enzymatique non connue. Convertie en N- β -alanyl dopamine (N β AD) par Ebony, elle conduit à la synthèse de N β AD-sclérotine jaune. Dans

cette voie, l'action d' Ebony est réversible. En effet, l'hydrolase Tan est antagoniste d' Ebony et transforme le N β AD en dopamine, ce qui augmente la synthèse de dopamine-mélanines brune et noire (Riedel et al., 2011; True et al., 2005; Wittkopp et al., 2003).

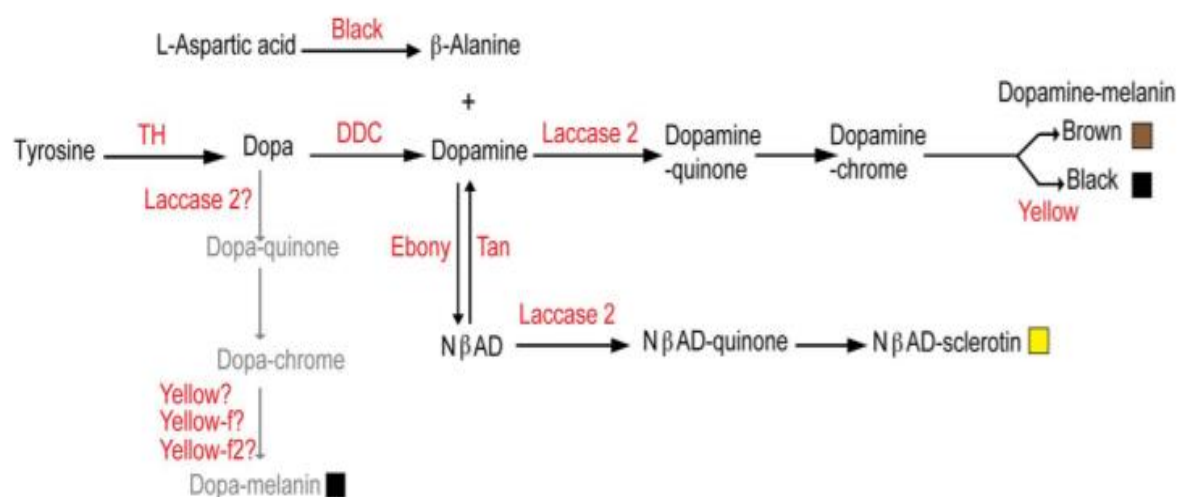


Figure 20 : Voie de biosynthèse des pigments de la cuticule abdominale de *D. melanogaster*. Différentes enzymes (en rouge) sont nécessaires à la synthèse des pigments de la cuticule, bruns, noirs ou jaunes. Ces enzymes sont codées par des gènes du même nom, appelés gènes de la pigmentation. En gris est représentée la voie de synthèse d'une autre mélanine noire, la Dopa-mélanine, peu abondante (Gibert et al., 2017).

2) Expression des gènes de pigmentation

Les gènes de pigmentation qui ont été les plus étudiés sont *tan* (*t*), *yellow* (*y*), *ebony* (*e*) et *Ddc*. Ces gènes sont exprimés à des stades différents du développement et dans différentes régions des segments abdominaux.

Le gène *Ddc*, qui permet la synthèse de dopamine, est exprimé dès le milieu du stade pupal, de manière uniforme dans tous les segments (Figure 21A). Son expression est régulée dans l'épiderme par des séquences cis-régulatrices présentes en amont de son promoteur et dans son deuxième intron (Grover et al., 2018).

Le gène *yellow* code l'enzyme permettant la synthèse de la dopamine-mélanine noire. Deux autres enzymes, *Yellow-f* et *Yellow-f2*, ont la même activité, mais leur expression dans l'épiderme abdominal n'est pas connue (Han et al., 2002). Le maximum d'expression de *yellow* est observé en fin de vie pupale, chez les mâles et les femelles, dans la région postérieure noire des segments et dans les segments A5 et A6 des mâles qui sont uniformément noirs (Figure 21B) (Hinaux et al., 2018 ; Jeong et al., 2006; Wittkopp et al., 2003). L'expression de *yellow* dans l'abdomen est régulée par un enhancer appelé « *y-wing-body element* » (Jeong et al., 2006).

Le gène *tan*, qui participe à la synthèse des mélanines brune et noire, est exprimé à partir de la fin du stade pupal jusqu'à deux heures après l'éclosion, dans tous les segments du mâle et la femelle, mais plus fortement dans les segments postérieurs (Figure 21C) (Gibert et al., 2016 ; Jeong et al., 2008). Dans l'épiderme abdominal des mâles et des femelles, son expression est régulée par un enhancer appelé *t-MSE* (Gibert et al., 2016; Jeong et al., 2008). Il existe de la variation génétique dans le *t-MSE* qui affecte la pigmentation abdominale des femelles (Bastide et al., 2013 ; Gibert et al., 2017b).

Le gène *ebony*, impliqué dans la production des pigments jaunes, est exprimé juste après l'éclosion dans la région antérieure jaune des segments (Figure 21D). L'analyse de lignées rapportrices a montré que le patron d'expression d'*ebony* est contrôlé par plusieurs éléments régulateurs : un enhancer en amont du promoteur (*eAct*), un silencer à proximité du promoteur (*eMS*) qui réprime l'expression d'*ebony* dans A5 et A6 chez les mâles et un silencer intronique qui réprime *ebony* dans les régions postérieures des segments (*eSS*) (Reibeiz et al., 2009). Récemment il a été montré que *eAct* joue également le rôle de silencer d'*ebony* dans la ligne médiane dorsale (Akiyama et al., 2022). Récemment un autre enhancer abdominal dans le premier intron d'*ebony* (*eIn.4*) redondant avec *eAct* a été identifié et les deux silenciers ont été plus précisément délimités et leurs rôles sur la régulation de

l'expression d'*ebony* confirmés en les supprimant expérimentalement (Méndez-González et al., 2023).

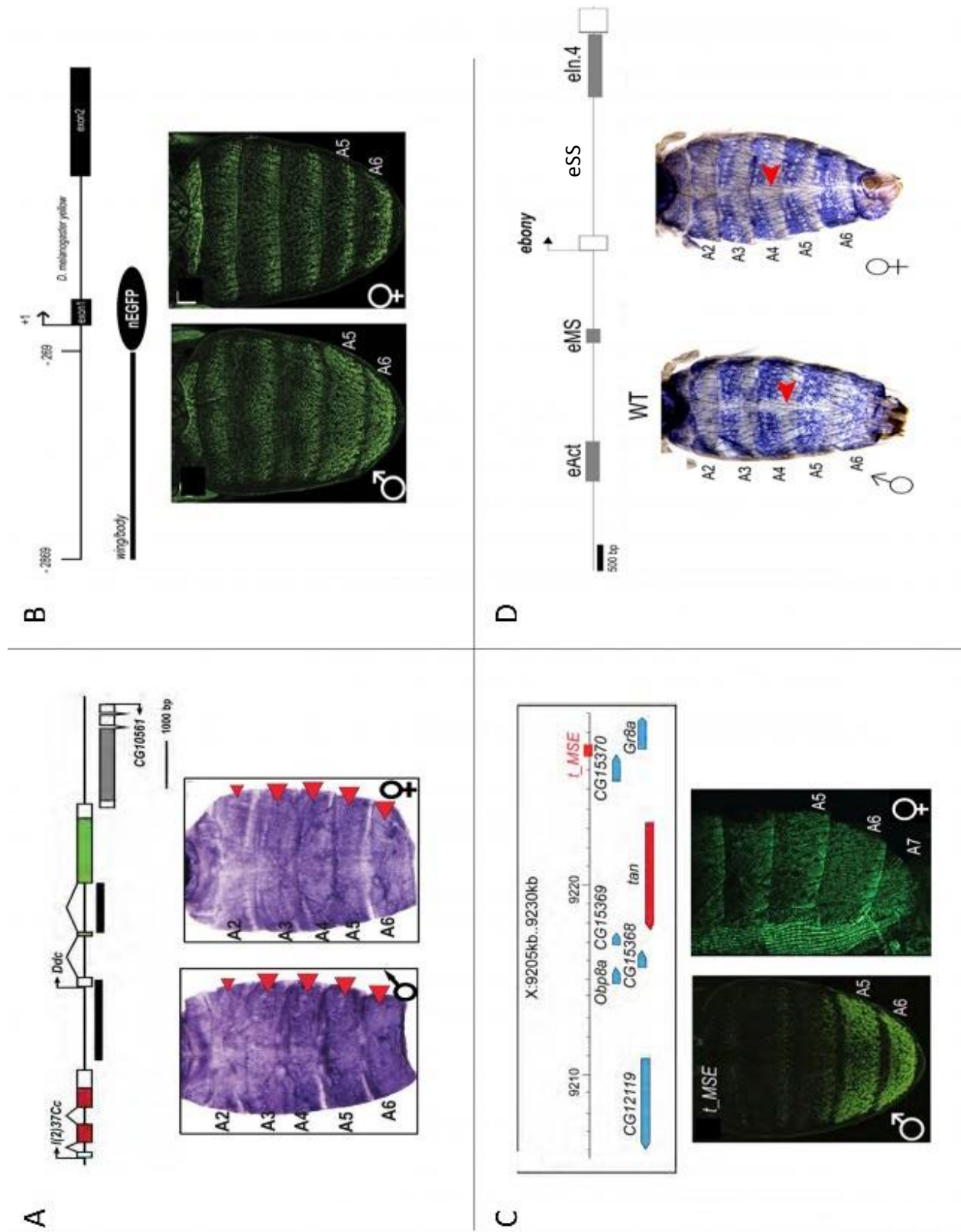


Figure 21 : Expression et régulation des gènes de pigmentation *tan (t)*, *yellow (y)*, *Ddc* et *ebony (e)* dans l'épiderme abdominal. A) Localisation des séquences régulatrices de *Ddc* et expression de *Ddc* dans l'épiderme abdominal mâle et femelle (Grover et al., 2018). B) Localisation des séquences régulatrices de *yellow* et abdomens mâle et femelle exprimant un transgène *y-wing-body-element_nEGFP* (Jeong et al., 2006). C) Localisation des séquences régulatrices de *tan* et abdomens mâle et femelle exprimant un transgène rapporteur *t-MSE-GFP* (Jeong et al., 2008 ; Gibert et al., 2016). D) Localisation des séquences régulatrices d'*ebony* et expression d'*ebony* dans l'épiderme abdominal femelle, les flèches rouges montrent la ligne médiane dorsale dans laquelle *ebony* ne n'exprime pas (Méndez-González et al., 2023).

3) Facteurs de transcription impliqués dans le contrôle de l'expression des gènes de pigmentation

La formation et l'identité des segments abdominaux postérieurs sont dues aux facteurs de transcription Abdominal-A (Abd-A) et Abdominal-B (Abd-B) (Lewis, 1978; Sánchez-Herrero et al., 1985). Abd-A et Abd-B sont également impliqués dans la régulation de la mise en place de la pigmentation.

Abd-A est exprimé de façon homogène dans les segments A2 à A7, il régule *tan* en le réprimant dans les segments A2-A4 et en l'activant de façon indirecte avec *Abd-B* dans A5 et A6 (Camino et al., 2015). L'expression d'*Abd-B* augmente de façon antéro-postérieure, elle est faible dans A5 et forte dans A7 (Kopp et Duncan, 2002). Abd-B régule directement l'expression de *y* chez les mâles en se fixant sur le « *yellow-wing-body element* » (Jeong et al., 2006) alors que *Abd-A* ne semble pas impliqué dans la régulation de *y* (Camino et al., 2015). *Abd-B* régule aussi la pigmentation en contrôlant l'expression du facteur de transcription Doublesex (Dsx) qui participe à la mise en place de la pigmentation (Kopp et al., 2000 ; Wang and Yoder, 2012). Il existe deux formes de Dsx générées par épissage alternatif, la forme mâle appelée Dsx^M et la forme femelle appelée Dsx^F. Dsx et Abd-B participent ensemble à la mise en place de plusieurs caractères sexuels comme la pigmentation, les soies et le nombre

de segments abdominaux (Kopp et al., 2000). La mise en place du dimorphisme de la pigmentation par Abd-B et Dsx se fait par leur régulation directe des gènes *bric-à-brac* (*bab*) codant des répresseurs de transcription.

Les deux gènes paralogues *bab1* et *bab2* sont impliqués dans de nombreux processus comme le développement des ovaires, la mise en place des peignes sexuels et la pigmentation abdominale (Couderc et al., 2002). Ils sont très exprimés chez les femelles dans les segments A2-A7 au stade pupal et chez les mâles seulement dans les segments A2-A4 (Kopp et al., 2000; Williams et al., 2008).

Deux enhancers sont impliqués dans la régulation de l'expression des gènes *bab*, l'« *anterior element* » et le « *dimorphic element* » (*bDE*) (Williams et al., 2008). Dans les segments A5, A6 et A7 des femelles, Abd-B et Dsx^F se fixent sur l'enhancer *bDE* et activent l'expression de *bab*. Dans les segments A5 et A6 des mâles, cet enhancer est fixé par Abd-B et Dsx^M, ce qui réprime *bab* (Kopp et al., 2000; Williams et al., 2008). Bab1 et Bab2 répriment la synthèse de mélanines dans les segments où ils sont exprimés en réprimant les gènes *Ddc*, *y* et *tan* (Gibert et al., 2007 ; Roeske et al., 2018 ; De Castro et al., 2018). La régulation de *tan* passe notamment par le contrôle de l'activité de son enhancer *t-MSE* (Figure 22).

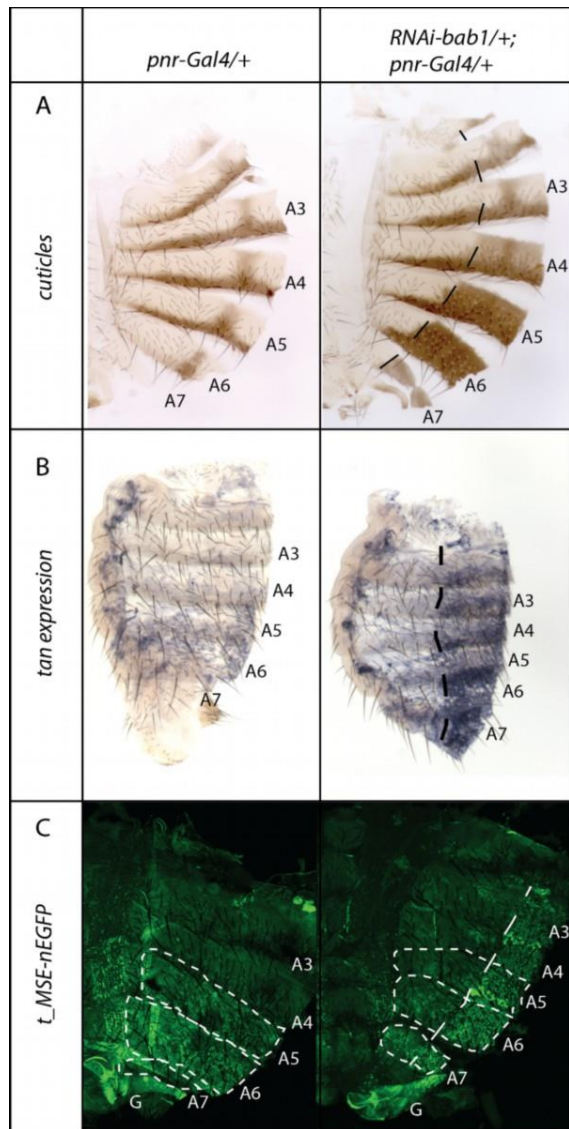


Figure 22 : *bab* réprime *tan* en régulant l'activité de son enhancer *t-MSE*. A) La réduction de l'expression de *bab1* par RNAi augmente la pigmentation dans le domaine d'expression du pilote *pnr-Gal4* (à droite des pointillés), indiquant que *bab* réprime la synthèse de mélanine. B) Expression de *tan* en condition contrôle (gauche) et RNAi *bab1* (droite) : l'expression de *tan* augmente dans le domaine d'expression de *pnr-Gal4* (à droite de la ligne pointillée). C) Activité de l'enhancer *t-MSE* (lignée rapportrice *t-MSE-nEGFP*). L'activité de l'enhancer *t-MSE* augmente dans la région d'expression de *pnr-Gal4* (De Castro et al., 2018).

Le facteur de transcription Omb/Bi, codé par le gène *optomotor-blind/bifid (omb/bi)*, participe également à l'établissement de la pigmentation en spécifiant la bande noire transversale présente dans la région postérieure des segments. L'expression de ce gène est activée par Hedgehog (Kopp et Duncan, 1997). Bien que cela n'ait pas été démontré, Omb/Bi pourrait réguler *y* qui est exprimé fortement dans la région postérieure des tergites (Jeong et al., 2006; Wittkopp et al., 2002) et/ou *e* qui y est réprimé (Rebeiz et al., 2009).

4) Rôles possibles de la pigmentation abdominale

La grande diversité de couleurs et de patrons chez les insectes a été l'objet de nombreuses études. La pigmentation chez les insectes peut servir d'outil de communication visuelle au sein des espèces pour se reconnaître ou encore pour le choix du partenaire. Elle peut aussi servir pour se camoufler, refléter la lumière ou éviter des prédateurs (Wittkopp et Beldade 2009). Elle peut également participer à des processus physiologiques comme la thermorégulation, la résistance à la dessiccation et la protection contre les UV (True, 2003). Chez certains insectes de grande taille, la variation de la pigmentation, en modifiant l'absorption du soleil, a un impact sur la température corporelle et l'activité des animaux (Jong et al., 1996; Kuyucu et al., 2018; Sibia et al., 2018; Watt, 1969).

Chez *D. melanogaster*, des mutants d'*ebony* et *yellow* ayant des phénotypes de pigmentation extrêmes et opposés (très mélanisé pour un mutant d'*ebony*, en grande partie jaune pour un mutant de *yellow*), placés sous une lampe mimant l'exposition solaire, atteignent des températures corporelles différentes, ce qui suggère que la pigmentation abdominale joue un rôle sur la régulation de la température corporelle (Figure 23) (Freoa et al., 2023).

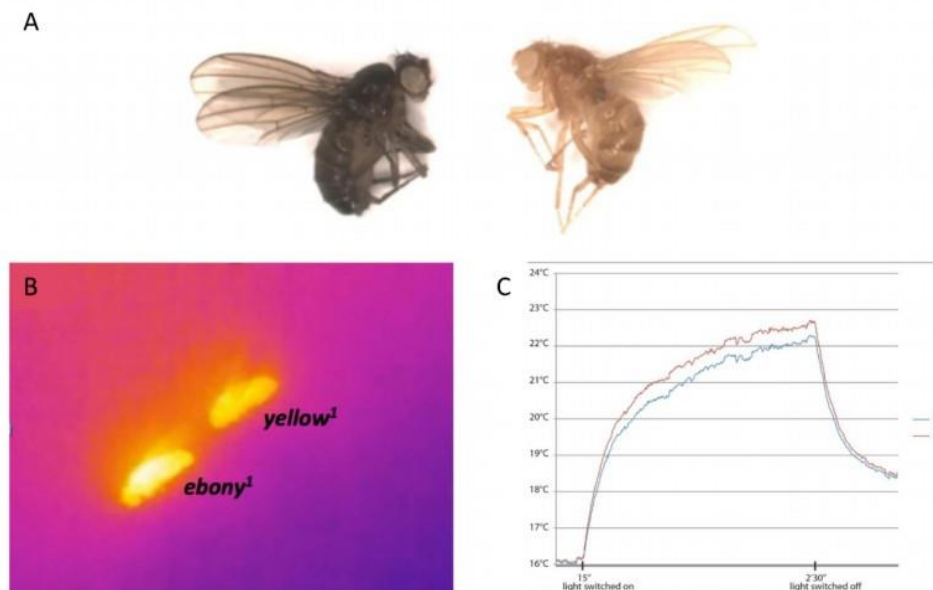


Figure 23 : Evolution de la température corporelle de femelles *D. melanogaster* mutantes pour *ebony* et *yellow*. A) A gauche un mutant d'*ebony* (pigmentation noire par augmentation de la synthèse de mélanines), à droite un mutant de *yellow* (pigmentation jaune par absence de synthèse de mélanines noires). B) Capture à la caméra thermique de la température corporelle des mutants exposés sous une lampe mimant l'exposition solaire (basses températures en bleu, hautes températures en blanc). Le mutant *ebony* a une température corporelle plus élevée que le mutant *yellow*. C) Courbes de température des deux mutants en fonction du temps d'exposition sous la lampe (rouge : mutant *ebony*; bleu : mutant *yellow*). Le mutant *ebony* atteint une température corporelle plus haute que le mutant *yellow* pendant l'exposition à la lumière. Ceci suggère que la différence de température corporelle des individus peut être attribuée à l'absorption de la lumière et que l'individu le plus pigmenté absorbe plus la lumière (Freoa et al., 2023).

La pigmentation chez *D. melanogaster* pourrait aussi participer à la protection contre les rayons UV (Bastide et al., 2014), la résistance aux pathogènes (Kutch et al., 2014) ou encore le camouflage, le comportement de cour, le choix du partenaire, la longévité et la fécondité (Wittkopp et al., 2003 ; Rajpurohit et al., 2016).

II) La plasticité thermique de la pigmentation abdominale

La pigmentation abdominale des femelles *D. melanogaster* est sensible à la température. En effet, pour un même génotype, la pigmentation augmente lorsque la température

développementale diminue (Gibert et al., 2000). Cette modification de la pigmentation est la plus importante dans les segments postérieurs A5, A6 et A7, tandis qu'elle est faible dans les segments plus antérieurs (Figure 24). La différence de plasticité entre les segments antérieurs et postérieurs semble liée à l'expression du gène *Abd-B*. En effet son expression ectopique dans le thorax suffit à produire un phénotype de pigmentation plastique (Gibert et al., 2007). La température n'affecte pas uniquement la pigmentation abdominale, mais aussi la taille, le nombre d'ovarioles et la vitesse de développement (Gibert et al., 2004).

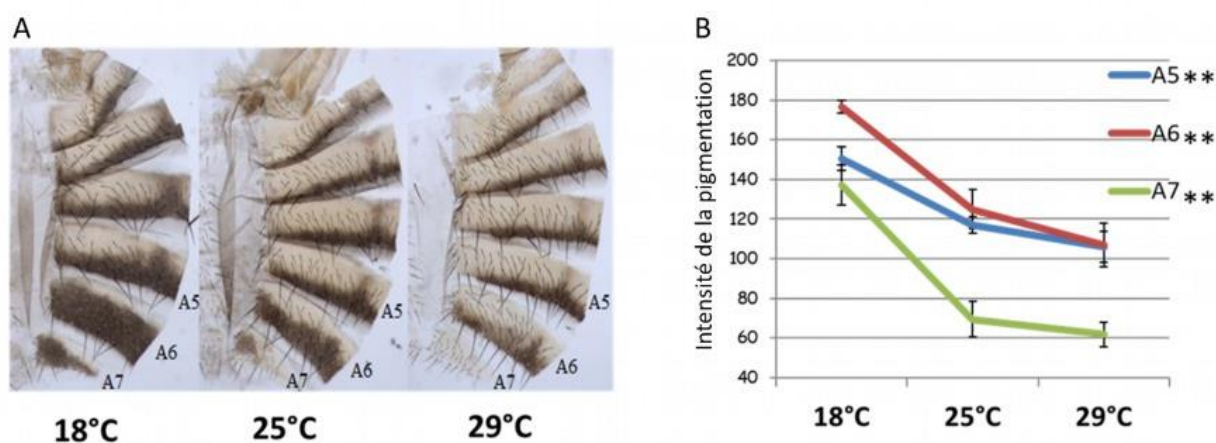


Figure 24 : Plasticité phénotypique de la pigmentation abdominale des femelles *D. melanogaster* dans les segments A5, A6 et A7. A) Cuticules de femelles drosophiles (lignée isogénique *w¹¹¹⁸*) élevées à 18°C, 25°C ou 29°C. Dans les segments postérieurs A5, A6 et A7 on observe une diminution de la pigmentation quand la température de développement augmente. B) Normes de réaction de la pigmentation dans les segments A5, A6 et A7. Pour les trois segments, il y a une diminution significative de la pigmentation quand la température du développement augmente (n=10 par température ; p-value : **= <0.01) (Gibert et al., 2016).

Afin de déterminer à quel stade du développement la température a un effet sur la pigmentation, des expériences de transfert d'individus de 29°C à 18°C à différents stades du développement ont été réalisées (Figure 25). Les individus transférés à 18°C avant la deuxième moitié du développement pupal ont un phénotype de pigmentation foncé typique de drosophiles élevées totalement à 18°C. Lorsque le transfert à 18°C est réalisé après la seconde moitié du développement pupal, la pigmentation est claire, identique à celle

d'individus développés complètement à 29°C. La température a donc un effet sur la pigmentation abdominale au cours de la deuxième moitié du développement pupal. Cette période correspond à la période de mise en place de la pigmentation pendant la fin du stade pupal et les premières heures après l'éclosion.

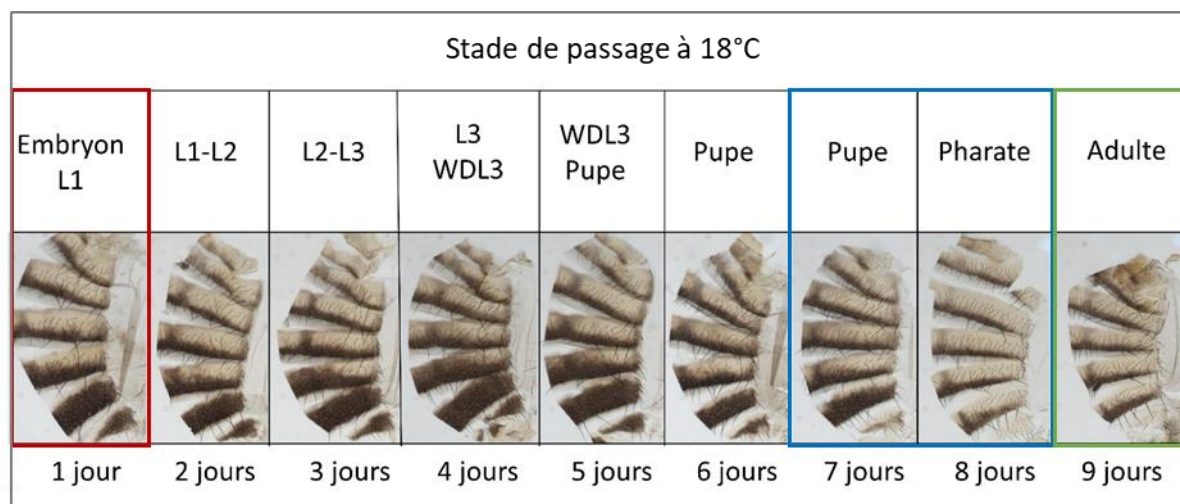


Figure 25 : Sensibilité de la pigmentation à la température pendant le développement. Des femelles ont été mises à pondre à 29°C, puis les tubes d'élevage ont été transférés à 18°C à différents stades du développement (entre 1 et 9 jours après la ponte : le stade de passage à 18°C est indiqué au-dessus de chaque photo). Les cuticules des femelles issues de ces embryons sont présentées. A gauche (cadre rouge) : phénotype foncé obtenu après un développement total à 18°C. A droite (cadre vert) : phénotype clair obtenu après un développement complet à 29°C. Le changement du phénotype foncé vers le phénotype clair est observé quand le changement de température a lieu pendant la deuxième moitié du développement pupal (cadre bleu). La température régule donc la pigmentation abdominale pendant cette période (données non publiées du laboratoire).

1) Mécanismes moléculaires de la plasticité thermique de la pigmentation abdominale

Pour identifier les mécanismes et les acteurs impliqués dans la plasticité thermique de la pigmentation abdominale, les transcriptomes d'épidermes des segments A5, A6 et A7 de pupes tardives ou de jeunes femelles contrôles *w¹¹¹⁸* élevées à 18°C ou 29°C ont été analysés par RNAseq (données non publiées du laboratoire). L'expression de nombreux gènes est

modulée par la température (2852 gènes dans les épidermes de pupes, 2086 gènes dans les épidermes de jeunes adultes). Parmi ces gènes se trouvent des gènes codant des facteurs de transcription, des régulateurs de la chromatine, mais également le gène de pigmentation *tan*. Ce gène est en effet dix fois plus exprimé à 18°C qu'à 29°C dans les épidermes de jeunes adultes

a) Le gène de pigmentation *tan*

tan est l'effecteur principal de l'effet de la température sur la pigmentation abdominale. Le gène *tan* code une enzyme impliquée dans la synthèse des pigments noirs et bruns (Figure 20). Son niveau d'expression beaucoup plus élevé à 18°C qu'à 29°C est donc en accord avec la plasticité de la pigmentation, les mouches étant plus foncées à 18°C qu'à 29°C.

Afin de confirmer les résultats des analyses RNA-seq et d'analyser l'expression de tous les gènes de pigmentation, des expériences de RT-qPCR ont été réalisées dans les mêmes tissus et aux mêmes stades que les RNA-seq (Figure 26) (Gibert et al., 2016). Dans les épidermes de pupes, les gènes de pigmentation *tan*, *ebony*, *Ddc*, *yellow* et *black* sont faiblement modulés par la température. Par contre, chez les jeunes adultes, le seul gène dont l'expression est modulée par la température est *tan*, qui est sept fois plus exprimé à 18°C qu'à 29°C.

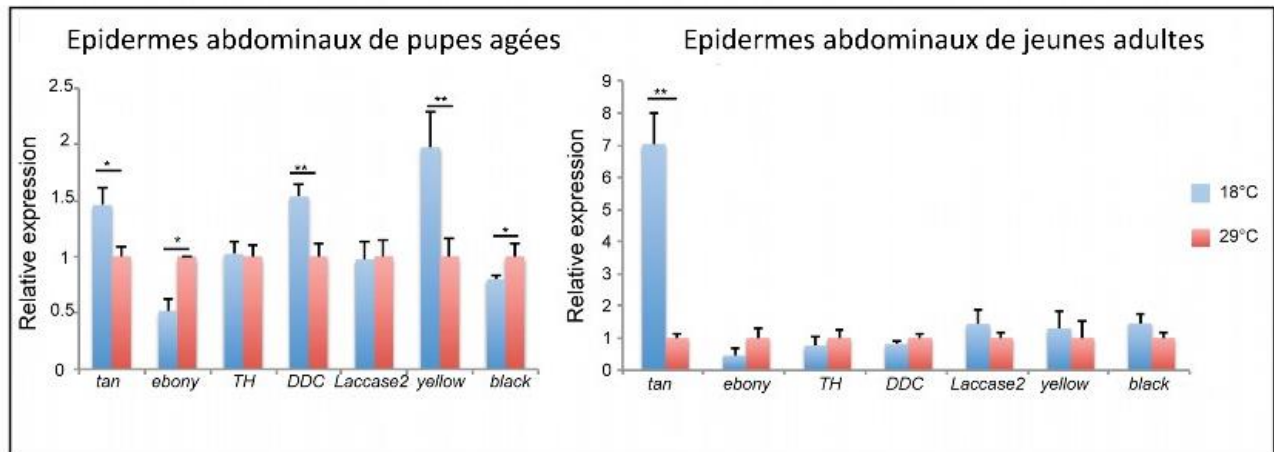


Figure 26 : Modulation par la température de l'expression des gènes de la pigmentation dans les épidermes abdominaux de jeunes femelles ou de pupes élevées à 18°C ou 29°C. Analyse par RT-qPCR de l'expression des gènes de la pigmentation. p-value : * <0.05 , ** $= <0.01$ (Gibert et al., 2016).

La forte modulation de l'expression de *tan* par la température suggère que celui-ci pourrait être l'effecteur principal de l'effet de la température sur la pigmentation. Afin de voir si la modulation de *tan* mime l'effet de la température, son expression a été soit diminuée (transgène *UAS-RNAi tan*), soit augmentée (transgène *UAS-tan*), en utilisant le pilote *pannier-Gal4* (*pnr-Gal4*) (Figure 27A) (Gibert et al., 2016). *pnr* s'exprime autour de la ligne médiane dorsale dans l'épiderme abdominal pendant tout le développement (Calleja et al., 2000). La diminution d'expression de *tan* à 18°C induit une diminution de pigmentation, ce qui montre que l'expression forte de *tan* est nécessaire pour avoir un phénotype foncé à 18°C. A l'inverse, la surexpression de *tan* à 29°C induit une augmentation de pigmentation, montrant que la faible expression de *tan* à 29°C est limitante pour la production des pigments bruns et noir. La modulation de l'expression de *tan* est donc nécessaire et suffisante pour mimer l'effet de la température. Cette modulation d'expression de *tan* passe au moins en partie par une modification de l'activité de son enhancer *t-MSE*, plus actif à 18°C qu'à 29°C (Figure 27B-C) (Gibert et al., 2016).

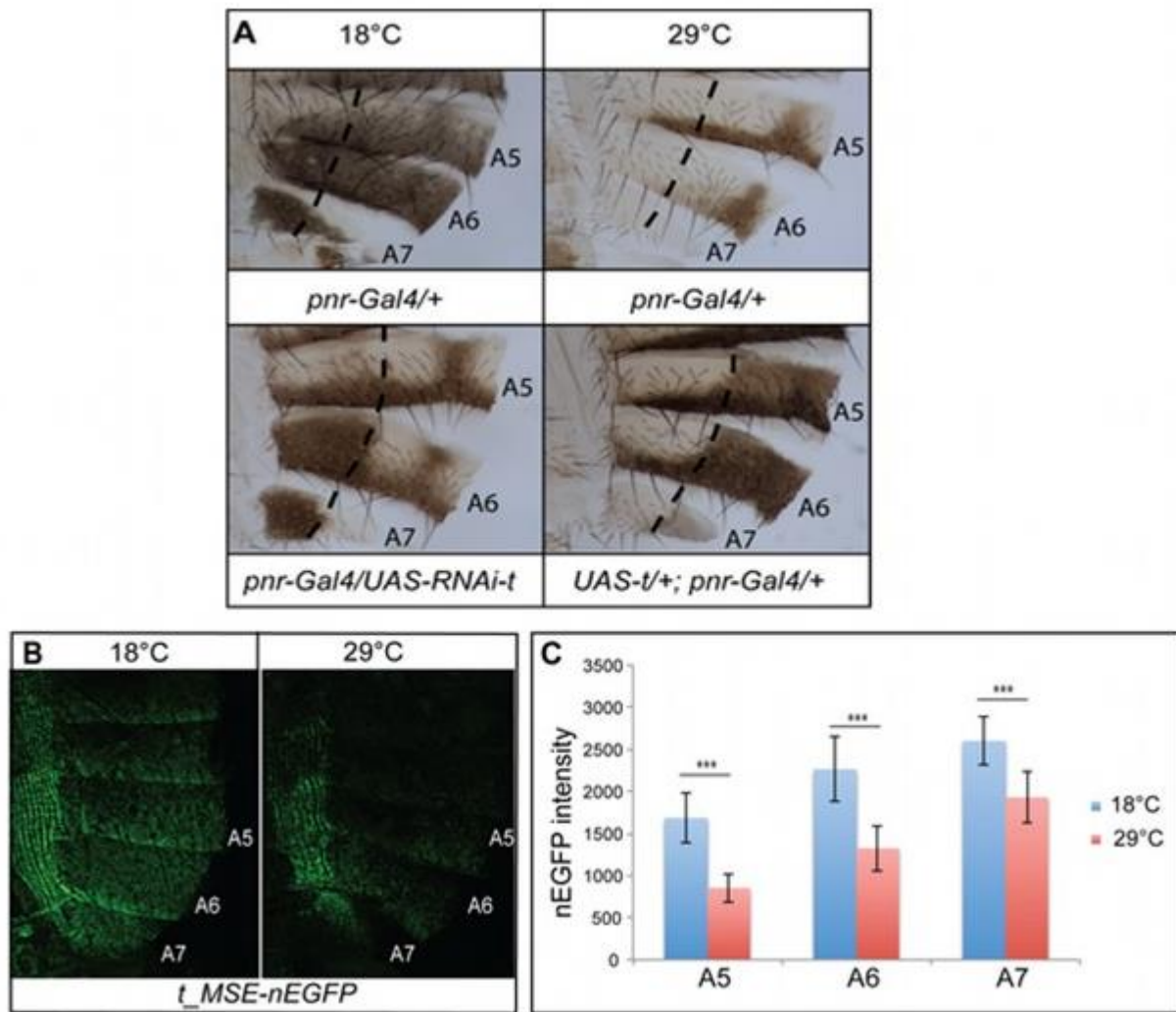


Figure 27 : La modulation de l'expression de *tan* est essentielle pour la plasticité phénotypique de la pigmentation et implique une régulation de l'activité de son enhancer *t-MSE*. A) Phénotypes de pigmentation induits par une modulation de l'expression de *tan* (transgènes *UAS-RNAi tan* et *UAS-tan*, pilote *pnr-Gal4*. Le domaine d'expression du pilote *pnr-Gal4* est à droite des pointillés). B) Cuticules de jeunes femelles élevées à 18°C ou 29°C exprimant un transgène rapporteur *t-MSE-nEGFP*. C) Quantification de l'intensité de la GFP dans les segments A5, A6 et A7 des jeunes femelles exprimant le transgène *t-MSE-nEGFP*. n=10 par température, p-value***= <0.05 (Gibert et al., 2016).

b) Les facteurs de transcription Bab et Abd-B

Comme vu précédemment (Partie I, 3 et figure 22), les facteurs de transcription Bab (Bab1 et Bab2) interviennent dans l'établissement de la pigmentation en réprimant l'expression de *tan*. L'expression de *bab* est elle-même régulée par Abd-B. En plus de leur rôle dans l'établissement de la pigmentation, le rôle de *bab* et *Abd-B* dans la plasticité thermique de la

pigmentation a démontré par une étude du laboratoire visant à caractériser deux lignées de *D. melanogaster*, la lignée *Pale* et la lignée *Dark*, ayant des pigmentations et des plasticités thermiques différentes (De Castro et al., 2018) (Figure 28).

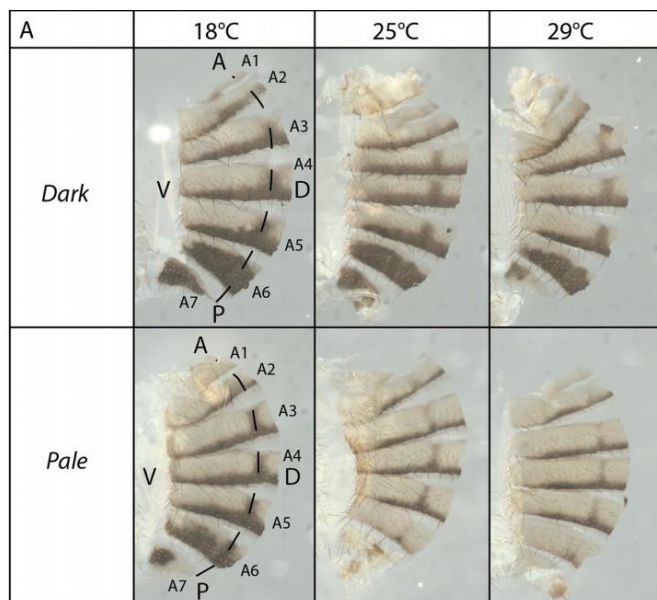
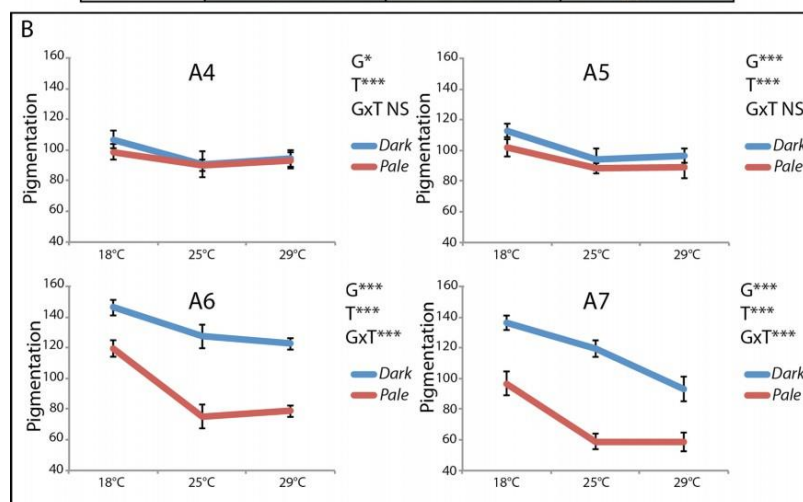


Figure 28 : Les lignées *Pale* et *Dark* ont une pigmentation et une plasticité différentes. A) Cuticules abdominales de femelles *Pale* et *Dark* élevées à 18°C, 25°C et 29°C. B) Normes de réaction montrant une plasticité différente des deux lignées dans les segments A6 et A7 (interaction GxT significative) (De Castro et al., 2018).



La différence de pigmentation et de plasticité de ces lignées est essentiellement liée au locus *bab*, qui présente entre les deux lignées un polymorphisme dans la séquence de l'enhancer *bDE* (allèles *bDE^D* et *bDE^P*) induisant une différence d'activité et de plasticité de cet enhancer (Figure 29A). Cette différence se reflète au niveau de l'expression et de la plasticité de *bab* (Figure 29B) et de *tan* (Figure 29C) qui diffèrent entre les deux lignées. La modulation par la température de l'expression de *bab* via son enhancer *bDE* joue donc un rôle clé dans la plasticité thermique de la pigmentation. De plus, dans les deux lignées, la modulation par la

température de l'expression de *tan* est, au moins en partie, une conséquence de la modulation par la température de celle de *bab* (De Castro et al., 2018).

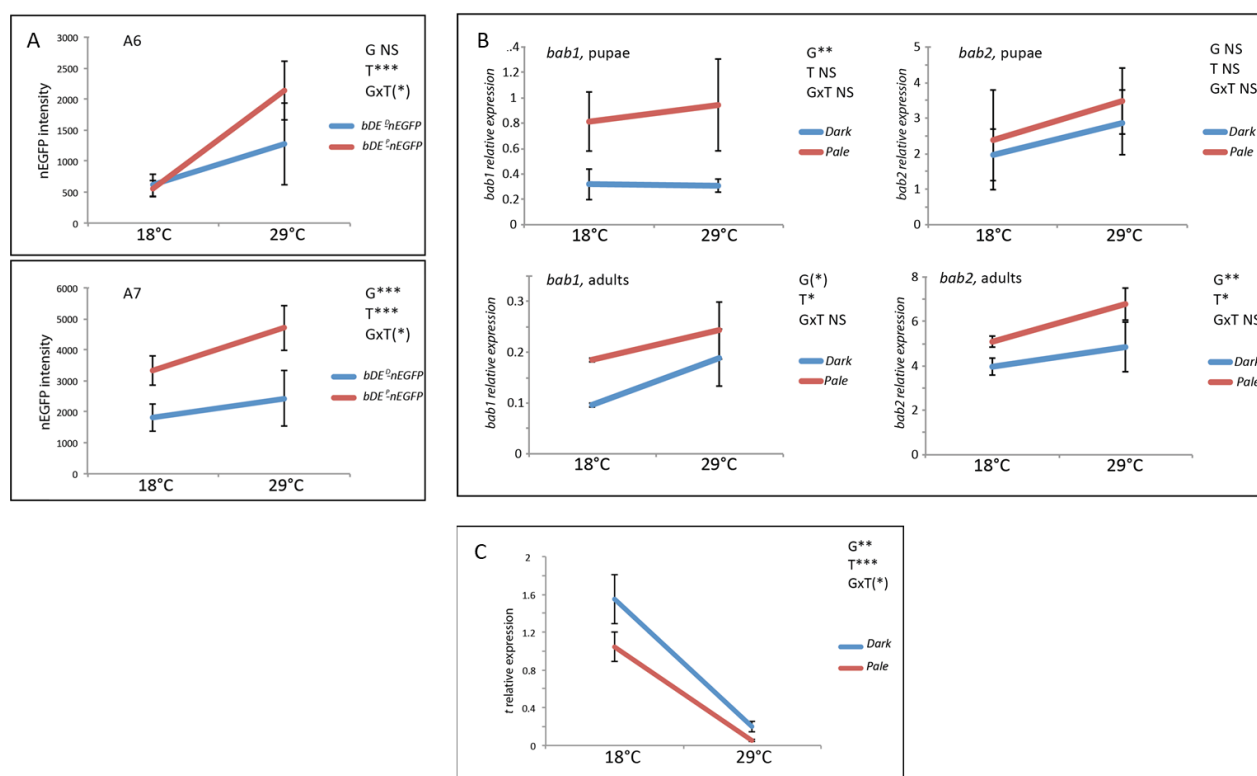


Figure 29: L'enhancer de *bab*, *b-DE*, des lignées *Pale* et *Dark* diffère en activité et plasticité, induisant une différence d'expression et de plasticité de *bab* et *tan* entre les deux lignées. A) Quantification de l'activité et de la réponse à la température de l'enhancer *b-DE* des lignées *Pale* (rouge) et *Dark* (bleu) mesurée grâce à un transgène rapporteur GFP. B). Quantification par RT-qPCR de l'expression et la plasticité thermique de *bab1* et *bab2* dans les épidermes des pupes et jeunes adultes des lignées *Pale* (rouge) et *Dark* (bleu). C) Quantification par RT-qPCR de l'expression et la plasticité thermique de *tan* dans les épidermes de jeunes adultes des lignées *Pale* (rouge) et *Dark* (bleu) (De Castro et al., 2018).

En plus d'être sensible à la température, l'expression de *bab* est aussi modulée par la dose d'Abd-B, ce qui est attendu puisqu'Abd-B active *bab* chez les femelles en se fixant à l'enhancer *bDE*. Mais de manière intéressante, l'action d'Abd-B sur *bab* est modulée par la température (Figure 30). L'expression d'Abd-B n'étant pas elle-même pas modulée par la température, il est possible que la température module le recrutement d'Abd-B sur l'enhancer *b-DE*. La dose d'Abd-B est donc impliquée dans la régulation de l'activité et de la plasticité de l'enhancer *bDE* (De Castro et al., 2018).

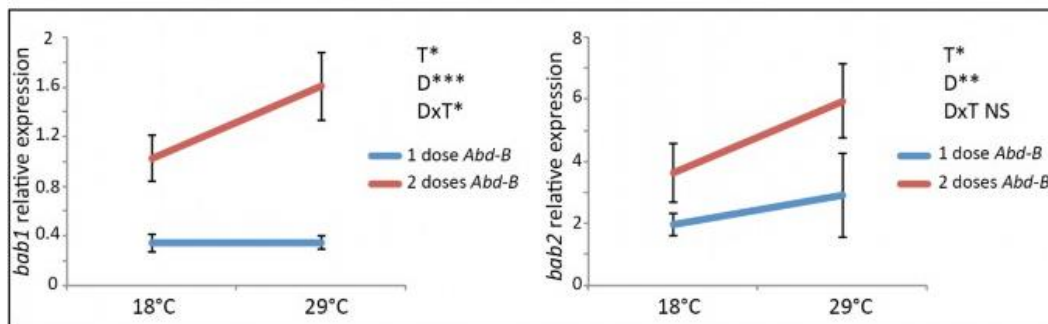


Figure 30 : La température et l'effet d'Abd-B sont impliqués dans la régulation de l'expression de *bab*. Mesure par RT-qPCR de l'expression de *bab1* et *bab2* dans des épidermes abdominaux de pupes élevées à 18°C ou 29°C exprimant 1 ou 2 doses d'*Abd-B*. L'expression de *bab1* et *bab2* est modifiée par la température (T) ainsi que par la dose d'*Abd-B* (D). Pour *bab1*, on observe une interaction entre la dose d'*Abd-B* et la température (DxT) (Two way ANOVA p-value:*= <0.05, **<0.01, ***<0.001) (De Castro et al., 2018).

c) La méthyl-transférase Trithorax (Trx)

Comme vu précédemment (chapitre 1, partie IV), des variations de l'environnement peuvent affecter la structure et la compaction de la chromatine, induisant une plasticité transcriptionnelle de certains gènes. Afin d'étudier si ce type de mécanisme est impliqué dans la modulation de l'expression de *tan* par la température, le niveau de compaction de la chromatine et l'abondance de certaines marques épigénétiques à ce locus ont été mesurés à

18°C et 29°C dans des épidermes abdominaux de jeunes adultes (Figure 31) (Gibert et al. 2016). La compaction de *tan*, mesurée par FAIRE-qPCR (« Formaldehyde Assisted Isolation of Regulatory Elements ») ne varie pas sur aucune région du gène entre 18°C et 29°C (Figure 31A). Il en est de même pour la marque d'histone caractéristique des enhanceurs actifs, H3K27ac, mesurée par ChIP-qPCR (Immunoprécipitation de Chromatine), qui reste élevée sur l'enhancer *t-MSE* aux deux températures (Figure 31B). En revanche, le niveau de la marque H3K4me3 activatrice sur le TSS de *tan* et son exon 2 est beaucoup plus élevé à 18°C qu'à 29°C, ce qui corrèle avec l'augmentation de l'expression de *tan* à 18°C (Figure 31C).

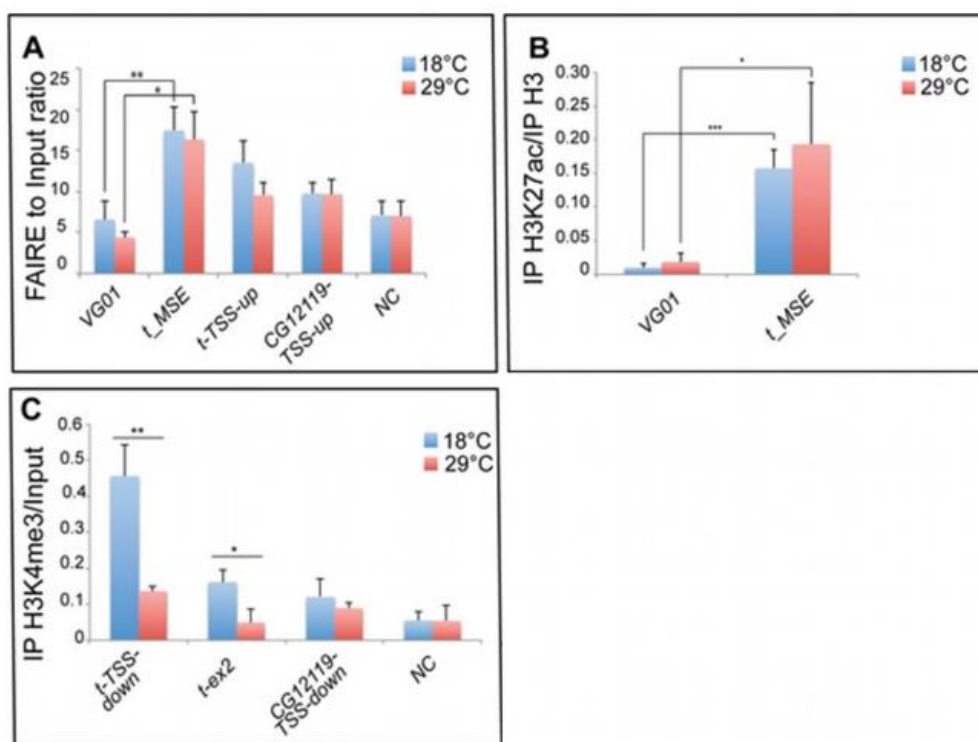


Figure 31 : Compaction de la chromatine et abondance des marques H3K4me3 et H3K27ac sur le locus de *tan* dans les épidermes abdominaux de jeunes femelles élevées à 18°C et 29°C. A) La température ne modifie pas la compaction de la chromatine au niveau du TSS de *tan* et de son enhancer *t-MSE*; contrôles négatifs: enhancer *VG01* et une région intergénique *NC*. B) La température ne modifie pas le niveau de la marque H3K27ac sur l'enhancer *t-MSE*. C) Une température plus froide augmente le niveau de la marque H3K4me3 en aval du TSS de *tan* ainsi que sur son exon 2 (Gibert et al., 2016).

Comme vu précédemment (Chapitre 1, partie II), la méthylation de H3K4 peut être réalisée chez la drosophile par trois histone méthyl-transférases, Trx, dSet1 et Trr (Tableau 2). Pour savoir si ces enzymes sont impliquées dans la mise en place de la pigmentation et sa plasticité, des femelles dans lesquelles les gènes *trx*, *trr* et *dSet1* ont été inactivés par RNAi dans l'épiderme abdominal en utilisant le pilote *yellow-Gal4* (*y-Gal4*) ont été étudiées (Figure 32) (Gibert et al 2016). Seule la perte d'expression de *trx* a un effet sur la pigmentation (Figure 32A). Par ailleurs, la diminution d'expression de *trx* provoque une diminution de l'expression de *tan* (Figure 32B) et du niveau de H3K4me3 sur son TSS et son exon 2 (Figure 32C). L'histone méthyl-transférase Trx est donc impliquée dans l'établissement de la pigmentation en activant notamment l'expression de *tan* grâce au dépôt de la marque H3K4me3 sur ce gène. L'analyse de la norme de réaction de la pigmentation de femelles hétérozygotes pour l'allèle perte-de-fonction *trx*^{14A6} suggère que *trx* pourrait aussi participer à la plasticité de la pigmentation (Figure 32D).

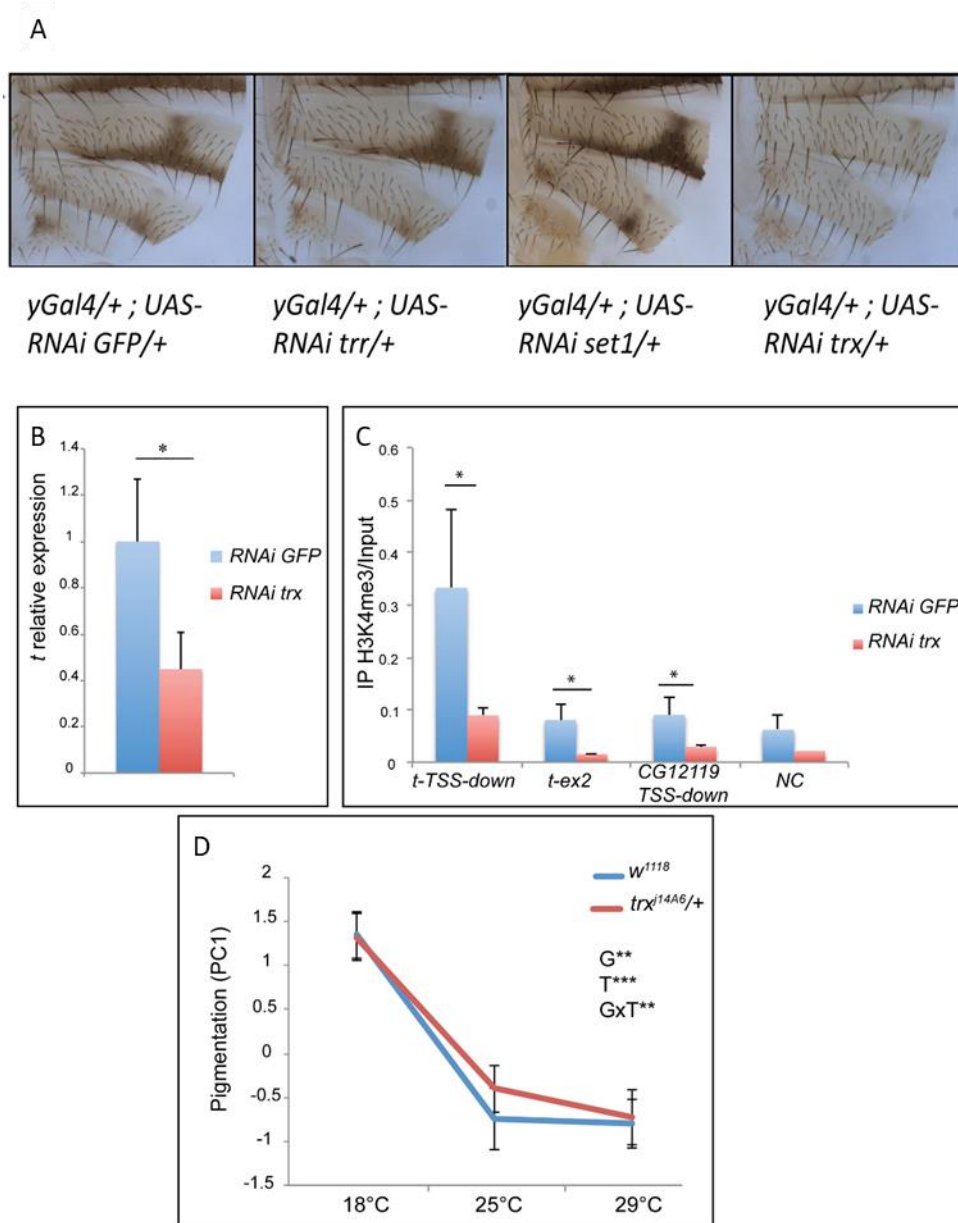


Figure 32 : L'histone méthyl-transférase Trx participe à l'établissement de la pigmentation et à sa plasticité thermique. A) La diminution d'expression de *trx* par RNAi dans l'épiderme abdominal (pilote *y-Gal4*) induit une dépigmentation qui n'est pas observée pour *trr* et *dSet1*. B) Mesure de l'expression de *tan* dans l'épiderme abdominal de jeunes femelles en condition contrôle (RNAi *GFP*) ou RNAi *trx*. *trx* régule l'expression de *tan* (n=3, 30 épidermes par condition, p-value* = <0.05). C) Mesure du niveau de la marque H3K4me3 en condition contrôle et RNAi *trx* sur *tan*. *trx* est nécessaire pour le niveau de H3K4me3 en aval du TSS de *tan* et sur son exon 2 (n=3, 30 épidermes par condition, p-value* = <0.05). D) Normes de réaction de la pigmentation abdominale de drosophiles contrôles (*w¹¹¹⁸*) et mutantes perte de fonction pour *trx* (*trx^{j14A6/+}*). La plasticité (GxT) est significativement différente entre les deux lignées (n=30 par température, p-value** = <0.01, ***<0.001) (Gibert et al., 2016).

d) Reconstruction du réseau de gènes régulant la pigmentation abdominale et sa plasticité

Les données du laboratoire ainsi que celles de la littérature permettent de commencer à identifier un réseau de gènes impliqués dans la régulation de la pigmentation et sa plasticité (Figure 33).

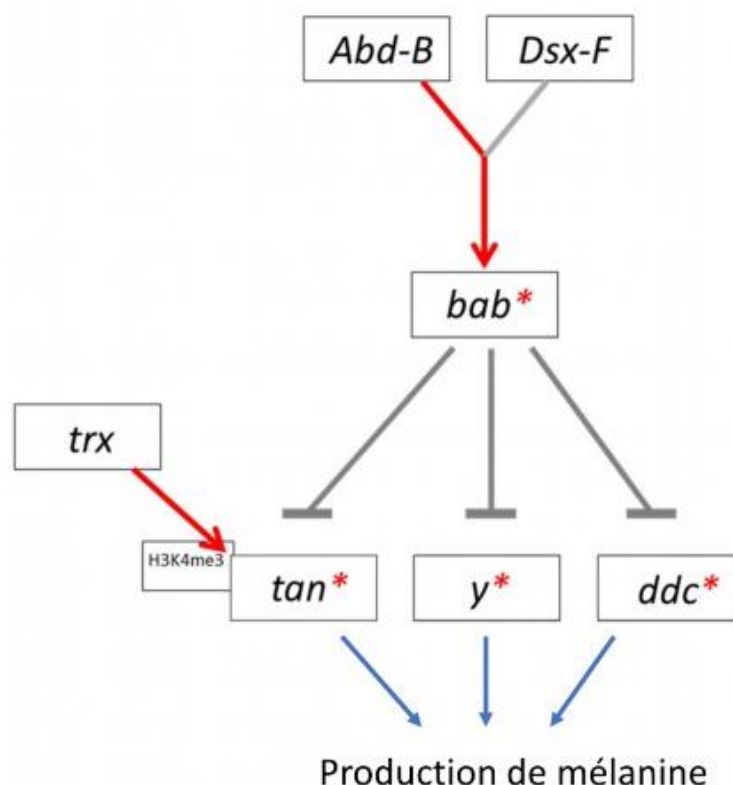


Figure 33 : Réseau de régulation de gènes médiant l'effet de la température sur la pigmentation abdominale des femelles *D. melanogaster*. *Abd-B* et *Dsx-F* activent l'expression de *bab* qui régule négativement les gènes de la pigmentation *tan*, *yellow* et *ddc*, ce qui induit une réduction de la production de mélanine. *trx* régule l'expression de *tan* et modifie le niveau de H3K4me3 sur *tan*. Les flèches rouges indiquent que l'effet du gène ou de la protéine est sensible à la température, les astérisques rouges indiquent que l'expression du gène est modifiée par la température (D'après Gibert et al., 2007 ; Gibert et al., 2017 ; Williams et al., 2008 ; Gibert et al., 2016 ; Roeske et al., 2018 ; De Castro et al., 2018).

Afin de compléter ce réseau et d'identifier de nouveaux acteurs de la pigmentation abdominale et sa plasticité, un crible génétique par RNAi contre 494 facteurs de

transcription et régulateurs de la chromatine exprimés dans l'épiderme abdominal de jeunes femelles *D. melanogaster* a été effectué avant mon arrivée au laboratoire (S. De Castro, thèse, 2018). La première étape du crible, basée sur l'observation de la pigmentation abdominale de lignées UAS-RNAi combinées avec les pilotes *pnr*-Gal4 et *y*-Gal4, a permis d'identifier 56 gènes impliqués dans la pigmentation. Parmi ces gènes, l'utilisation d'un transgène GFP rapporteur de l'expression de *tan* a mis en évidence que 27 d'entre eux participaient à la régulation de *tan*. Parmi ces 27 gènes, quinze codent des facteurs de transcription, quatre des régulateurs de la chromatine et huit des protéines dont la fonction n'est pas encore connue.

III) Objectifs de ma thèse

Le crible génétique visant à identifier de nouveaux acteurs de la pigmentation abdominale a permis d'identifier de nouveaux régulateurs de la chromatine. Au cours de ma thèse, j'ai étudié certains de ces candidats.

La première partie de mon projet a concerné l'étude du gène *grappa* (*gpp*) codant pour une sous unité du complexe DotCom (Résultat partie I). Gpp est l'histone méthyl-transférase qui, au sein du complexe DotCom, dépose la marque activatrice H3K79me3. J'ai analysé le rôle de des sous unité de DotCom dans l'établissement de la pigmentation abdominale en déterminant notamment les gènes de pigmentation cibles de Gpp. J'ai également montré que le complexe DotCom joue un rôle dans la plasticité de la pigmentation.

En parallèle, je me suis aussi intéressé à un autre gène issus du crible génétique, *little imaginal discs* (*lid*) (Résultats partie II). Le gène *lid* code une histone déméthylase retirant la marque H3K4me3 (voir chapitre 1, II, 4). Ce candidat a retenu notre intérêt puisque Trx, l'enzyme antagoniste de Lid qui dépose la marque H3K4me3, intervient dans l'établissement de la pigmentation et sa plasticité. J'ai donc complété les données génétiques et moléculaires déjà disponibles au laboratoire pour confirmer le rôle de Lid dans l'établissement de la pigmentation et sa plasticité. Par ailleurs, afin de déterminer les interactions fonctionnelles entre Lid et Trx dans l'établissement de la pigmentation et identifier leurs gènes cibles, j'ai généré et analysé le transcriptome d'épidermes abdominaux d'individus RNAi pour *lid* ou *trx*. De manière inattendue, ce travail m'a permis de mettre en évidence l'implication dans l'établissement de la pigmentation de certains gènes de la voie des pi-RNA.

RESULTATS PARTIE I

Résultats partie I - Etude du rôle du complexe DotCom sur la mise en place de la pigmentation et sa plasticité

I) Contexte de l'étude et principaux résultats

La plasticité phénotypique est la capacité d'un génotype à produire des phénotypes distincts en réponse à des environnements différents. Au laboratoire nous utilisons la pigmentation abdominale des femelles *Drosophila melanogaster* comme modèle de plasticité. En effet leur pigmentation est forte à basse température et plus faible à haute température.

Les travaux précédents du laboratoire ont permis de commencer à identifier le réseau de régulation des gènes de pigmentation médiant l'effet de la température. Pour compléter ce réseau, un crible génétique contre des régulateurs chromatinien et des facteurs de transcription exprimés dans l'épiderme abdominal a été réalisé au laboratoire. Parmi les candidats issus de ce crible se trouvent des sous-unités du complexe DotCom (Gpp, Alh, Nipped-A et EAR). Ce complexe appose la marque activatrice H3K79me3.

Dans ce travail, j'ai étudié le rôle du complexe DotCom dans la mise en place de la pigmentation et sa plasticité. J'ai confirmé que les différentes sous-unités du complexe sont impliquées dans la mise en place de la pigmentation. De façon intéressante, Gpp joue des rôles opposés dans la mise en place de la pigmentation en fonction du stade de développement, en régulant différents gènes de pigmentation. En effet, son action pendant la vie larvaire conduit à la répression de *yellow*, et son action à la fin de la vie pupale induit l'activation de *tan*. J'ai également montré que le complexe DotCom est impliqué dans la plasticité thermique de la pigmentation. Ces résultats seront prochainement soumis pour publication.

II) Article

The H3K79me3 methyl-transferase Grappa is involved in the establishment and thermal plasticity of abdominal pigmentation in *Drosophila melanogaster* females.

Raphaël Narbey¹, Emmanuèle Mouchel-Vielh^{1*} and Jean-Michel Gibert^{1*}

*: co-last authors and co-corresponding authors

jean-michel.gibert@sorbonne-universite.fr

emmanuele.mouchel@sorbonne-universite.fr

¹: Sorbonne Université, CNRS, Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS), Laboratoire de Biologie du Développement, UMR 7622, 9 quai St-Bernard 75005 Paris, France.

Abstract:

Temperature sensitivity of abdominal pigmentation in *Drosophila melanogaster* females allows to investigate the mechanisms underlying phenotypic plasticity. Thermal plasticity of pigmentation is due to modulation of *tan* and *yellow* expression, encoding pigmentation enzymes. Furthermore, modulation of *tan* expression by temperature is correlated to the variation of the active histone mark H3K4me3 on its promoter. Here, we test the role of the DotCom complex, which methylates H3K79, another active mark, in establishment and plasticity of pigmentation. We show that several components of the DotCom complex are involved in the establishment of abdominal pigmentation. Remarkably, Grappa, the catalytic unit of this complex, plays opposite roles on pigmentation at distinct developmental stages. Indeed, its down-regulation from larval L2 to L3 stages increases female adult pigmentation, whereas during the second half of the pupal stage it decreases adult pigmentation. These opposite effects are correlated to the regulation of distinct pigmentation genes by Grappa: *yellow* repression for the early role and *tan* activation for the late one. Lastly, reaction norms measuring pigmentation along temperature in mutants for subunits of the DotCom complex reveal that this complex is not only involved in the establishment of female abdominal pigmentation but also in its plasticity.

Introduction:

Phenotypic plasticity is the ability of a given genotype to produce different phenotypes in response to distinct environmental conditions¹. It is widely observed in the wild and is often an adaptation to predictable environmental fluctuations such as seasonal variations. Furthermore, phenotypic plasticity is thought to facilitate evolution, as a phenotype initially induced by the environment can become subsequently fixed by genetic assimilation. A few empirical studies give support to such models of evolution called “Flexible stem hypothesis” or “Plasticity first evolution”²⁻⁷. Despite these important roles in adaptation and evolution, the molecular mechanisms underlying phenotypic plasticity are only beginning to be unraveled. Here, we use the abdominal pigmentation of *Drosophila melanogaster* females as a model to study the mechanisms involved in phenotypic plasticity. Abdominal pigmentation is sensitive to temperature, as females grown at 18°C are darker than those grown at 29°C⁸. Indeed, the expression of several pigmentation enzyme coding genes (called hereafter pigmentation genes), such as *tan* and *yellow*, is regulated by temperature^{9,10}. In particular, *tan*, encoding an enzyme involved in production of black and brown melanin¹¹, is expressed 7 times more at 18°C than 29°C in young females⁹. Environmental conditions can affect gene expression through modifications of chromatin structure, mainly *via* histone modifications, nucleosome remodeling or DNA methylation¹²⁻¹⁴. We have previously shown that the H3K4 methyl-transferase Trithorax, that deposits the H3K4me3 active histone mark, is involved in the establishment and plasticity of *Drosophila* pigmentation by activating *tan* expression through H3K4 methylation of its promoter⁹. Furthermore, the level of H3K4me3 on *tan* promoter is modulated by temperature. Here, we investigate the role of the DotCom complex, involved in the deposition of the active histone mark H3K79me3, on pigmentation gene expression and thermal plasticity of abdominal pigmentation.

The mono-, di- and trimethylation of H3K79 is catalyzed by Dot1 (Disruptor of telomeric silencing-1), a non-SET domain-containing histone lysine methyl-transferase first identified in yeast¹⁵. This enzyme, encoded by *grappa* (*gpp*) in *Drosophila*¹⁶, is highly conserved from yeast to vertebrates and seems to have a dual role. In yeast and *Drosophila*, telomeric silencing is disrupted in both *Dot1/gpp* loss- and gain- of function mutants¹⁶⁻¹⁸. Moreover, in *Drosophila*, *gpp* mutants show phenotypes indicative of disruption of both Polycomb-group silencing complexes (PcG) and Trithorax-group activating complexes (TrxG)¹⁶. In mammals, Dot1 is involved in embryonic development and heterochromatin organization¹⁹. Altogether, these data reveal an important role of H3K79 methylation in the regulation of developmental genes.

Genome-wide profiling studies in different mammalian cell lines show that H3K79me2 and H3K79me3 marks localize to the promoter-proximal regions of actively transcribed genes, with a good correlation with high transcriptional levels²⁰. In yeast, nearly 90 % of the genome is methylated on H3K79¹⁸. In human, these methylations are associated with activation at single-copy genes²¹. H3K79me2 is enriched in euchromatin whereas H3K79me3 is enriched in repeated sequences and chromocenter²². In *Drosophila*, the level of H3K79me3 is positively correlated with gene activity²³, which is consistent with some of the phenotypes previously reported for *gpp* mutants such as anterior transformations of the posterior abdominal segments¹⁶.

Interestingly, other histone modifications facilitate H3K79 methylation by Dot1. In yeast, the mono-ubiquitination of histone H2B on lysine 123 (H2BK123ub) is required for an efficient deposition of methylations on H3K79 (H3K79me2/3) by Dot1^{24,25}. Structural studies showed that the interaction between Dot1 and H2BK123ub, by reducing the distance between Dot1 and the nucleosome, allows a higher methylation efficiency²⁶. Furthermore, the acetylation of

histone H4 on lysine 16 (H4K16ac) is also involved in the regulation of Dot1 activity by structuring and stabilizing the Dot1-nucleosome interaction ²⁷.

The Dot1/Gpp enzyme belongs to a large multi-subunits complex called DotCom. In mammals, this complex is composed of AF10, AF17, AF9, ENL, Skp1 and TRRAP. In *Drosophila*, the complex comprises the corresponding homologues: Alhambra (Alh, homologue of both AF10 and AF17), EAR (homologue of AF9 and ENL), NippedA (homologue of TRRAP) and SkpB for Skp1 ²⁸. We show here that the *Drosophila* complex DotCom and its histone-methyl transferase Grappa are involved in the establishment and thermal plasticity of abdominal pigmentation.

Results :

The DotCom complex is involved in pigmentation establishment

In order to test the role of the DotCom complex on the establishment of pigmentation in *Drosophila* females, we first down-regulated *gpp*, encoding the histone methyl-transferase, by using two *UAS-RNAi* transgenes (*RNAi-gpp1* and *RNAi-gpp2*) and two drivers, *y-Gal4* and *pnr-Gal4*. *pnr-Gal4* is an « early » driver, as *pnr* encodes a transcription factor expressed from the embryo to the adult, along the dorso-longitudinal line ²⁹. *y-Gal4* is a « late » driver, as *yellow* (*y*) encodes a pigmentation gene expressed in the abdominal epidermis during the second half of the pupal stage ³⁰. We observed a significant effect of both *RNAi* transgenes on pigmentation but, surprisingly, these effects were opposite depending on the driver (Figure 1, Supplementary table 1). *gpp* down-regulation with the *y-Gal4* driver induced a pigmentation decrease in A5, A6 and A7 abdominal segments, whereas with the *pnr-Gal4* driver it increased in A5 and A6. As the main difference between the two drivers is their stage of expression, this result suggests that Gpp has different roles on pigmentation depending on the developmental stage. The *UAS-RNAi-gpp1* line (hereafter called *UAS-RNAi-gpp*) was used for the following experiments, since the two *gpp RNAi* transgenes gave the same results.

To further confirm the role of the DotCom complex on the establishment of pigmentation, *UAS-RNAi* transgenes against the three other subunits of the complex were used (Figure 2, Supplementary table 1). With the *y-Gal4* driver, *ear* and *alh* down-regulation induced a decrease of pigmentation, as *gpp* down-regulation. *NippedA* down-regulation was lethal after the second larval stage. Using the *pnr-Gal4* driver, only *ear* down-regulation gave interpretable results and induced a decrease of pigmentation unlike *gpp* down-regulation. For *NippedA*, the flies presented cuticles incorrectly fused along the dorsal midline that precluded the analysis of pigmentation, whereas for *alh* no larvae hatched.

In conclusion, these results showed that the DotCom complex and notably the Grappa sub- unit that encodes a H3K79 histone methyl-transferase are involved in the establishment of abdominal pigmentation and, as expected, in some essential developmental mechanisms.

Gpp plays opposite roles on pigmentation depending on the developmental stage

The major difference between the two drivers used to down-regulate *gpp* is the developmental stage at which they are expressed. Therefore, the opposite effects of *gpp* down-regulation on pigmentation revealed by these drivers could reflect its distinct roles at different

developmental stages. To test this hypothesis, we used a temperature-sensitive Gal80 repressor, Gal80^{ts}, in combination with the *pnr-Gal4* driver. This system allowed to repress *gpp* at different developmental stages. The *UAS-RNAi-gpp* was activated by shifting tubes containing developing flies from 18°C to 29°C between day 10 of development (L2 stage) and day 21 (young adult stage), and quantifying the A6 segment pigmentation in adult females. As temperature itself affects pigmentation, control flies were treated identically. Between days 10 and 12, *gpp* down-regulation induced an increase of pigmentation in A6, similarly to the phenotype observed with *pnr-Gal4*. By contrast, between days 17 and 19, a decrease of the pigmentation was observed, similar to *y-Gal4* phenotype (Figure 3, Supplementary table 2). These results show that *gpp* is involved in different ways in pigmentation establishment during development, regulating the gene network involved in melanin production negatively during larval development and positively during the second half of the pupal life.

Gpp regulates different pigmentation genes depending on the developmental stage

As Gpp regulates melanin production, we aimed to identify the pigmentation genes targeted, directly or indirectly, by Gpp. We thus performed RT-qPCR experiments on A5, A6 and A7 epidermes of young *RNAi-gpp* females driven by *y-Gal4* or *pnr-Gal4* (Figure 4, Supplementary File 1, Supplementary Table 3). With the *y-Gal4* driver, the expression of *tan*, involved in production of brown and dark melanin, decreased, which is consistent with the pigmentation phenotype of *y-Gal4>RNAi-gpp* flies (Figure 4A). Therefore, Gpp activates *tan* expression. We have shown previously that the Bric-à-Brac transcription factors (Bab1 and Bab2) participate in the establishment and plasticity of pigmentation by repressing *tan*³¹. In order to test whether Gpp could activate *tan* through *bab* regulation, we quantified *bab1* expression (Figure 4A). No significant change in *bab1* expression was observed, suggesting that Gpp regulates *tan* independently of Bab.

With the *pnr-Gal4* driver, no significant difference in pigmentation gene expression was observed (Figure 4B). This could be due to the fact that, *pnr* being expressed only around the dorso-longitudinal line, the tissue expressing *pnr* was too diluted in the total abdominal epidermis. To bypass this issue, we observed the expression of nEGFP transgenes reporting the expression of the pigmentation genes *yellow*³², *ebony*³³ and *tan*³⁴ in *UAS-RNAi-gpp* flies driven by *pnr-Gal4* (Figure 5). No change of GFP expression was observed for *tan* and *ebony* reporters (Figure 5A-B). In contrast, for the *yellow* reporter, GFP expression increased in the expression domain of *pnr* compared to controls (Figure 5C). *yellow* being involved in production of black melanin³⁵, this observation is consistent with the pigmentation phenotype of *pnr-Gal4>RNAi-gpp* flies. Therefore, Gpp represses *yellow* expression.

The DotCom complex is involved in thermal plasticity of abdominal pigmentation

The DotCom complex being involved in pigmentation establishment, we then wondered whether it also participates in the regulatory network mediating thermal plasticity of abdominal pigmentation. To answer to this question, as thermal sensitivity of the UAS/Gal4 system prevented the use of RNAi lines, we studied a double heterozygous loss-of-function mutant for *gpp* (*gpp*^{BG00006}) and *alh* (*alh*^{J8C8}) to strongly destabilize the DotCom complex. Flies were grown at 18°C, 25°C and 29°C. Their pigmentation was quantified in A5, A6 and

A7 and compared to those of control flies (Figure 6, Supplementary Table 4, Supplementary File 2). Pigmentation of both mutant and control females were sensitive to temperature (“T effect”). The mutant females were significantly lighter than the control females (“G effect”) for A5 but not for A6 and A7. A very strong interaction, visible as the curves of the two genotypes crossed each other, was observed between genotype and temperature (“T x G effect”) for A6 and A7 and to a lesser extent for A5. This significant interaction between genotype and temperature revealed that thermal plasticity was modified in *gpp*^{BG0000}/*alh*^{J8C8} females as compared to control females. These results show that the DotCom complex participates in thermal plasticity of abdominal pigmentation.

Discussion :

We show here that the DotCom complex is involved in the establishment and thermal plasticity of the abdominal pigmentation of *Drosophila melanogaster* females. Interestingly, Gpp, the histone methyl-transferase of the complex, participates in opposite ways in the establishment of pigmentation depending on the developmental stage. Indeed, when *gpp* is down-regulated from the L2 to the L3 stages, melanin production is higher, whereas when it is down-regulated later, during the second half of the pupal life, melanin production is lower. These two effects on pigmentation are mediated by the regulation of two pigmentation genes involved in melanin production, *i.e.* *yellow* for the early effect and *tan* for the late effect. Thus, Gpp regulates different targets during the establishment of female *D. melanogaster* abdominal pigmentation. It is likely that *yellow* is not a direct target of Gpp, as it is expressed in late pupae whereas its deregulation is a consequence of Gpp activity from L2 to L3 larval stage. Concerning *tan*, we observed no significant modification of the H3K79me3 level on its promoter in *y-Gal4 > RNAi-gpp* females (Supplementary Figure 1, Supplementary File 3, Supplementary table 3), suggesting that, like *yellow*, *tan* is not directly regulated by Gpp. In contrast, we have shown previously that the histone-methyltransferase Trx participates in the deposition of the H3K4me3 active mark on *tan*⁹. The opposite roles of Gpp through the regulation of distinct pigmentation genes could explain its involvement in the thermal plasticity of abdominal pigmentation thermal plasticity. Indeed, the expression of *yellow* and *tan* is modulated by temperature^{9,10}. Temperature might therefore modulate the balance between the two regulatory roles of Grappa on pigmentation, as it was shown for Abdominal- B who plays also opposite roles on cuticle pigmentation depending on the temperature³⁶.

It would be informative to use mutant flies deficient for the catalytic activity of Gpp to identify, at distinct developmental stages and different temperatures, the direct targets of Gpp. In addition, mechanistic insights could be gained by the study of Bre1 and MOF, depositing H2BK123ub and H4K16ac respectively, that facilitate H3K79 methylation by Gpp. Furthermore, a H3K79 demethylase, KDM2B, has recently been characterized in human cells³⁷. It would be interesting to identify the *Drosophila* homologue of KDM2B and test its role on the establishment and plasticity of abdominal pigmentation.

Material and methods

Fly stocks

A *w¹¹¹⁸* inbred line was used as control. The *pnr-Gal4* (BL-3039)²⁹, *y-Gal4* (BL-44267), *UAS-RNAi-alh* (BL-39057), *UAS-RNAi-gpp1* (BL-42919), *UAS-RNAi-gpp2* (BL-34842), *UAS-RNAi-ear* (BL-28068), *UAS-RNAi-NippedA* (BL-34849), *alh^{J8C8}* (BL-12118) and *gpp^{BG00006}* (BL-12802) lines were from the Bloomington Stock Center. In order to be tested in the same genetic background than the *w¹¹¹⁸* control, *alh^{J8C8}* and *gpp^{BG00006}* alleles were introgressed in *w¹¹¹⁸* for 10 generations by following eye colour, as these two alleles are marked by *mini-white*. The *Gal80^{ts}-Gal4* transgene was previously described⁹. The efficiency of the *UAS-RNAi-gpp1* transgene was validated by RT-qPCR (Supplementary Figure 2, Supplementary File 4, Supplementary table 3). The *t_{MSE}-nEGFP*, *ebony-nEGFP* (*ebony ABC+intron*) and *yellow-nEGFP* (*yellow-wing-body-nEGFP*) reporter transgenes were previously described³²⁻³⁴.

Quantification of gene expression by RT-qPCR

Total RNA were extracted from pools of 30 dissected posterior abdominal epidermes of females (A5, A6 and A7) with the RNAeasy Mini kit (Qiagen). Three replicates were performed in all experiments. cDNAs were synthesized with the LunaScript RT SuperMix kit (New England Biolabs) using random primers. RT-qPCR experiments were performed in a CFX96 system using SsoFast EvaGreen SuperMix (Biorad). Expression was quantified following the Pfaffl method³⁸ using the geometric mean of the expression of *RP49* and *Spt6* reference genes for normalization³⁹. All primers are listed in Supplementary table 3.

Cuticle and epidermis preparations

5 days old adult females were stored in ethanol 70% during ten days. Abdominal cuticles were cut just beyond the dorsal midline and dehydrated in ethanol 100% during 5 minutes. After dehydration, cuticles were mounted in Euparal (Roth). For nEGFP observation, pupal and adult abdomens were dissected in PBS, fixed 20 minutes in 3.7% paraformaldehyde in PBS, washed three times 10 minutes in PBS, and mounted in Mowiol®.

Image acquisition and quantification

Cuticles were imaged as described in⁹. Abdominal epidermes of females expressing nEGFP under the control of *t_{MSE}*, *yellow* and *ebony* regulatory sequences were imaged using a macro-apotome (Zeiss). Young adult females were imaged for *t_{MSE}-nEGFP* and *ebony-nEGFP* and female pupae for *yellow-nEGFP* as these genes are not expressed at the same developmental stage.

Chromatin immunoprecipitation experiments

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments were performed as previously described⁹, with 3 µg of each antibody. Rabbit IgGs (Diagenode) as negative control and anti- H3K79me3 (C15410068, Diagenode) were used. Three replicates of 50 abdominal epidermes (A5, A6 and A7) of young females were analyzed. qPCR were performed on a CFX96 system using the Luna Universal qPCR Master Mix (BioLabs). Primers are listed in Supplementary table 3. Data were normalized against input chromatin.

Statistical analyses

Gene expression quantifications were compared by t-tests using the appropriate parameters depending on homogeneity of variances as assessed with Levene tests. To analyse the effect of *alh/gpp* double mutants on pigmentation plasticity, a two-way ANOVA with genotype and temperature as factors was used. Variance homogeneity was checked using Levene tests and normality of residuals using Shapiro-Wilk tests. When variances were not homogeneous, a non-parametric ANOVA on aligned rank transformed data was performed. All ANOVA tests were performed using RStudio (Supplementary File 2).

References:

1. Pigliucci, M. *Phenotypic Plasticity, Beyond Nature and Nurture*. (2001).
2. Gunter, H. M., Schneider, R. F., Karner, I., Sturmbauer, C. & Meyer, A. Molecular investigation of genetic assimilation during the rapid adaptive radiations of East African cichlid fishes. *Mol. Ecol.* **26**, 6634–6653 (2017).
3. Aubret, F. & Shine, R. Genetic assimilation and the postcolonization erosion of phenotypic plasticity in island tiger snakes. *Curr Biol* **19**, 1932–6 (2009).
4. Heil, M. *et al.* Evolutionary change from induced to constitutive expression of an indirect plant resistance. *Nature* **430**, 205–208 (2004).
5. Corl, A. *et al.* The Genetic Basis of Adaptation following Plastic Changes in Coloration in a Novel Environment. *Curr. Biol. CB* **28**, 2970-2977.e7 (2018).
6. Gibert, J.-M. The flexible stem hypothesis: evidence from genetic data. *Dev. Genes Evol.* **227**, 297–307 (2017).
7. West-Eberhard, M. J. *Developmental plasticity and evolution*. (Oxford University Press, 2003).
8. Gibert, P., Moreteau, B. & David, J. R. Developmental constraints on an adaptive plasticity: reaction norms of pigmentation in adult segments of *Drosophila melanogaster*. *Evol Dev* **2**, 249–60 (2000).
9. Gibert, J.-M., Mouchel-Vielh, E., De Castro, S. & Peronnet, F. Phenotypic Plasticity through Transcriptional Regulation of the Evolutionary Hotspot Gene *tan* in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet.* **12**, e1006218 (2016).
10. Gibert, J.-M., Mouchel-Vielh, E. & Peronnet, F. Modulation of yellow expression contributes to thermal plasticity of female abdominal pigmentation in *Drosophila melanogaster*. *Sci. Rep.* **7**, 43370 (2017).
11. True, J. R. *et al.* *Drosophila tan* Encodes a Novel Hydrolase Required in Pigmentation and Vision. *PLoS Genet* **1**, e63 (2005).
12. Simola, D. F. *et al.* Epigenetic (re)programming of caste-specific behavior in the ant *Camponotus floridanus*. *Science* **351**, (2016).
13. Bonasio, R. *et al.* Genome-wide and Caste-Specific DNA Methylomes of the Ants

- Camponotus floridanus and Harpegnathos saltator. *Curr Biol* **22**, 1755–64 (2012).
14. Leung, A. *et al.* Open chromatin profiling in mice livers reveals unique chromatin variations induced by high fat diet. *J Biol Chem* (2014) doi:10.1074/jbc.M114.581439.
 15. Lacoste, N., Utley, R. T., Hunter, J. M., Poirier, G. G. & Côte, J. Disruptor of telomeric silencing-1 is a chromatin-specific histone H3 methyltransferase. *J. Biol. Chem.* **277**, 30421–30424 (2002).
 16. Shanower, G. A. *et al.* Characterization of the grappa gene, the Drosophila histone H3 lysine 79 methyltransferase. *Genetics* **169**, 173–84 (2005).
 17. Ng, H. H. *et al.* Lysine methylation within the globular domain of histone H3 by Dot1 is important for telomeric silencing and Sir protein association. *Genes Dev* **16**, 1518–27 (2002).
 18. van Leeuwen, F., Gafken, P. R. & Gottschling, D. E. Dot1p modulates silencing in yeast by methylation of the nucleosome core. *Cell* **109**, 745–756 (2002).
 19. Jones, B. *et al.* The histone H3K79 methyltransferase Dot1L is essential for mammalian development and heterochromatin structure. *PLoS Genet.* **4**, e1000190 (2008).
 20. Steger, D. J. *et al.* DOT1L/KMT4 recruitment and H3K79 methylation are ubiquitously coupled with gene transcription in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 2825–2839 (2008).
 21. Wood, K., Tellier, M. & Murphy, S. DOT1L and H3K79 Methylation in Transcription and Genomic Stability. *Biomolecules* **8**, 11 (2018).
 22. Malla, A. B. *et al.* DOT1L bridges transcription and heterochromatin formation at mammalian pericentromeres. *EMBO Rep.* **24**, e56492 (2023).
 23. Schübeler, D. *et al.* The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes Dev.* **18**, 1263–1271 (2004).
 24. Nakanishi, S. *et al.* Histone H2BK123 monoubiquitination is the critical determinant for H3K4 and H3K79 trimethylation by COMPASS and Dot1. *J. Cell Biol.* **186**, 371–377 (2009).
 25. Valencia-Sánchez, M. I. *et al.* Structural Basis of Dot1L Stimulation by Histone H2B Lysine 120 Ubiquitination. *Mol. Cell* **74**, 1010-1019.e6 (2019).
 26. Anderson, C. J. *et al.* Structural Basis for Recognition of Ubiquitylated Nucleosome by Dot1L Methyltransferase. *Cell Rep.* **26**, 1681-1690.e5 (2019).
 27. Valencia-Sánchez, M. I. *et al.* Regulation of the Dot1 histone H3K79 methyltransferase by histone H4K16 acetylation. *Science* **371**, eabc6663 (2021).
 28. Mohan, M. *et al.* Linking H3K79 trimethylation to Wnt signaling through a novel Dot1-containing complex (DotCom). *Genes Dev.* **24**, 574–589 (2010).
 29. Calleja, M. *et al.* Generation of medial and lateral dorsal body domains by the pannier gene of Drosophila. *Development* **127**, 3971–80 (2000).

30. Wittkopp, P. J., True, J. R. & Carroll, S. B. Reciprocal functions of the *Drosophila* yellow and ebony proteins in the development and evolution of pigment patterns. *Development* **129**, 1849–58 (2002).
31. De Castro, S., Peronnet, F., Gilles, J.-F., Mouchel-Vielh, E. & Gibert, J.-M. bric à brac (bab), a central player in the gene regulatory network that mediates thermal plasticity of pigmentation in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet.* **14**, e1007573 (2018).
32. Jeong, S., Rokas, A. & Carroll, S. B. Regulation of body pigmentation by the Abdominal-B Hox protein and its gain and loss in *Drosophila* evolution. *Cell* **125**, 1387–99 (2006).
33. Rebeiz, M., Pool, J. E., Kassner, V. A., Aquadro, C. F. & Carroll, S. B. Stepwise modification of a modular enhancer underlies adaptation in a *Drosophila* population. *Science* **326**, 1663–7 (2009).
34. Jeong, S. *et al.* The evolution of gene regulation underlies a morphological difference between two *Drosophila* sister species. *Cell* **132**, 783–93 (2008).
35. Riedel, F., Vorkel, D. & Eaton, S. Megalin-dependent yellow endocytosis restricts melanization in the *Drosophila* cuticle. *Development* **138**, 149–58 (2011).
36. Gibert, J. M., Peronnet, F. & Schlotterer, C. Phenotypic Plasticity in *Drosophila* Pigmentation Caused by Temperature Sensitivity of a Chromatin Regulator Network. *PLoS Genet* **3**, e30 (2007).
37. Kang, J.-Y. *et al.* KDM2B is a histone H3K79 demethylase and induces transcriptional repression via sirtuin-1-mediated chromatin silencing. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **32**, 5737–5750 (2018).
38. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45 (2001).
39. Vandesompele, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**, RESEARCH0034 (2002).

Acknowledgments:

We thank all members of the Gibert/Peronnet team for stimulating discussions and Frédérique Peronnet for critical reading of the manuscript.

Author contributions:

EMV and JMG jointly supervised the project. RN performed experiments and acquired data. RN, EMV and JMG analysed and interpreted data. RN, EMV and JMG wrote the article.

Funding:

The project was funded by CNRS and Sorbonne Université. RN was funded by a PhD fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Data availability statement:

All data generated or analysed during this study are included in this published article [and its supplementary information files]

Competing interests statement:

The authors declare no competing interest.

Figure legends:

Figure 1: The methyl-transferase Gpp is involved in the establishment of pigmentation.

A) Abdominal cuticles of females either control ($w^{1118}; y-Gal4/+; pnr-Gal4/+$) or RNAi against *gpp* (*UAS-RNAi-gpp1* and *UAS-RNAi-gpp2*) driven by *y-Gal4* and *pnr-Gal4*. Cuticles were cut just beyond the dorsal midline. Hemi-abdomens are shown. Dashed white lines mark the right borders of the *pnr* driver expression domain. Abdominal tergites A5 to A7 are indicated. A: anterior; P: posterior; V: ventral; D: dorsal. B, C) Quantification of A5, A6 and A7 pigmentation of *UAS-RNAi-gpp1* and *UAS-RNAi-gpp2* females driven by *y-Gal4* (B) or *pnr-Gal4* (C), compared to *y-Gal4/+* and *pnr-Gal4/+* controls (30 females *per* genotype, t-test; ***: $p < 0.001$).

Figure 2: Subunits of the DotCom complex are involved in the establishment of pigmentation.

A) Abdominal cuticles of control females ($w^{1118}; y-Gal4/+; pnr-Gal4/+$) and females in which genes encoding subunits of the DotCom complex have been inactivated using *RNAi* transgenes driven by *y-Gal4* and *pnr-Gal4*. Cuticles were cut just beyond the dorsal midline. Hemi-abdomens are shown. Dashed white lines mark the right borders of *pnr* driver expression domain. Abdominal tergites A5 to A7 are indicated. A: anterior; P: posterior; V: ventral; D: dorsal. The crosses indicate lethality. B, C) Quantification of A5, A6 and A7 pigmentation of *RNAi* females driven either by *y-Gal4* (B) or *pnr-Gal4* (C), compared to *y-Gal4/+* and *pnr-Gal4/+* controls ($n = 30$ *per* genotype, t-tests; ***: $p < 0.001$).

Figure 3: Gpp plays opposite roles on pigmentation depending on the developmental stage.

A) Quantification of A6 pigmentation in *UAS-RNAi-gpp* flies driven by *Gal80^{ts}; pnr-Gal4*. The RNAi transgene was activated by shifting a pool of developing flies from 18°C to 29°C each day, from day 10 (L2 stage) to day 21 (adult stage). n = 30 *per* condition, t-test; ***: p<0.001. B) Abdominal cuticles of *Gal80^{ts}; pnr-Gal4* control and *RNAi-gpp* females with the corresponding day of activation of the RNAi transgene.

Figure 4: Gpp activates the expression of the pigmentation gene *tan*.

RT-qPCR quantification of pigmentation gene and *bab1* expression in posterior abdomen epidermes (A5, A6 and A7 segments) of young *RNAi-gpp* females driven by *y-Gal4* (A) or *pnr-Gal4* (B) (n = 3, t-test; ***: p<0.001). The geometric mean of *RP49* and *Spt6* reference gene expression was used for normalization.

Figure 5: Gpp represses the expression of the pigmentation gene *yellow*.

In A, B and C, the dashed white lines represent the right hemi-segments. The dashed red line marks the limit between the dorsal *pnr-Gal4* expression domain (left part of the line) and the lateral region (right part of the line) used as an internal control. A - B) Effect of *gpp* down-regulation on *tan* (A) and *ebony* (B) nEGFP reporters. Compared to the control *pnr-Gal4* (left), *gpp* down-regulation (right) has no effect on the expression of nEGFP driven neither by *tan* nor by *ebony*. C) Effect of *gpp* down-regulation on the *yellow* nEGFP reporter transgene. Compared to the control *pnr-Gal4* (left), *gpp* down-regulation (right) increases the expression of nEGFP, which extends more anteriorly in the *pnr-Gal4* expression domain.

Figure 6: The DotCom complex plays a role in the thermal plasticity of abdominal pigmentation.

Quantification of A5, A6 and A7 pigmentation of *gpp^{BG00006}/alh^{18C8}* mutant control females raised at 18°C, 25°C or 29°C (n=30 *per* condition). G: effect of genotype; T: effect of temperature; T x G: effect of the interaction between genotype and temperature. ANOVA on aligned rank transformed data was performed for A5. ANOVA were performed for A6 and A7 segments. * p<0.05; ***: p<0.001. NS: non significant.

Figure 1

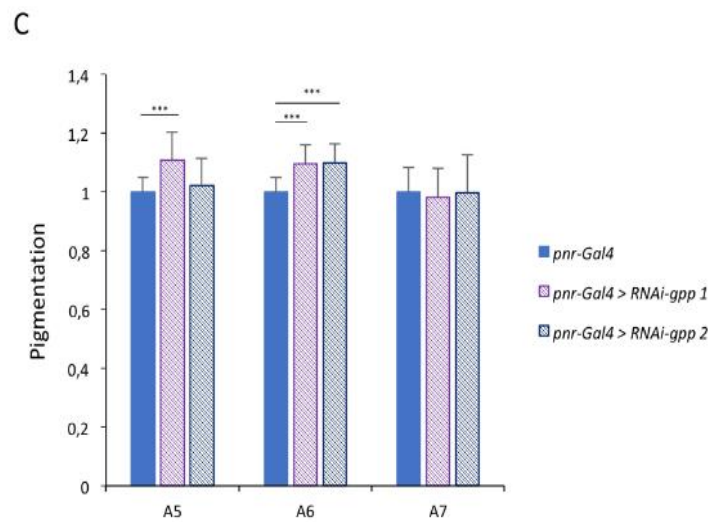
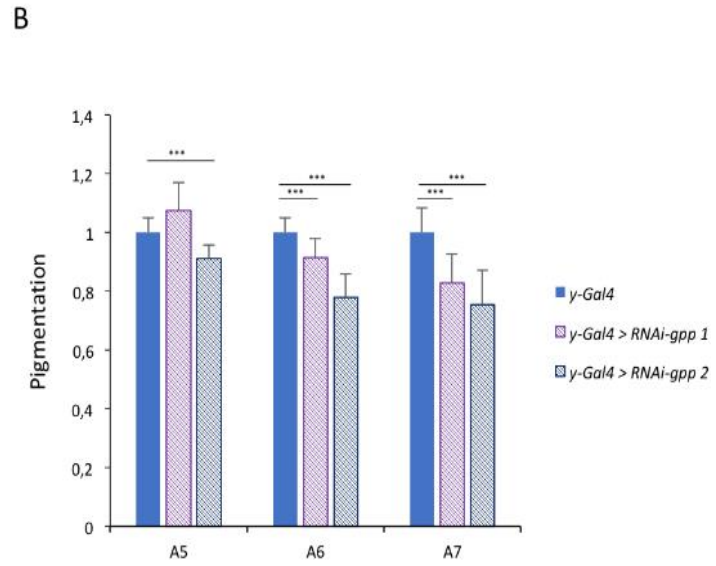
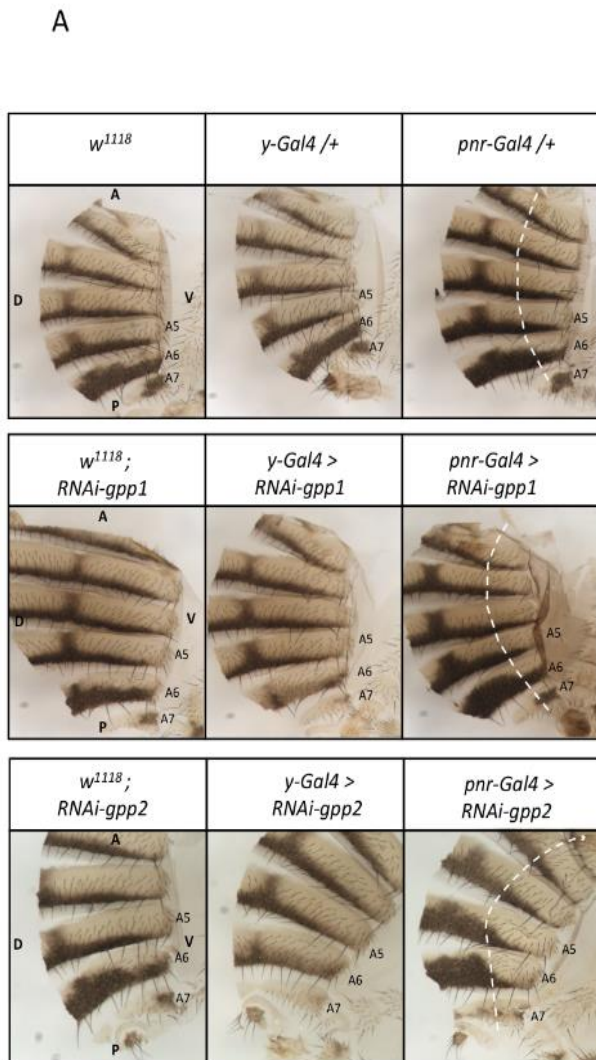
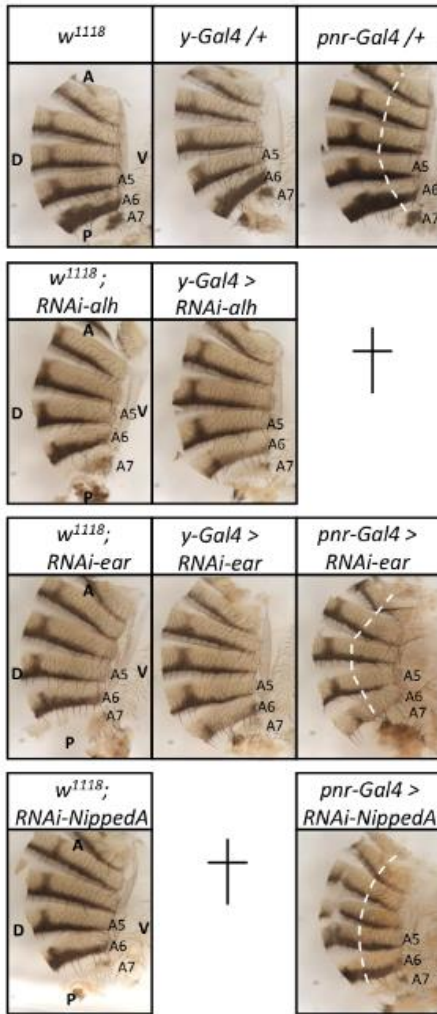
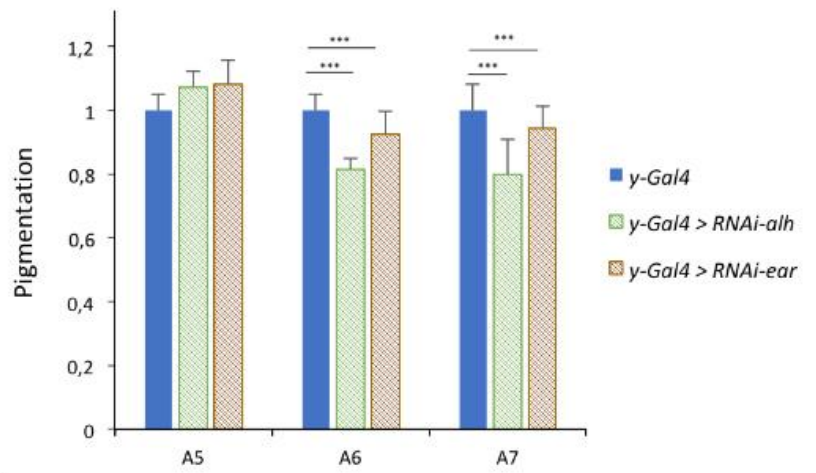


Figure 2

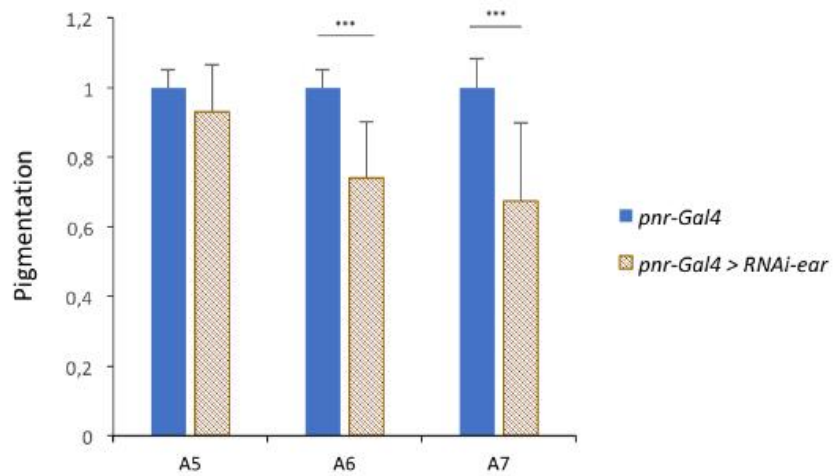
A



B



C



A

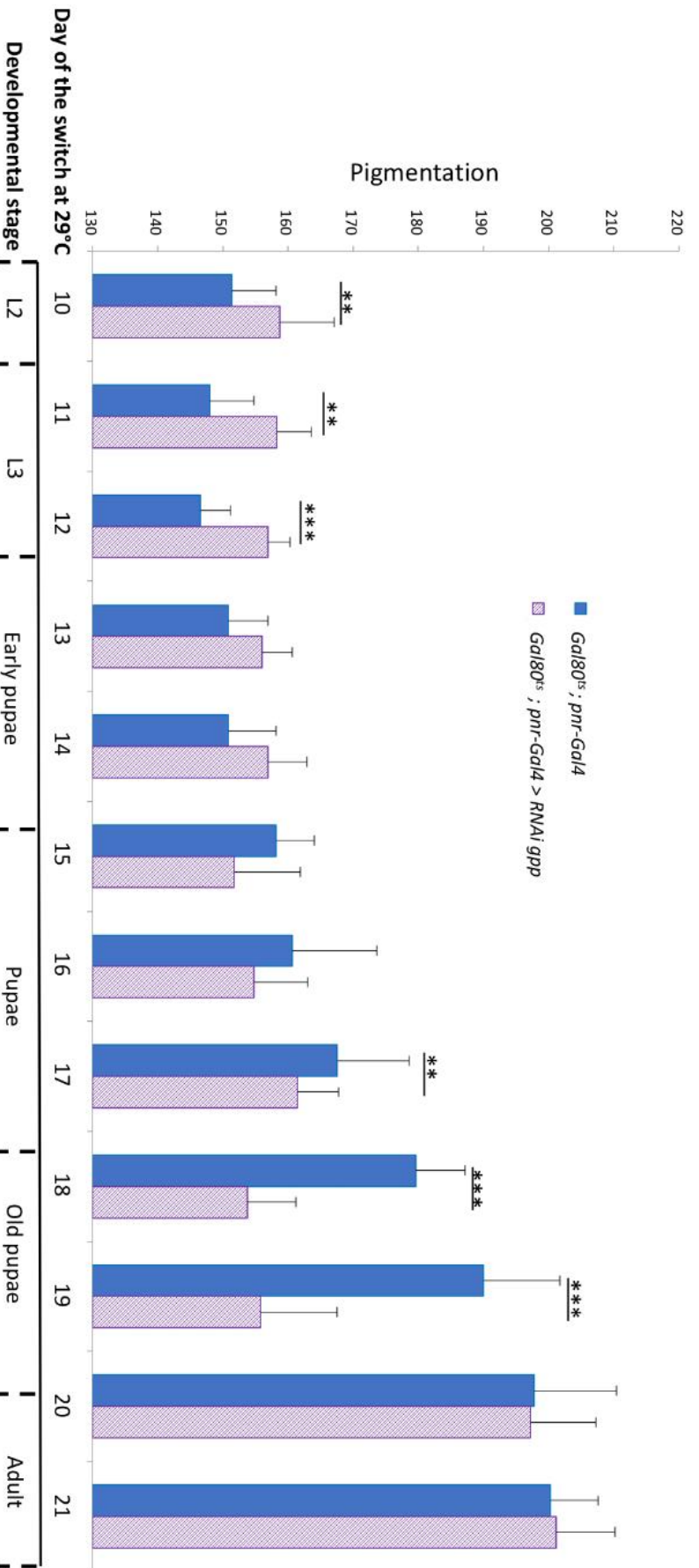


Figure 3

B

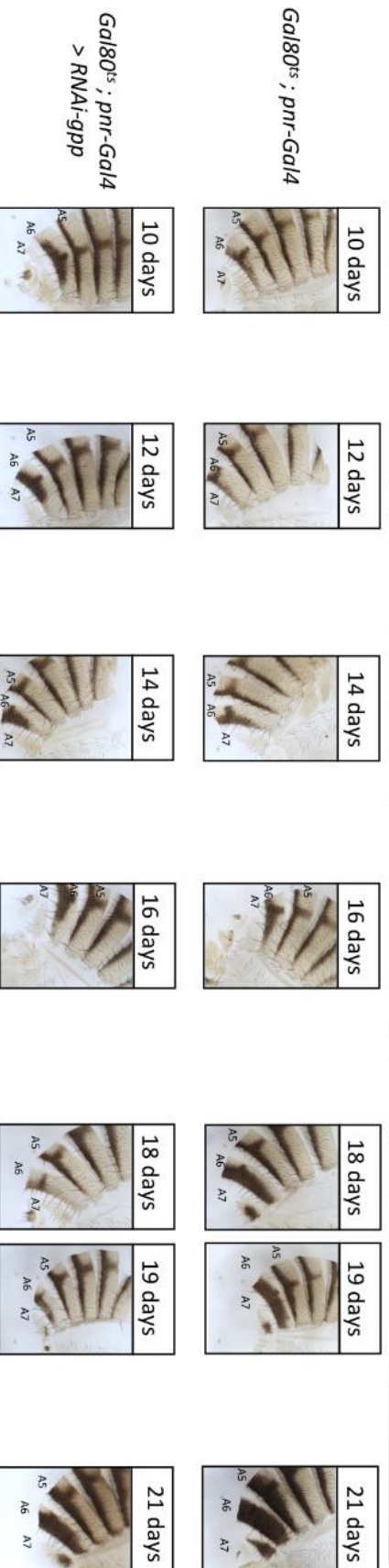


Figure 4

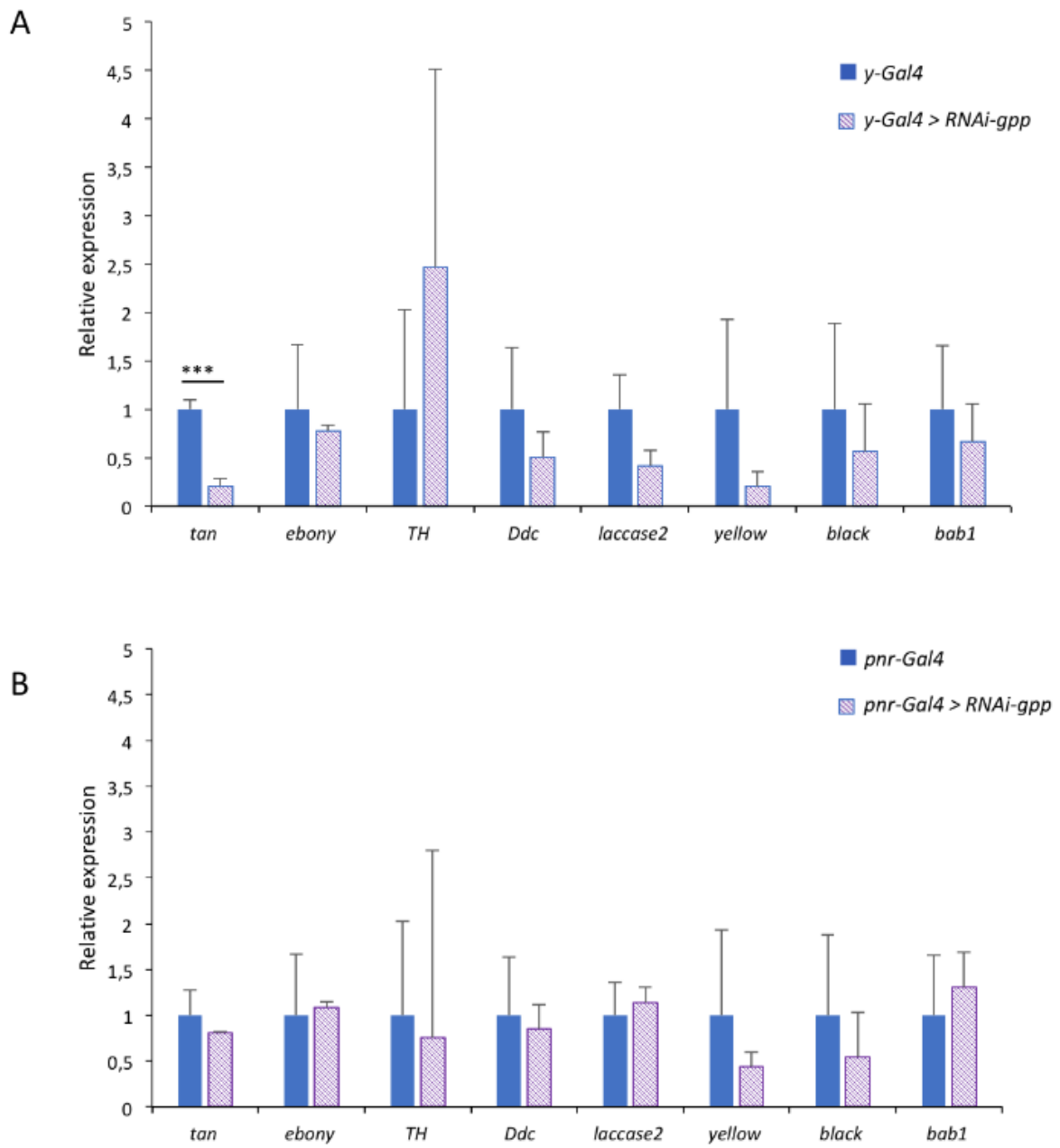


Figure 5

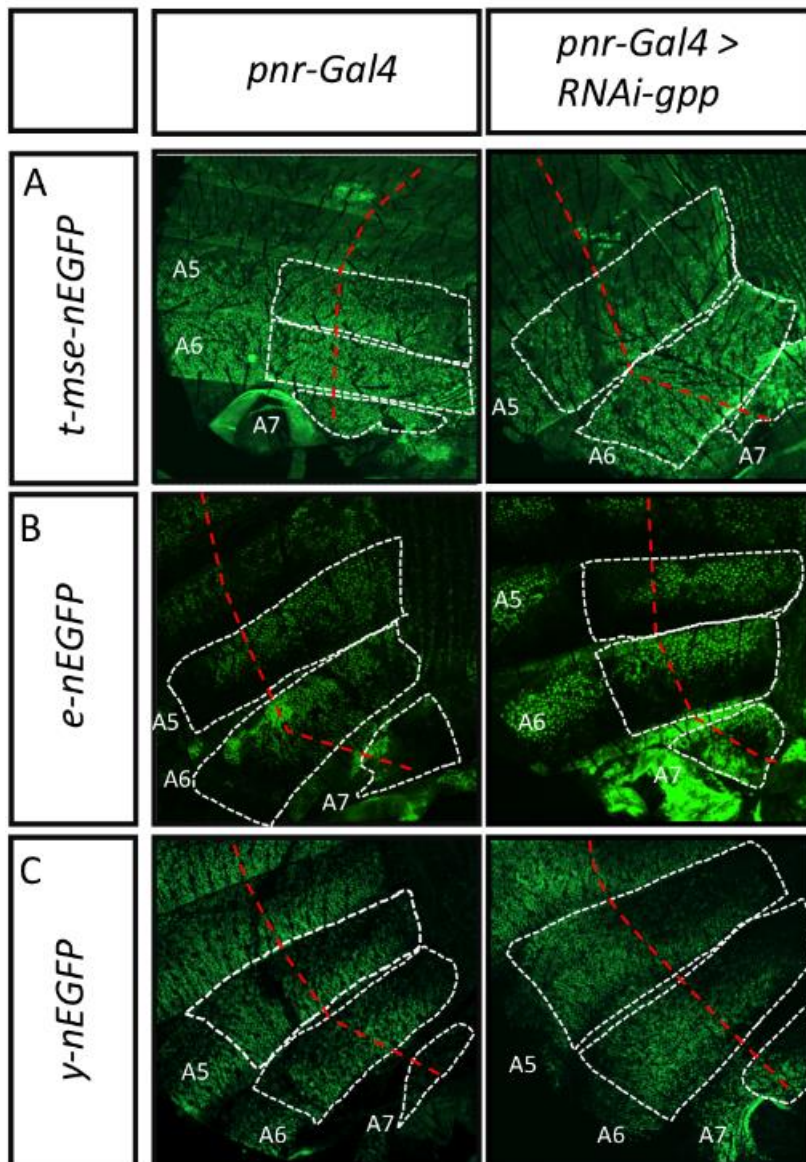
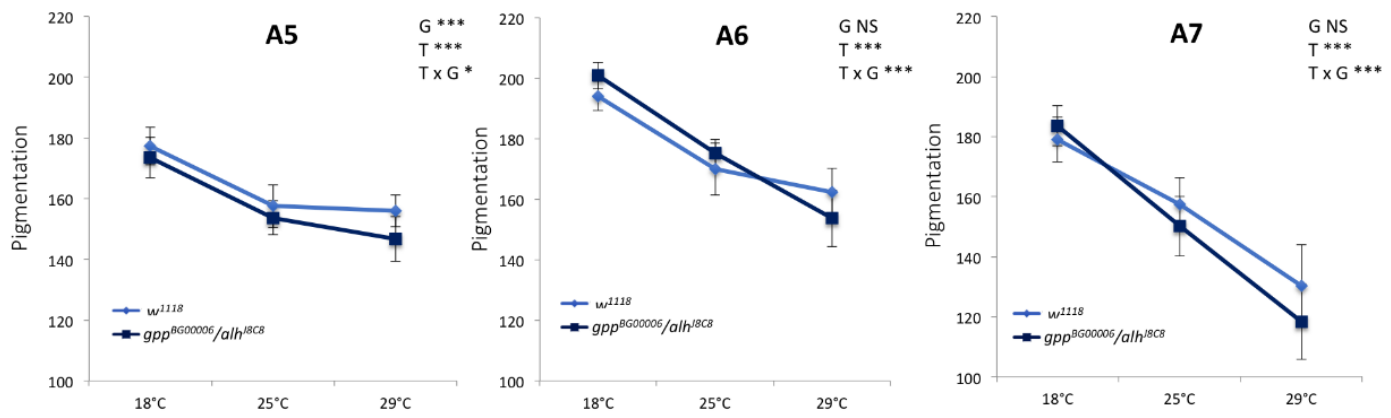
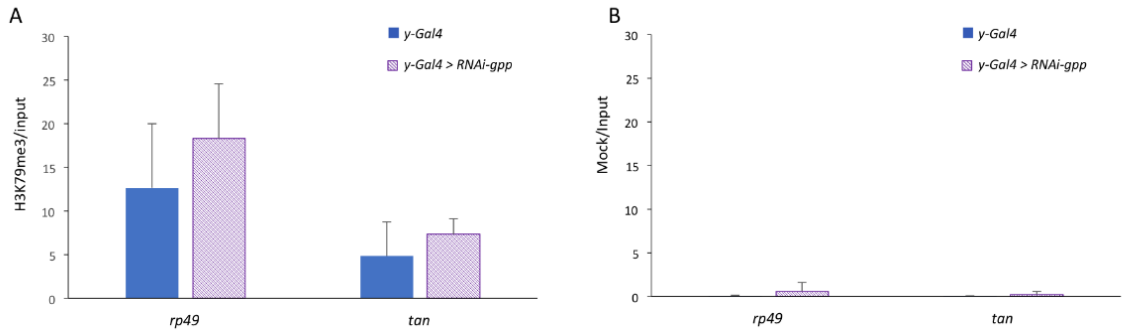
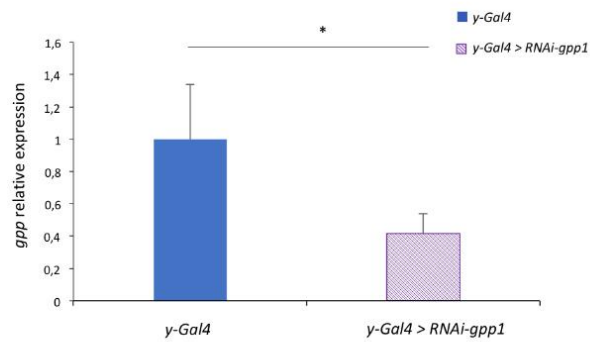


Figure 6





Supplementary Figure 1: *gpp* down-regulation does not modify the level of H3K79me3 on *tan* promoter. Chromatin immunoprecipitation experiments (ChIP-qPCR) were performed on abdominal epidermis of young *y-Gal4>RNAi-gpp* and *y-Gal4/+* females grown at 25°C. H3K79me3 IP (A) and negative control IP (anti-Rabbit IgGs) (B) signals were normalized on total chromatin (input) signals. H3K79me level on *rp49* was used as a control. The graph represents the mean of three independent experiments, with error bars corresponding to standard deviations.



Supplementary Figure 2: Quantification by RT-qPCR of *gpp* expression to validate the efficiency of the *RNAi-gpp1* transgene. RT-qPCR quantification of *gpp* expression in posterior abdomen epidermis (A5, A6 and A7 segments) of young females, *y-Gal4/+* (controls) or *y-Gal4 > RNAi-gpp1* (n = 3, t-test; *: p<0.05). Expression was normalized with the geometric mean of *RP49* and *Spt6* expression.

RESULTATS PARTIE II

Résultats partie II – Etude du rôle de *little imaginal disc (lid)* dans le réseau de régulation de la plasticité thermique de la pigmentation abdominale chez *Drosophila melanogaster*

Le gène *lid/kdm5* a été trouvé avant mon arrivée au laboratoire dans un crible visant à identifier des modificateurs de la chromatine et des facteurs de transcription impliqués dans le réseau de régulation des gènes de la pigmentation et sa plasticité (Sandra de Castro, thèse Sorbonne Université, 2018). Ce gène code une histone lysine déméthylase (KDM) qui retire la marque activatrice H3K4me3 déposée notamment par l'histone méthyl-transférase Trx. Au cours de ma thèse, j'ai complété les données génétiques et moléculaires déjà obtenues au laboratoire visant à démontrer l'implication de *lid* dans l'établissement de la pigmentation. Par ailleurs, afin de déterminer les mécanismes d'action de *lid* dans ce processus, j'ai généré et analysé le transcriptome d'épidermes abdominaux d'individus RNAi pour *lid* et *trx*. De manière inattendue, ce travail m'a permis de mettre en évidence l'implication dans l'établissement de la pigmentation de certains gènes de la voie des piRNA. Ce travail, qui n'est pas encore totalement finalisé, sera l'objet d'une publication dont je serai co-premier auteur.

I) L'histone déméthylase Lid/KDM5

Le gène *lid/kdm5* (que j'appellerai par la suite *lid*) a été identifié au cours d'un crible génétique recherchant de nouveaux gènes du groupe Trithorax (Gildea et al., 2000). Il code l'histone lysine déméthylase KDM5 qui retire la marque d'histone H3K4me3 principalement trouvée au niveau des promoteurs des gènes actifs (Lee et al., 2007 ; Secombe et al., 2007 ; Klein et al., 2014). Les protéines KDM5 sont une famille de protéines conservées au cours de l'évolution. Chez la drosophile, KDM5 est codée par un seul gène

alors que chez les mammifères il existe 4 gènes paralogues *KDM5A*, *B*, *C* et *D*. Chez *C. elegans*, le gène *RBR-2* code l'homologue des protéines KDM5A et KDM5B (Li et al., 2010 ; Christensen et al., 2007; Greer et al., 2010). KDM5 est composée des domaines Jumonji N et Jumonji C qui, ensemble, médient son activité catalytique, d'un domaine PHD qui reconnaît la lysine 3 de l'histone H4 et d'un domaine ARID impliqué dans la fixation à l'ADN. D'autres domaines, comme le domaine C₅HC₂, sont conservés mais leur fonction reste inconnue (Figure 34) (Lloret-Llinares et al., 2008 ; Scibetta et al., 2007 ; Wang et al., 2009 ; Drelon et al., 2018).

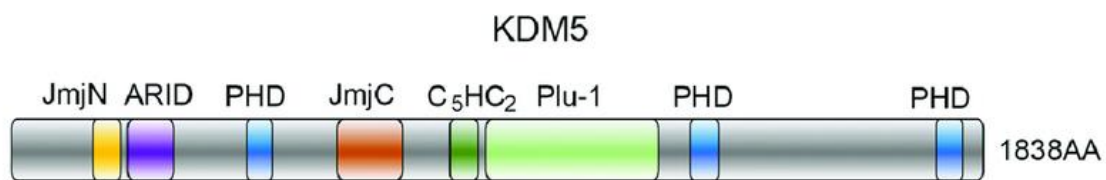


Figure 34 : Les domaines fonctionnels de Lid/KDM5. Lid possède deux domaines Jumonji (JmjN et JmjC) requis pour l'activité déméthylase. Le domaine ARID est un domaine de fixation à l'ADN. Les domaines PHD sont des domaines de liaison aux protéines, notamment à H3K4me_{2/3} (Drelon et al., 2018).

Chez l'humain, la dérégulation des gènes de la famille KDM5 est impliquée dans de nombreuses pathologies comme le cancer (Blair et al., 2011). Par ailleurs, on retrouve chez certains patients atteints de déficiences intellectuelles des mutations pertes de fonction pour KDM5A, KDM5B et KDM5C, KDM5 étant impliquée dans le développement et la fonction neuronale (Vallianatos et Iwase 2015). Chez la souris, des mutants pour KDM5B et KDM5C présentent aussi des problèmes de développement et de fonctionnement neuronal (Harrington et al., 2022 ; Iwase et al., 2016 ; Scandaglia et al., 2017). Des phénotypes similaires, observés chez des mutants pour Kdm5 chez *D. melanogaster*, ont fait de ce modèle une bonne alternative pour étudier ces maladies et le rôle de la famille KDM5 en général. Par exemple, il a été montré qu'une perte de fonction

de l'activité déméthylase pour *lid* (*kdm5^{A512P}*) est impliqué dans la perte de mémoire et des défauts de certaines fonctions neuronales (Zamurrad et al., 2018). Chez *D. melanogaster*, la diminution des niveaux de *lid* à l'aide de mutants perte de fonction ou de RNAi réduit la viabilité, montrant que *lid* est nécessaire au développement (Gildea et al. 2000 ; Li et al. 2010 ; Lloret-Llinares et al. 2012). Plusieurs études montrent l'importance de l'activité déméthylase de Lid dans le développement. La majorité des cibles de la lignée portant la mutation *kdm5^{A512P}* ou la mutation *kdm5^{JMJC*}* (produisant une protéine sans activité déméthylase) sont communes et présentent des phénotypes identiques suggérant que l'activité déméthylase est la cause principale des défauts de cette mutations (Zamurrad et al., 2018). D'autres études ont montré que l'activité déméthylase de Lid est nécessaire pour le développement des neurones immatures et des cellules souches non différenciées en « Mushroom Body » (Hatch et al., 2021). Lid est aussi impliquée dans le développement des glandes prothoraciques qui sécrètent l'ecdysone, hormone nécessaire au développement des drosophiles (Drelon et al., 2019). Enfin l'activité déméthylase de Lid est impliquée dans d'autre mécanismes que le développement comme dans la régulation de la voie IMD/Rel qui régule le contrôle immunitaire et le maintien du microbiote (Chen et al., 2019).

lid a été identifié au cours d'un crible génétique recherchant des gènes activateur de la transcription (groupe Trithorax) (Gildea et al., 2000). Néanmoins, l'implication de *lid* dans la régulation positive des gènes parait contre intuitif au vu de son activité de déméthylase de la marque activatrice H3K4me3. Un modèle propose que le retrait de la marque H3K4me3 par Lid soit nécessaire au cycle de transcription (Figure 35) (Lloret-Llinares et al., 2012). Lors du développement, Lid se fixe au niveau des sites d'initiations de la transcription (TSS) de certains gènes du développement transcriptionnellement actifs. Lorsque Lid n'est pas présente le niveau de H3K4me3 augmente et l'expression de ces

gènes diminue. Ces gènes sont aussi régulés par ASH2, une protéine des complexes SET1/COMPASS et COMPASS-like (Tableau 2), impliqués dans le dépôt de H3K4me3 respectivement par Set1, Trx et Trr (Beltran et al., 2007; Shilatifard, 2012). Ces résultats suggèrent que Lid et ASH2 interviennent ensemble dans la régulation positive de ces gènes. Il a été montré qu'ils interviennent à différents moments du cycle de transcription. ASH2 est dans un premier temps recrutée au TSS des gènes au moment de l'initiation de la transcription et participe au dépôt de H3K4me3. A la fin du cycle de transcription Lid est recrutée sur ces mêmes cibles pour retirer la marque H3K4me3 et permettre un nouveau cycle de transcription .

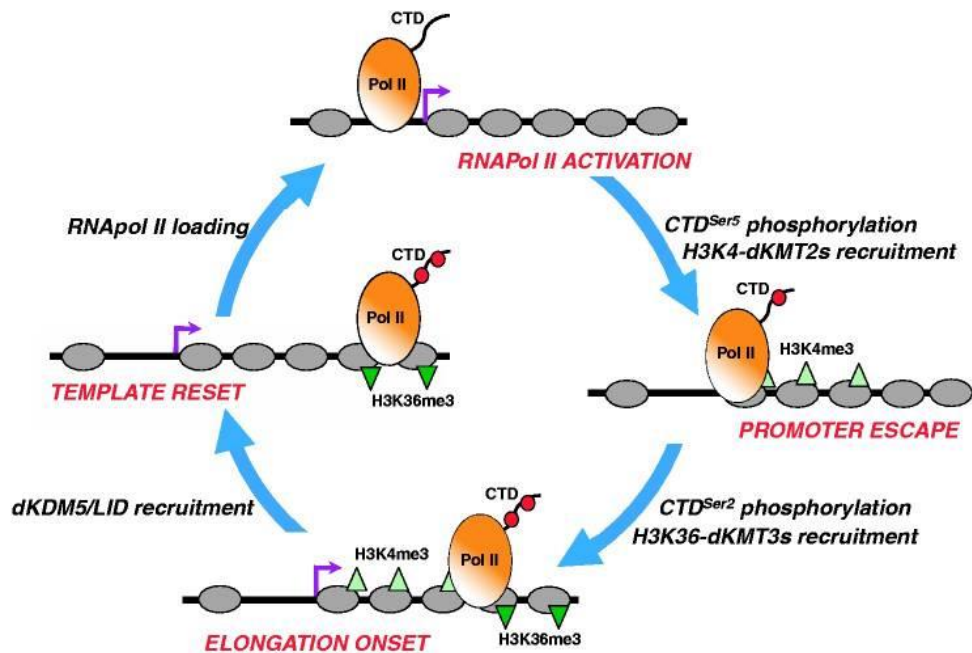


Figure 35 – Mécanisme de coordination de Lid et ASH2 dans la régulation de la transcription au cours du développement. Le complexe ASH2 dépose la marque H3K4me3 ce qui induirait l'activation de la transcription. A la fin de l'élongation, Lid est recrutée au niveau des mêmes gènes cibles d'ASH2 pour effacer les marques H3K4me3, signe que la transcription est terminée et peut recommencer (Lloret-Llinares et al., 2012).

Chez la souris, KDM5 est nécessaire pour le renouvellement rapide de H3K4me3 (Wang et al., 2023). En effet, des travaux sur des cellules souches embryonnaires de souris déplétées en KDM5A et KDM5B ont montré une augmentation du temps de persistance de la marque H3K4me3 au niveau du génome, et, de plus, ces mêmes cellules ont montré un retard du retrait de H3K4me3 à l'échelle du génome entier (Wang et al., 2023). Il en découle une augmentation de la pause de l'ARN polymérase II et un ralentissement de l'élongation (Wang et al., 2023).

Mais en plus de ces rôles impliquant son activité déméthylase, KDM5 est impliquée dans des mécanismes importants indépendamment des domaines PHD et JMJC donc de son activité déméthylase (Li et al. 2010 ; Drelon et al., 2018). Des études chez *D. melanogaster* sur Lid montrent qu'elle peut également réguler la transcription en s'associant à d'autres protéines indépendamment de son activité déméthylase. Une étude de protéomique visant à comprendre les mécanismes par lesquels la protéine chaperonne ASF1 est impliquée dans la régulation des gènes du développement a mis en évidence une interaction entre Lid et SIN3A, un régulateur de la transcription, en tant que corépresseur dans un complexe (Moshkin et al., 2009). Néanmoins leur rôle dans la répression transcriptionnelle via une modification des histones était flou. Pour mieux comprendre ce rôle, une première étude a regardé si Lid et SIN3A étaient impliquées dans des processus similaires (Gajan et al., 2016). Ces travaux confirment que Lid et SIN3A interagissent ensemble. Elles jouent des rôles similaires dans la prolifération cellulaire et le développement des ailes, et, de plus, des analyses transcriptomiques montrent qu'elles régulent des cibles communes, notamment des gènes impliqués dans les processus de

résistance au stress oxydatif (Liu et al., 2014 ; Liu et Secomb 2015 ; Gajan et al., 2016). En 2020 un crible génétique visant à identifier de nouveaux gènes impliqués dans la transition ovocyte-zygotique chez *D. melanogaster* a montré que Lid et le complexe Sin3A-HDAC1 sont nécessaires pour la décompaction du noyau du spermatozoïde et la caryogamie (Torres-Campana et al., 2020). En particulier, Lid et le complexe Sin3A-HDAC1 sont nécessaires à l'activation de la transcription de *deadhead*, un gène impliqué dans le remodelage de la chromatine du spermatozoïde (Torres-Campana et al., 2020, Torres-Campana et al., 2022). Cependant il n'est pas impossible que l'activité déméthylase de Lid soit aussi impliquée dans cette régulation de *dhd*.

Il existe donc des exemples montrant que les protéines KDM5 peuvent réguler la transcription indépendamment de leur activité déméthylase, et que d'autres motifs conservés contribuent à leurs activités de régulation bien que les rôles de ces domaines restent beaucoup moins caractérisés comme ceux du domaine C5HC2. Pour mieux comprendre ces mécanismes, des partenaires physiques de Lid chez *D. melanogaster* ont été identifiés par « Turbo ID ». Ces analyses ont identifié de nouveaux interacteurs physiques comme des membres des complexes de remodelage SWI/SNF et NURF, le complexe NSL et plusieurs protéines insulatrices, suggérant que Lid est impliquée dans d'autres mécanismes de régulation indépendants du retrait de H3K4me3 (Yheskel et al., 2023).

II) *lid* est impliqué dans l'établissement de la pigmentation *via* la modulation de l'expression du gène de pigmentation *tan*

1) *lid* est un régulateur positif de la pigmentation abdominale

Afin de confirmer le rôle de *lid* dans l'établissement de la pigmentation abdominale, l'expression de celui-ci a été diminuée dans l'épiderme abdominal en utilisant deux lignées *UAS-RNAi* (BL28944 et BL36652) et les pilotes *yellow-Gal4* (*y-Gal4*) et *pannier-Gal4* (*pnr-Gal4*) qui s'expriment dans notre tissu d'intérêt (Calleja et al., 2000, Jeong et al., 2006). L'intensité de la pigmentation des segments abdominaux postérieurs (A5, A6 et A7) a été quantifiée et comparée à celle des contrôles correspondants. Pour les deux lignées RNAi croisées avec les deux pilotes, on observe une diminution de la pigmentation de A5, A6 et A7 (Figure 36). *lid* est donc un régulateur positif de la pigmentation. Pour la suite des expériences, la lignée RNAi BL28944 a été utilisée.

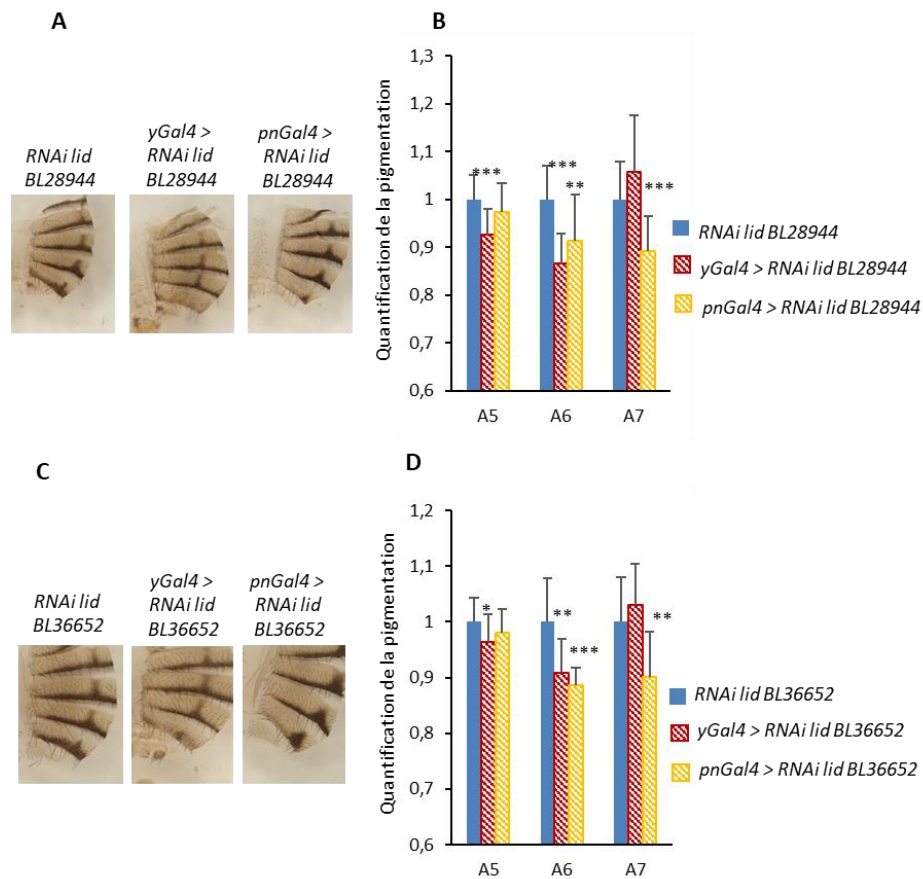


Figure 36 : Effet sur la pigmentation abdominale de la diminution de l'expression de *lid*. A) C) Cuticules de femelles issues du croisement des *RNAi-lid* BL28944 (A) et BL36652 (C) avec la lignée *w¹¹¹⁸* (contrôle) ou les pilotes *y-Gal4* et *pnr-Gal-4*. B, D) Quantification de la pigmentation des segments A5, A6 et A7 pour les génotypes présentés en A et C. n=15, *p<0,05 ; **p<0,01 et ***p<0,005.

Afin de confirmer ce résultat, l'effet d'une sur-expression de *lid* sur la pigmentation a été déterminé en utilisant une lignée *UAS-lidHA* et le pilote *y-Gal4*. La sur-expression de *lid* induit une augmentation de la pigmentation (Figure 37). Ces résultats montrent donc que *lid* active la production de mélanine dans l'épiderme abdominal. Ces résultats sont surprenants : les phénotypes de pigmentation observés en condition de dérégulation de *lid* sont identiques à ceux obtenue avec *trx* (Gibert et al., 2016). Cependant *Trx* est impliquée dans le dépôt de la marque H3K4me3 alors que *Lid* est impliquée dans son retrait.

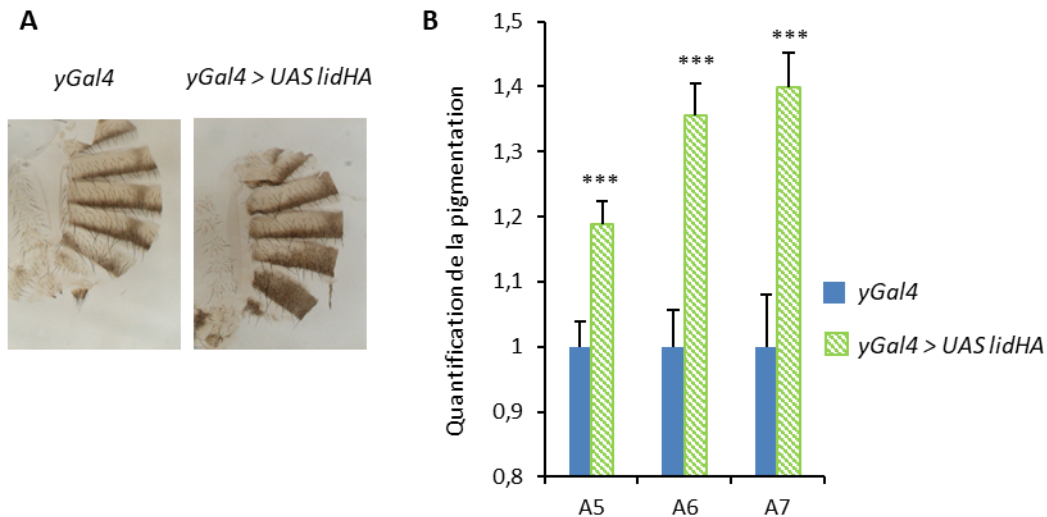


Figure 37 : Effet sur la pigmentation abdominale de la sur-expression de *lid*. A) Cuticules de femelles homozygotes pour le pilote *y-Gal4* avec ou sans le transgène *UAS-lidHA*. B) Quantification de la pigmentation des segments A5, A6 et A7 pour les génotypes présentés en A. n=15, ***p<0,005.

2) L'activité déméthylase de Lid est impliquée dans la mise en place de la pigmentation

L'activité déméthylase de Lid via son domaine JMJC est impliquée dans la régulation des gènes en modulant le niveau de la marque H3K4me3. Cependant, certaines fonctions de Lid chez la drosophile sont indépendantes de son activité déméthylase (voir I). Pour savoir si cette activité a un rôle dans l'établissement de la pigmentation abdominale, des femelles sur-exprimant, grâce au pilote *y-Gal4*, une forme de Lid rendue déficiente pour son activité déméthylase (mutation dans le domaine JMJC, transgène *UAS-lid-JMJC**, Secombe et al., 2007) ont été générées. L'intensité de la pigmentation diminue chez ces femelles dans tous les segments (Figure 38). Ce phénotype se rapproche du phénotype de dépigmentation observé chez les femelles *RNAi-lid*, mais s'en distingue par le fait que les femelles exprimant la forme mutée de Lid présentent une diminution d'intensité de tous les pigments (noirs, bruns, jaunes). Cette forme mutée se comporte donc comme un

dominant-négatif, ce qui prouve que l'activité déméthylase de Lid est impliquée dans la mise en place de la pigmentation.

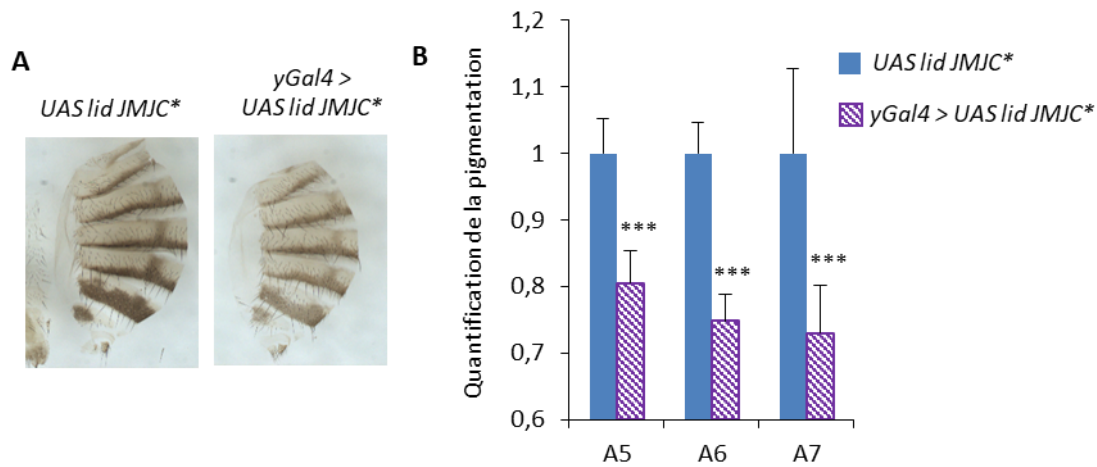


Figure 38 : Effet sur la pigmentation abdominale de la sur-expression d'une forme de Lid déficiente dans l'activité déméthylase. A) Cuticules de femelles hétérozygotes pour le transgène *UAS-lid-JMJC** avec ou sans le pilote *y-Gal4*. B) Quantification de la pigmentation des segments A5, A6 et A7 pour les génotypes présentés en A. n=15, ***p<0,005.

3) *lid* active la production de mélanine grâce à la régulation de l'expression du gène de pigmentation *tan*

Pour identifier les gènes de la pigmentation médiant l'effet de la dérégulation de *lid*, l'expression de ces derniers a été mesurée par RT-qPCR dans les épidermes abdominaux de jeunes femelles adultes (Figure 39). L'expression de *tan* diminue d'un facteur 10 en condition *UAS-RNAi-lid* et augmente d'un facteur 2,3 en condition *UAS-lidHA*. Ces résultats sont cohérents avec les phénotypes observés, *tan* étant impliqué dans la synthèse des mélanines noires et brunes (True et al., 2005). L'expression du gène *black* est également

modulée par une dérégulation de *lid*, mais avec un facteur moins important que pour *tan* et dans le même sens pour les deux transgènes. Les phénotypes de pigmentation abdominale induits par une dérégulation de *lid* sont donc probablement la conséquence d'une modulation de l'expression de *tan*.

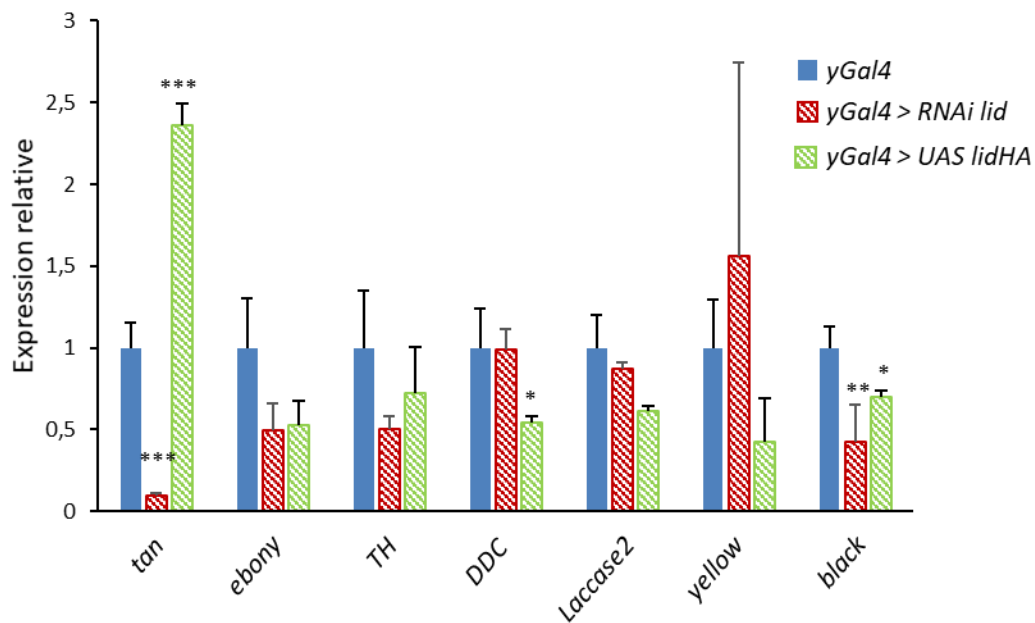


Figure 39 : Quantification de l'expression des gènes de pigmentation en condition de dérégulation de *lid*. Quantification par RT-qPCR de l'expression des gènes de pigmentation dans les épidermes abdominaux (A5, A6, A7) de jeunes femelles homozygotes pour le pilote *y-Gal4* avec ou sans les transgènes *RNAi-lid* (BL28944) et *UAS-lidHA*. n=3, *p<0,05 ; **p<0,01 et ***p<0,005.

Afin de confirmer l'interaction fonctionnelle entre *lid* et *tan*, *tan* a été sur-exprimé (transgène *UAS-tan*) chez des femelles *UAS-RNAi-lid*. La sur-expression de *tan* est suffisante pour supprimer la baisse de pigmentation induite par la diminution d'expression de *lid* (Figure 40). *tan* est épistatique sur *lid* et donc en aval de *lid* dans le réseau de gènes impliqués dans la production de mélanine.

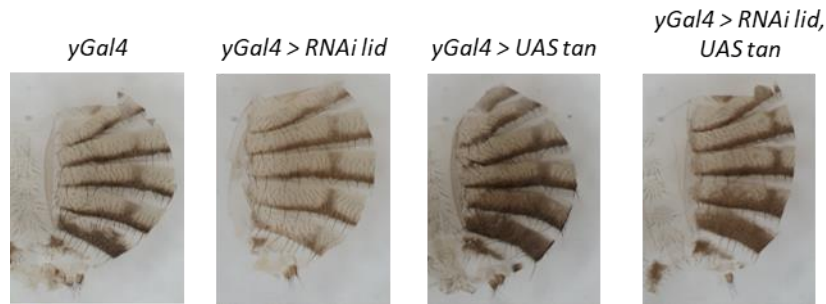


Figure 40 : *tan* et *lid* interagissent génétiquement. Cuticule de femelles *y-Gal4* (contrôle), *y-Gal4 > RNAi-lid* (diminution d'expression de *lid*), *y-Gal4 > UAS-tan* (sur-expression de *tan*) et *y-Gal4 > RNAi-lid, UAS-tan*. La sur-expression de *tan* supprime la baisse de pigmentation induite par le *RNAi-lid*.

4) *tan* n'est pas une cible directe de *lid*

L'expression de *tan* est régulée par *lid*, mais aussi par *trx*, codant la méthyl-transférase qui dépose la marque H3K4me3 effacée par Lid. Par ailleurs, le niveau de H3K4me3 sur le promoteur de *tan* diminue chez des femelles *RNAi-trx* (Figure 31) (Gibert et al., 2016), ce qui montre que *tan* est une cible directe de *trx*. Afin de savoir si *tan* est aussi une cible directe de *lid*, le niveau de H3K4me3 sur le promoteur de *tan* et son exon 1 a été mesuré par immunoprécipitation de chromatine (ChIP-qPCR) dans des épidermes abdominaux de femelles chez qui l'expression de *lid* a été diminuée ou augmentée (transgènes *UAS-RNAi-lid* ou *UAS-lidHA* contrôlés par le pilote *y-Gal4*). La dérégulation de *lid* n'induit pas de modification du niveau de H3K4me3 sur *tan* (Figure 41). Ce résultat suggère donc que *tan* n'est pas une cible directe de *lid*.

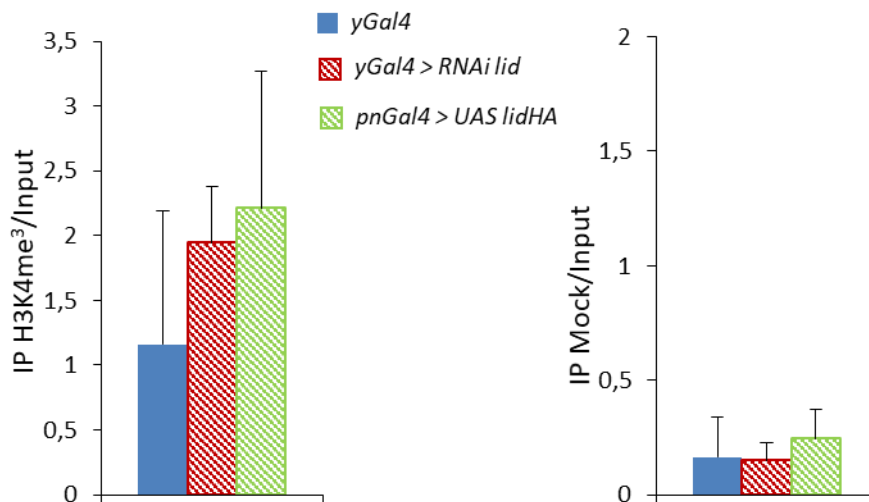


Figure 41 : La dérégulation de *lid* ne modifie pas le niveau de H3K4me3 sur *tan*. Mesure du niveau de H3K4me3 sur le TSS de *tan* par immunoprécipitation de chromatine (ChIP-qPCR) à l'aide d'un anti-H3K4me3 (gauche) ou d'un sérum de lapin (droite). La chromatine a été extraite d'épidermes abdominaux (A5, A6, A7) de jeunes femelles *y-Gal4*, *y-Gal4 > RNAi-lid* et *y-Gal4 > UAS-lidHA*. n=3.

III) Identification des cibles transcriptionnelles de *lid* et *trx* dans les épidermes abdominaux de pupes âgées

La diminution d'expression de *lid* dans l'épiderme abdominal de femelles *Drosophile*, tout comme la diminution d'expression de *trx*, induit une baisse de pigmentation. Par ailleurs, Trx et Lid, bien qu'ayant des actions opposées sur la marque H3K4me3, pourraient, pour certains gènes cibles, agir ensemble en tant qu'activateurs de transcription. Afin de tester cette hypothèse, j'ai généré par RNAseq et analysé les transcriptomes d'épidermes abdominaux de pupes âgées exprimant, sous le contrôle du pilote *y-Gal4*, un transgène RNAi dirigé contre *lid* ou *trx*. Ces transcriptomes (appelés par la suite transcriptomes *lid KD* et *trx KD*) ont été comparés avec le transcriptome de pupes exprimant le pilote *yGal4* seul (appelé par la suite transcriptome contrôle) et entre eux. Le transcriptome *lid KD* a

également été comparé avec les transcriptomes de tissus de drosophile avec une sous-expression ou une mutation de *lid*.

1) Spécificité tissulaire des cibles transcriptionnelles de *lid*

La comparaison du transcriptome *lid KD* avec le transcriptome contrôle montre que 724 gènes sont dérégulés dont 454 négativement et 270 positivement (Figure 42). Nous avons comparé nos résultats avec deux autres RNAseq en condition RNAi-*lid* en ovaire ou mutant perte de fonction en disque d'aile (Figure 42) (Drelon et al 2018 ; Torres-Campana et al, 2020). Entre épiderme et disque d'aile, 70 gènes (9,5%) sont dérégulés en commun et 47 (67%) d'entre eux dans le même sens (Figure 42A). Il y a donc peu de cibles transcriptionnelles de *lid* communes entre ces deux tissus. Entre épiderme et ovaires seulement 17 gènes (2,3%) sont dérégulés en commun ce qui représente encore moins de cibles transcriptionnelles en commun qu'entre l'épiderme et les disques d'aile (Figure 42B). Seuls 5 gènes sont dérégulés en commun et dans le même sens dans les trois tissus. Ces comparaisons montrent que *lid* a des cibles transcriptionnelles spécifiques du tissu.

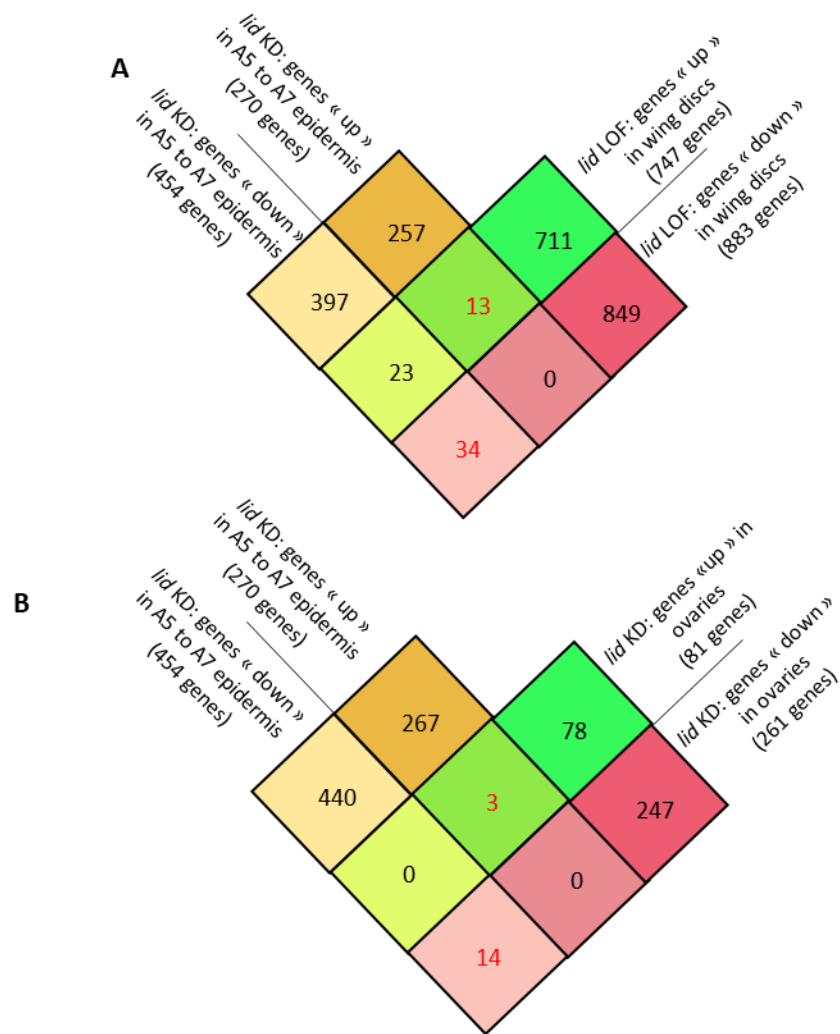


Figure 42 : Comparaison de transcriptomes de lignées sousexprimant *lid* dans différents tissus. Comparaison de l'analyse différentielle d'expression dans les épidermes de pupes *y-Gal4 > RNAi-lid* (*lid* KD) et A) un mutant perte de fonction pour *lid* (*lid* LOF) dans le disque d'aile (« wing discs ») et B) une lignée exprimant un RNAi dirigé contre *lid* dans les ovaires (« ovaries »). Les nombres de gènes sur-exprimés (« up ») et sous-exprimés (« down ») dans l'une et/ou l'autre des conditions sont indiqués.

2) *lid* et *trx* partagent de nombreuses cibles transcriptionnelles

Afin d'identifier les cibles transcriptionnelles communes à *lid* et *trx*, j'ai comparé les listes des gènes différentiellement exprimés par rapport au contrôle dans les transcriptomes *lid KD* et *trx KD* (Figure 43). En *lid KD*, 724 gènes sont dérégulés dont 454 négativement et 270 positivement. En *trx KD*, 380 gènes sont dérégulés dont 202 négativement et 178 positivement. De manière intéressante, 167 gènes dérégulés en *lid KD* (représentant 23% des gènes dérégulés en *lid KD*) sont dérégulés dans le même sens en *trx KD*, et seulement 1 gène (représentant 0,14% des gènes dérégulés en *lid KD*) est dérégulé dans le sens opposé. Ces résultats montrent que Trx et Lid partagent des cibles transcriptionnelles dans l'épiderme pupal abdominal. La quasi-totalité de ces cibles étant dérégulées dans le même sens dans les deux conditions, cela suggère que Lid et Trx agiraient ensemble pour réguler (directement ou indirectement) l'expression de ces cibles, dont certaines pourraient intervenir dans le réseau de régulation des gènes de pigmentation.

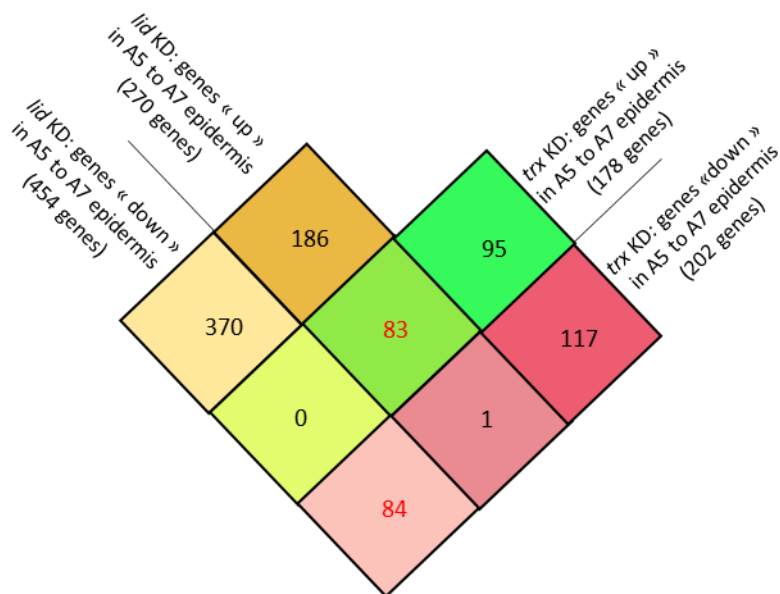


Figure 43 : Comparaison des transcriptomes des épidermes abdominaux de pupes *lid KD* et *trx KD*. Comparaison de l'analyse différentielle d'expression dans les épidermes de pupes *y-Gal4 > RNAi-lid* (*lid KD*) et *y-Gal4 > RNAi-trx* (*trx KD*) comparés aux épidermes contrôles (*y-Gal4*). Les nombres de gènes sur-exprimés (« up ») et sous-exprimés (« down ») dans l'une et/ou l'autre des conditions sont indiqués. 167 gènes sont dérégulés dans le même sens dans les deux conditions (83 « up » et 84 « down »). Seul un gène est dérégulé dans le sens opposé.

3) Certains gènes cibles de *lid* et *trx* dans l'épiderme abdominal sont modulés par la température

La pigmentation abdominale est sensible à la température, des femelles élevées à haute température étant moins pigmentées que des femelles élevées à basse température. Afin d'identifier les gènes impliqués dans cette plasticité thermique, des transcriptomes de pupes âgées de drosophiles contrôles (*w¹¹¹⁸*) élevées à 29°C ou à 18°C ont été obtenus par RNAseq avant mon arrivée au laboratoire. Une haute température et la diminution de l'expression de *lid* induisant le même phénotype de baisse de pigmentation, j'ai comparé les gènes différentiellement exprimés en *lid KD* et entre 29°C et 18°C pour identifier des

gènes cibles communs (Figure 44). L'augmentation de température module l'expression d'un très grand nombre de gènes (1549 gènes sur-exprimés, 1317 gènes sous-exprimés). 18,8% des gènes dérégulés en *lid KD* (137 gènes sur 724) sont dérégulés dans le même sens par l'augmentation de température: 107 de ces gènes sont dérégulés négativement et 30 sont dérégulés positivement. Néanmoins il y a aussi une forte proportion de gènes dérégulés dans le sens opposé entre les deux conditions (107 gènes, soit 14,8% des gènes dérégulés en *lid KD*). Parmi les 107 gènes dérégulés négativement en *lid KD* et à 29°C, 22 le sont aussi en *trx KD*. Parmi les 30 gènes dérégulés positivement en *lid KD* et à 29°C, 8 le sont aussi en *trx KD*.

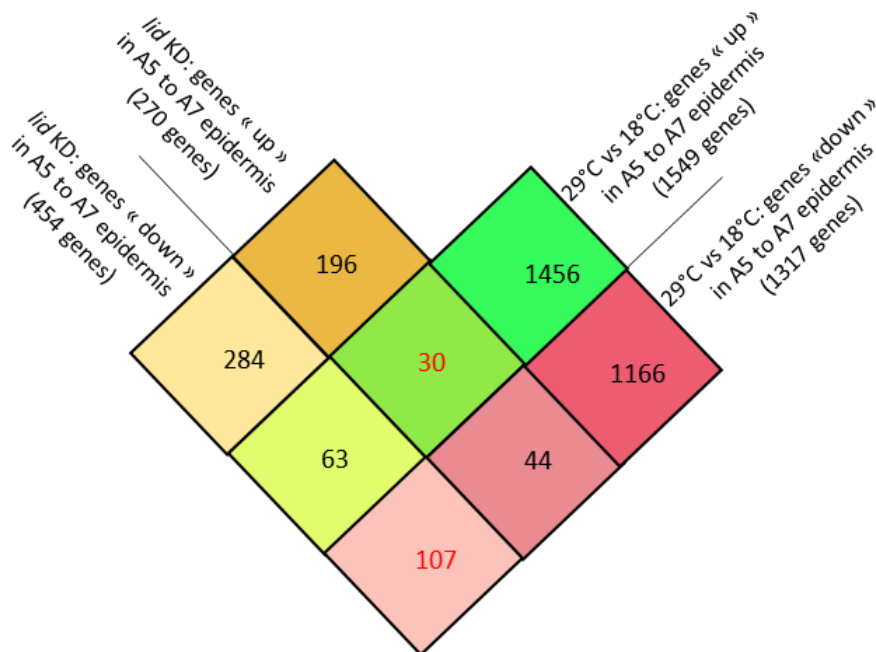


Figure 44 : Comparaison des transcriptomes des épidermes abdominaux de pupes *lid KD* et de pupes *w¹¹¹⁸* élevées à 29°C. Comparaison de l'analyse différentielle d'expression dans les épidermes de pupes *w¹¹¹⁸* élevées à 29°C (comparaison avec des pupes *w¹¹¹⁸* élevées à 18°C) et les épidermes de pupes *y-Gal4 > RNAi-lid* (*lid KD*, comparaison avec des pupes *y-Gal4*). Les nombres de gènes sur-exprimés (« up ») et sous-exprimés (« down ») dans l'une et/ou l'autre des conditions sont indiqués.

4) Sélection par analyse « Gene Ontology » de gènes candidats issus des transcriptomes *lid KD* et *trx KD*

La comparaison des transcriptomes *lid KD* et *trx KD* et du transcriptome de pupes contrôles élevées à 29°C m'a permis d'obtenir des listes de gènes dérégulés en commun et dans le même sens (voir 2 et 3). Ces gènes sont donc de bons candidats pour intervenir dans le réseau impliqué dans l'établissement de la pigmentation et/ou sa plasticité thermique. Afin de savoir si ces gènes appartiennent à des catégories fonctionnelles particulières, j'ai réalisé des analyses de « Gene Ontology ».

Pour les gènes sous-exprimés en commun, l'analyse GO révèle trois groupes de gènes (« clusters » 1, 2 et 3) statistiquement significatifs (Figure 45 et tableau 4).

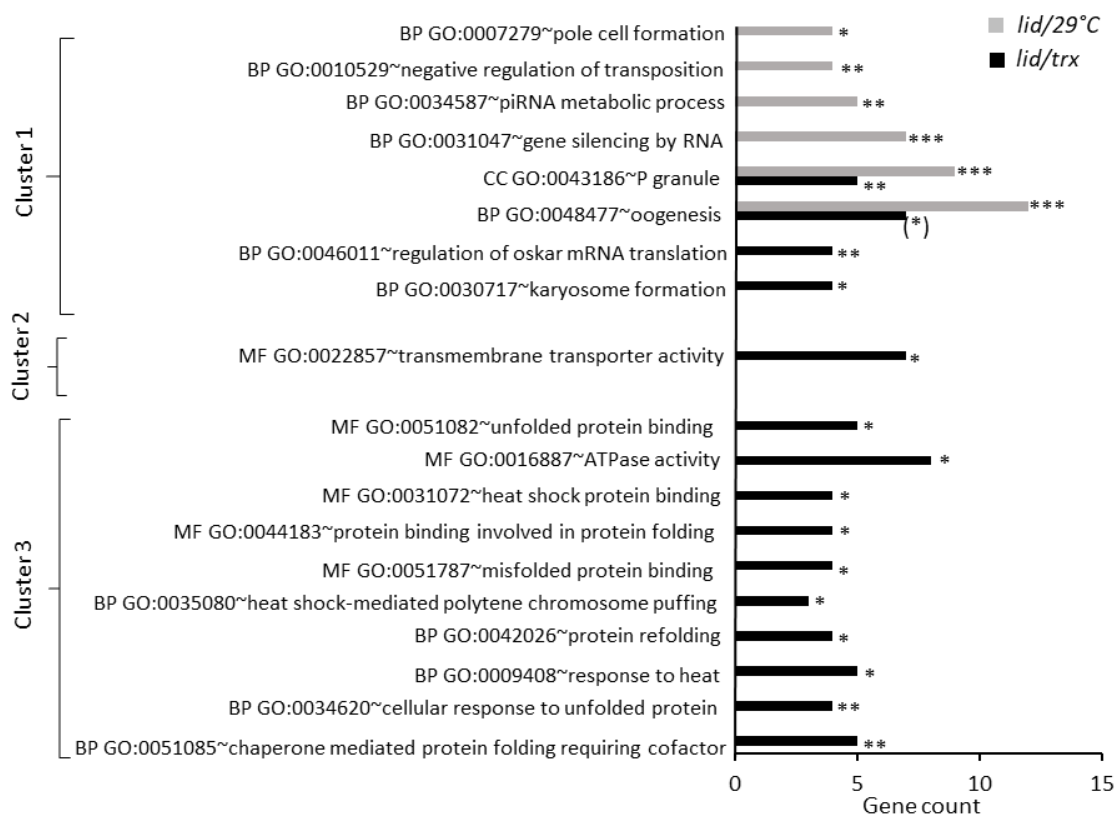


Figure 45 : Analyse « Gene Ontology » (GO) des gènes sous-exprimés en commun dans les transcriptomes *lid KD*, *trx KD* et à 29°C. Les barres grises correspondent aux catégories communes aux transcriptomes *lid KD* et 29°C. Les barres noires correspondent aux catégories communes aux transcriptomes *lid KD* et *trx KD*. Termes GO: BP (Biological process), CC (Cellular component), MF (Molecular function). Gene count : nombre de gènes identifiés pour chaque terme. Test statistique: P value Benjamini (***: <0,01; ** entre 0,001 et 0,01; * entre 0,01 et 0,05).

Le « cluster 1 » correspond à des gènes impliqués dans l'ovogenèse et la régulation des transposons notamment par les voies des petits ARN (pi/siRNA). Certains gènes de ce groupe sont moins exprimés dans les transcriptomes *lid KD*, *trx KD* mais également à 29°C. Le « cluster 2 » correspond à des gènes impliqués dans le transport membranaire. Le « cluster 3 » correspond à des gènes codant des protéines chaperons et des protéines de réponse au choc thermique. Pour ces deux catégories, l'enrichissement n'est significatif

que pour la comparaison entre le transcriptome *lid KD* et le transcriptome *trx KD*. Concernant les gènes sur-exprimés en commun, une seule catégorie est significative entre les transcriptomes *trx KD* et *lid KD*, contenant des gènes impliqués dans des mécanismes hormonaux (« estradiol dehydrogenase activity », « cluster 4 », tableau 4). J'ai retenu cette catégorie car ce type de mécanisme peut être impliqué dans la plasticité phénotypique (voir introduction). En plus de ces 4 groupes de gènes, j'ai sélectionné des gènes codant des facteurs de transcription et des régulateurs de la chromatine dérégulés en commun ou pas entre les transcriptomes *lid KD* et *trx KD* (« cluster 5 », tableau 4). Certains de ces gènes sont aussi dérégulés à 29°C.

Cluster	Gène	Moyenne du nombre de reads	Log2FC <i>lid KD</i>	Log2FC <i>trx KD</i>	Log2FC 29°C	Lignée RNAi	Phénotype de pigmentation
1	<i>AGO2</i>	7115,64	-0,47	-0,32	-0,14	BL34799	D
1	<i>piwi</i>	179,04	-2,15	-1,44	-1,81	BL 33724 BL34866	D
1	<i>zuc</i>	15,08	-1,55	-0,56	-1,42	BL36742	N
1	<i>aub</i>	155,01	-1,53	-1,11	-1,56	BL33728	D
1	<i>spn-E</i>	122,33	-1,73	-1,36	-2,29	BL34808	D
1	<i>mael</i>	78,82	-1,70	-0,68	-0,91	BL34793	D
1	<i>SoYb</i>	63,872	-1,39	-2,49	0,41	kk104474	N
1	<i>dhd</i>	48,40	-2,63	-1,96	-2,32	BL67345	D
1	<i>del</i>	56,09	-1,11	-1,01	0,54	BL32375	D
1	<i>osk</i>	36,86	-2,41	-1,64	-4,48	BL25845	D
2	<i>Akhr</i>	749,43	1,86	1,58	-0,65	BL51710	D
2	<i>mtt</i>	105,60	-3,01	0,053	-0,45	BL44076	N
2	<i>mth19</i>	654,43	-5,05	0,31	0,37	BL62896	N
3	<i>Hsf</i>	2885,05	-0,79	-0,79	-0,51	NT	
3	<i>Hsp68</i>	15617,18	-1,58	-1,29	0,94	BL 50637	N
3	<i>Hsp70Bb</i>	9289,46	-1,51	-1,51	-1,12	NT	
3	<i>Hsp70Bc</i>	5913,77	-2,21	-1,96	-1,16	NT	
3	<i>Dnaj-1</i>	13106,33	-0,91	-1,26	-1,21	BL 32978	N
4	<i>Cyp4d20</i>	1718,84	-5,71	-1,45	-0,22	BL77341	N
4	<i>Cyp6a2</i>	367,29	-1,32	1,11	1,17	BL64582	N
4	<i>ap</i>	699,52	0,78	0,56	0,78	BL 41673	D
4	<i>Odc1</i>	193,17	1,81	1,17	-1,73	NT	
5	<i>rho</i>	209,23	-0,63	-0,74	-0,08	BL 41699	N
5	<i>neur</i>	254,09	-0,57	-0,74	-0,06	BL 67917	N
5	<i>hgo</i>	1143,80	-0,88	-0,59	-0,45	BL 55629	N
5	<i>eya</i>	70,22	-1,86	-1,34	-2,32	BL 57314	N
5	<i>orb</i>	95,36	-2,44	-1,59	-4,3	BL 64002	N
5	<i>aurA</i>	153,69	-1,43	-0,36	-0,03	BL35763	D
5	<i>Sema-1b</i>	3673,47	-0,35	0,0035	0,26	BL28588	D
5	<i>cv-2</i>	1162,45	0,66	-0,32	-0,46	BL37514	N
5	<i>sug</i>	604,92	7,02	0,87	-1,01	BL55182	D
5	<i>Ama</i>	155,01	-4,70	0,17	-0,59	BL33416	N
5	<i>tkv</i>	1010,67	-3,99	-0,26	-0,42	BL40937	N
5	<i>CREG</i>	656,38	-4,11	0,33	-0,28	BL59999	N
5	<i>ppk</i>	246,14	3,97	0,31	0,054	BL67294	D
5	<i>Rbp1</i>	562,32	-3,21	-0,35	-0,25	BL55688	N
5	<i>drl</i>	156,14	-3,19	-0,38	-0,94	BL39002	D
5	<i>apt</i>	159,17	-0,78	-1,08	-0,94	BL26236	D
5	<i>dro</i>	184,45	2,15	1,65	1,65	BL67223	N
5	<i>bab1</i>	119,75	1,35	0,47	0,84	KK10601	A

Tableau 4 : Liste des gènes candidats sélectionnés après l'analyse des différents transcriptomes. Les gènes sont regroupés selon leur catégorie fonctionnelle (« clusters » 1 à 5, voir texte). Log2 FC : Log2 de la différence d'expression dans l'analyse différentielle des transcriptomes *lid KD*, *trx KD* et pupes 29°C. Une case rouge indique une sous-expression significative, une case verte une sur-expression significative. Les références des lignées RNAi utilisées pour analyser le phénotype de pigmentation abdominale induit par une dérégulation de ces gènes sont indiquées (NT : non testé). D indique une diminution de pigmentation, A une augmentation de pigmentation, et N pas d'effet.

Afin de déterminer si les gènes ainsi sélectionnés intervenaient dans l'établissement de la pigmentation, j'ai analysé le phénotype induit par une diminution de leur expression dans l'épiderme abdominal à l'aide de lignées *RNAi* et du pilote *y-Gal4* (Tableau 4). Pour la grande majorité des gènes des « clusters » 2, 3 et 4, leur dérégulation dans l'épiderme abdominal n'induit aucune modification de la pigmentation. Je n'ai donc pas continué l'étude de ces gènes. La dérégulation de certains gènes du « cluster 5 » induit un phénotype de pigmentation. Parmi ces gènes, j'ai dans un premier temps uniquement poursuivi l'analyse de *bab1*, sur-exprimé dans le transcriptome *lid KD* et à 29°C, que les travaux précédents du laboratoire avaient déjà identifié comme un régulateur négatif de la pigmentation abdominale et de l'expression de *tan* (voir introduction et De Castro et al., 2018). Enfin, un grand nombre de gènes du « cluster 1 » induisent une diminution de pigmentation lorsqu'ils sont sous-exprimés. J'ai donc décidé d'approfondir l'étude du rôle de ces gènes dans l'établissement de la pigmentation.

IV) La régulation de *bab1* par *lid* est impliquée dans l'établissement de la pigmentation abdominale

Comme vu dans l'introduction (Chapitre 3 I et II), les facteurs de transcription Bab1 et Bab2 sont impliqués dans la mise en place de la pigmentation et sa plasticité en réprimant l'expression de *tan*. Par ailleurs, *bab1* comme *bab2* sont plus exprimés à 29°C qu'à 18°C (De Castro et al 2018). L'analyse du transcriptome *lid KD* révèle une sur-expression significative de *bab1*, non observée pour le transcriptome *trx KD* (Tableau 4). Afin de confirmer ces résultats, j'ai quantifié l'expression de *bab1* et *bab2* par RT-qPCR dans les épidermes abdominaux de pupes *RNAi-lid* ou *RNAi-trx* sous contrôle du pilote *y-Gal4*

(Figure 46A). On observe une augmentation de l'expression de *bab1* en condition *RNAi-lid* mais pas *RNAi-trx*. A l'inverse, l'expression de *bab2* n'est pas modifiée. Ces résultats confirment que *bab1* est réprimé par *lid*. Par ailleurs, cette régulation de *bab1* par *lid* est impliquée dans l'établissement de la pigmentation : en effet, le phénotype de baisse de pigmentation induit par une diminution d'expression de *lid* est supprimé quand on diminue l'expression de *bab1* (Figure 46B). Ce résultat montre que *bab1* est épistatique sur *lid* et donc en aval de *lid* dans le réseau de régulation des gènes de pigmentation.

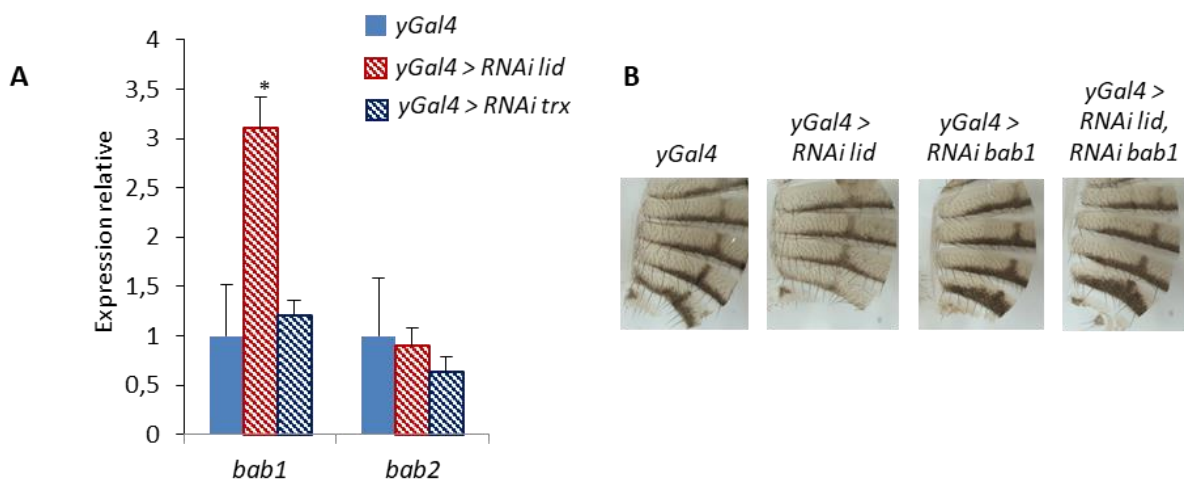


Figure 46 : La régulation de *bab1* par *lid* est impliquée dans la pigmentation abdominale.

A) Quantification par RT-qPCR de l'expression de *bab1* et *bab2* dans les épidermes abdominaux de pupes (A5, A6, A7) exprimant un transgène *RNAi-lid* ou *RNAi-trx* sous contrôle du pilote *y-Gal4*. n=3, *p<0,05. B) Cuticules de femelles *y-Gal4* (contrôle), *y-Gal4 >RNAi-lid* (sous-expression de *lid*), *y-Gal4 >RNAi-bab1* (sous-expression de *bab1*) et *y-Gal4 >RNAi-lid, RNAi-bab1*. La sous-expression de *bab1* supprime la baisse de pigmentation induite par la sous-expression de *lid*.

V) Certains gènes de la voie des piRNA sont-ils de nouveaux acteurs de l'établissement de la pigmentation abdominale ?

Le « Cluster 1 » comprend 10 gènes dont 8 sont impliqués dans la voie des piRNA (*AGO2*, *piwi*, *zuc*, *SoYb*, *aub*, *spn-E*, *del* et *mael*). Ils sont tous sous-exprimés dans les 2 transcriptomes *trx KD* et *lid KD*, et pour certains d'entre-eux également à 29°C. Ces gènes sont peu exprimés dans l'épiderme abdominal pupal à l'exception d'*AGO2* (Tableau 4). Etant donné qu'ils sont connus pour être exprimés dans les ovaires (composante germinale et somatique), et que les ovaires sont dans l'abdomen, nous nous sommes demandés si des fragments d'ovaires auraient pu contaminer les épidermes abdominaux lors de la dissection. Cependant, seulement 2 de ces gènes ont été identifiés comme cibles transcriptionnelles de *lid* dans une analyse de transcriptomes d'ovaires *lid KD* (Torres-Campana 2020) : *dhd* (sous-exprimés dans les ovaires *lid KD*) et *zuc* (sur-exprimé dans les ovaires *lid KD*). Par ailleurs, la diminution de l'expression de la plupart de ces gènes par RNAi dans l'épiderme abdominal avec le pilote *y-Gal4* induit une diminution de pigmentation (Tableau 4 et voir plus bas). Ce résultat suggère donc qu'ils sont bien exprimés, à faible niveau, dans notre tissu d'intérêt. C'est pourquoi j'ai décidé de poursuivre l'étude du rôle de ces gènes dans l'établissement de la pigmentation.

1) Les piRNA et les protéines PIWI chez *D. melanogaster*

a) La voie des piRNA et son rôle dans la régulation des éléments transposables et la répression transcriptionnelle des gènes

Chez *D. melanogaster*, les piRNA (PIWI-Interacting RNA) sont de petits ARN non codants impliqués dans la régulation des éléments transposables (ET) dans les cellules germinales, mais également dans le contrôle de l'expression de gènes dans la lignée

germinale et certains types cellulaires somatiques, par exemple les cellules folliculaires (pour revue Czech et al., 2018). Ils interagissent avec des protéines de la famille PIWI (Aub, PIWI et AGO3) (Brennecke et al, 2007; Gunawardane et al, 2007). La majorité des piRNA sont produits par des régions du génome appelées « piRNA clusters » qui ont la particularité d'être composées de fragments d'ET et d'être enrichies en la marque H3K9me3 (Aravin et al, 2006; Brennecke et al, 2007; Girard et al, 2006). Les clusters à sens unique « uni-strand » ressemblent à des gènes codants. Ils ont un promoteur marqué par H3K4me3 et contrôlé par un facteur de transcription, CI pour le cluster *flamenco* par exemple. En revanche, à la différence des gènes codants, le corps de ces clusters est marqué par H3K9me3. Les clusters double sens « dual-strand » sont marqués par H3K9me3 qui est spécifiquement liée par Rhino (Rhi). En coopération avec Del, Rhi agit comme une plateforme de liaison pour Moon, qui recrute une machinerie d'initiation de la transcription via l'ARN pol II (Czech et al., 2018). Certains types de cellules somatiques, les cellules folliculaires, peuvent produire des piRNA dérivés des séquences 3'UTR de gènes codants (Robine et al, 2009; Saito et al, 2009). La figure 47 présente les principaux acteurs impliqués dans la production des piRNA chez la drosophile et leur action de répression transcriptionnelle des gènes (TGS : « Transcriptional gene silencing »).

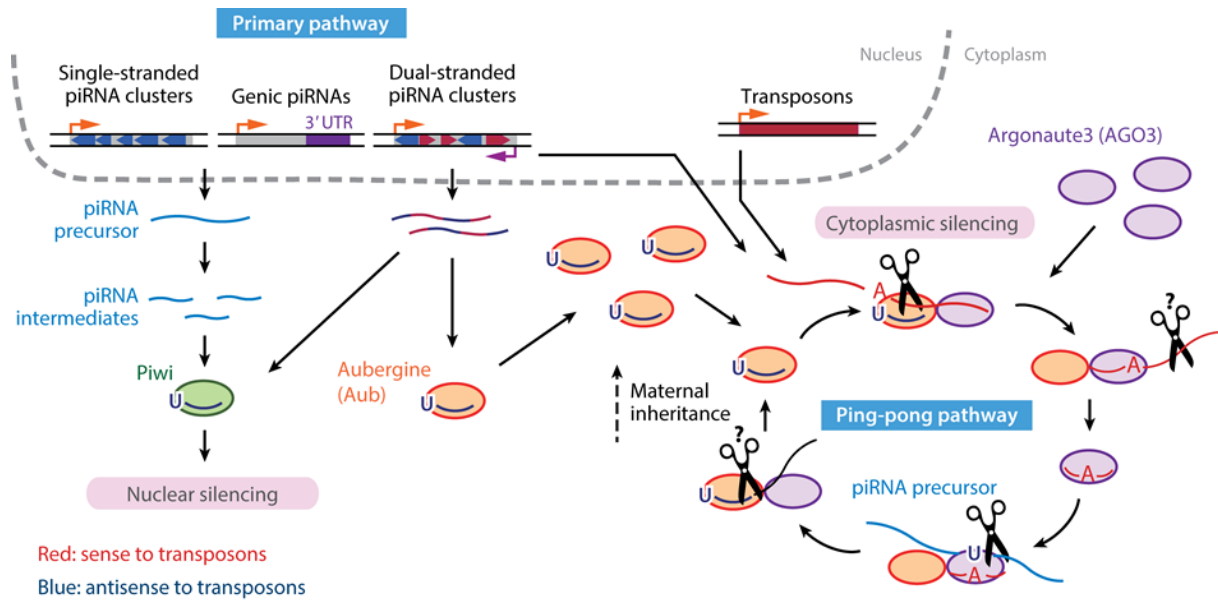


Figure 47 : Voie de biosynthèse des piRNA primaires et secondaires chez *D. melanogaster*. Les piARN primaires sont transcrits à partir des piARN clusters, puis chargés sur Piwi ou Aub. Les séquences 3'-UTR de certains gènes codant pour des protéines peuvent également servir de source de piARN primaires. Les piRNA primaires permettent la régulation transcriptionnelle des ET. Une partie des piRNA primaires est chargée par Aub et AGO3 qui génèrent des piRNA secondaire par la voie d'amplification ping-pong. La voie ping-pong permet la régulation post-transcriptionnelles des ET. (Iwasaki et al., 2015).

Des longs ARN précurseurs sont transcrits à partir des piRNA clusters. Ils sont clivés par Zucchini (Zuc) (Pane et al, 2007). Ces fragments d'ARN, appelés piRNA primaires sont chargés par les protéines Piwi et Aub dans les cellules germinales ou uniquement par Piwi dans les cellules folliculaires. Les complexes Piwi-piRNA scannent les ARN messagers en cours de synthèse et répriment les séquences complémentaires aux piRNA primaires chargés par Piwi (Brower-Toland et al, 2007; Klenov et al, 2014 ; Le Thomas et al, 2014). Puis Eggless est recrutée et dépose la marque H3K9me3 au niveau des séquences réprimé. Cette marque est reconnue par HP1 qui est impliquée dans l'hétérochromatinisation locale de la séquence (Czech & Hannon, 2016). Ceci empêche l'expression des ET. De plus, Piwi et Mael empêchent le recrutement de l'ARN polymérase II au niveau de ces séquences.

Dans les cellules germinales, une autre voie est possible pour les ARN impliqués dans la répression post-transcriptionnelle des gènes (PTGS, « Post Transcriptional Gene Silencing »). Certains piRNA clivés par Zuc sont reconnus et chargés dans Aubergine (Aub), formant des complexes Aub-piRISC qui peuvent reconnaître les transcrits issus des ET et les cliver. Les ARN clivés dans ces complexes produisent de nouveaux piRNA dit sens. Les piRNA secondaires sens peuvent ensuite être chargés dans AGO3, clivés à leur tour et être reconnus et chargés par Aub. Ce mécanisme appelé « Ping-Pong » sert d'amplification du nombre de piRNA (Brennecke et al, 2007; Webster et al, 2015).

b) Implication des protéines PIWI dans des mécanismes post-transcriptionnels de régulation de l'expression des gènes

En plus de leur implication dans la voie des piRNA et la répression transcriptionnelle, certaines protéines PIWI participent chez plusieurs espèces à la régulation de l'expression des gènes par d'autres mécanismes, dont certains sont indépendants des piRNA (Ramat et Simonelig, 2021) (Figure 48).

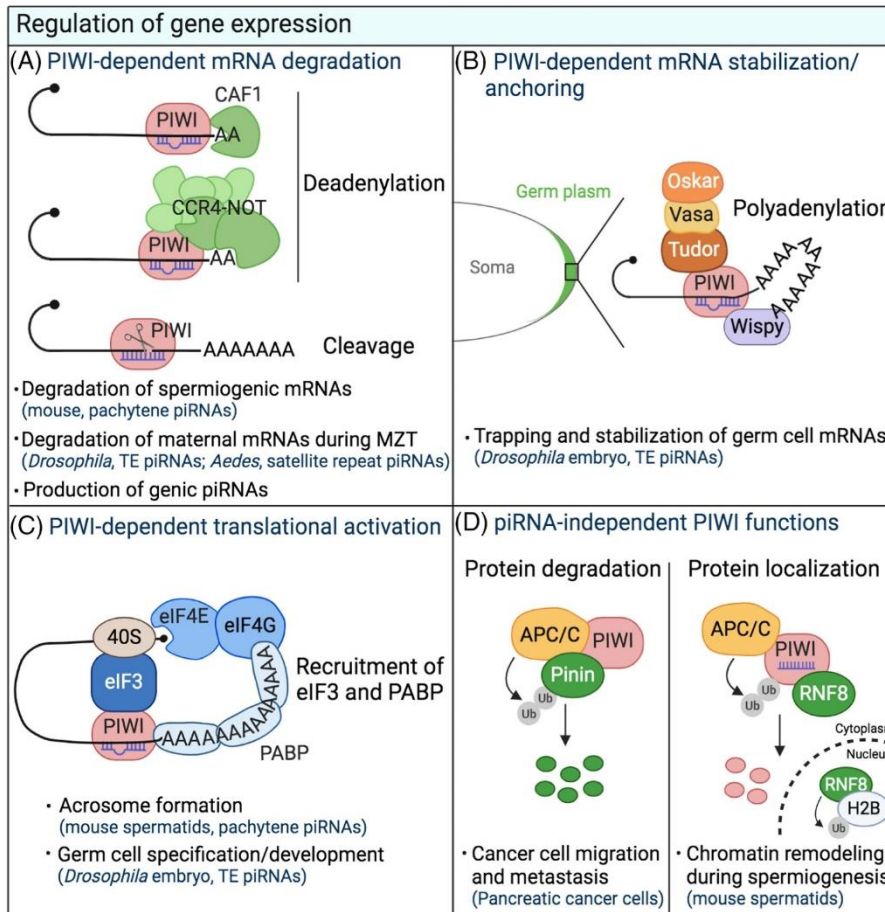


Figure 48 : Autres mécanismes de régulation des gènes dans lesquels sont impliquées les protéines PIWI. A) Dégradation des ARNm dépendante des protéines PIWI. B) Stabilisation des ARNm PIWI dépendante. C) Activation de la traduction dépendante des protéines PIWI. D) Mécanismes indépendants des piRNAs comme l'adressage de protéines et la dégradation de protéines (Ramat et Simonelig, 2021).

Pendant la transition materno-zygotique chez la drosophile (MZT), Aub chargée avec des piRNA induit la dégradation de l'ARN d'origine maternelle *nanos* (Figure 48A). Dans ce processus, Aub coopère avec la protéine de fixation à l'ARN Smaug et le complexe de déadénylation CCR4-NO. Les piRNA chargés dans Aub sont issus de deux éléments transposables qui ciblent partiellement la région 3'UTR de *nos* (Rouget et al., 2010). Chez le moustique *Aedes aegypti* un rôle similaire d'Aub a été montré (Halbach et al., 2020).

Aub est aussi un composant des granules germinaux qui contiennent des ARNm nécessaires au développement et à la spécification des cellules. Ces ARNm sont stabilisés

en partie par Aub interagissant directement avec la polymérase Wispy qui permet la polyadénylation des ARNm et leur stabilisation (Figure 48B) (Trcek et al., 2015 ; Little et al., 2015). Chez *C. elegans*, des travaux ont montré que les piRNA et l'accumulation d'ARNm chargés dans les protéines PIWI empêchent la répression des ARNm des granules germinaux (Dodson et Kennedy, 2019).

Les protéines PIWI, en lien avec des piRNA, jouent également un rôle dans l'activation de la traduction de certains ARNm lors de l'embryogenèse chez la drosophile et de la formation des spermatozoïdes chez la souris (Figure 48C) (Ramat et al., 2020 Dai et al., 2019).

En plus de ces mécanismes faisant intervenir des piRNA, les protéines PIWI participent à des processus indépendants des piRNA. Elles sont très fortement dérégulées dans certains cancers, comme les cancers pancréatiques (Li et al., 2020). PIWIL1 interagit avec le complexe APC/C (Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome) et active la dégradation de la protéine Pinin impliquée dans l'adhésion, ce qui contribue à la formation de métastases (Figure 48D) (Li et al., 2020). Dans des cancers gastriques dépourvus de piRNA, PIWIL1 interagit avec certains ARNm et les dégrade en impliquant la voie NMD (nonsense-mediated mRNA decay mechanism) (Shi et al., 2020). Chez la souris, la protéine MIWI inhibe l'activité de l'E3 ubiquitine ligase RNF8 impliquée dans la dégradation des protéines (Gou et al., 2017).

2) Plusieurs gènes de la voie des piRNA jouent un rôle dans l'établissement de la pigmentation

Afin de confirmer les résultats des analyses de transcriptome, j'ai quantifié par RT-qPCR l'expression de *AGO2*, *aub*, *del*, *piwi*, *SoYB*, *Spn-E* et *zuc* dans les épidermes abdominaux de pupes *RNAi-lid* ou *RNAi-trx* sous contrôle du pilote *y-Gal4*, ainsi que dans des pupes élevées à 29°C (Figure 49). Pour *mael*, je n'ai pas réussi à trouver des amorces satisfaisantes pour faire cette analyse. Pour tous les gènes sauf *AGO2*, la diminution d'expression en *RNAi-lid* et *RNAi-trx* est confirmée. Concernant l'effet de la température, elle est également confirmée pour tous les gènes sauf pour *AGO2*.

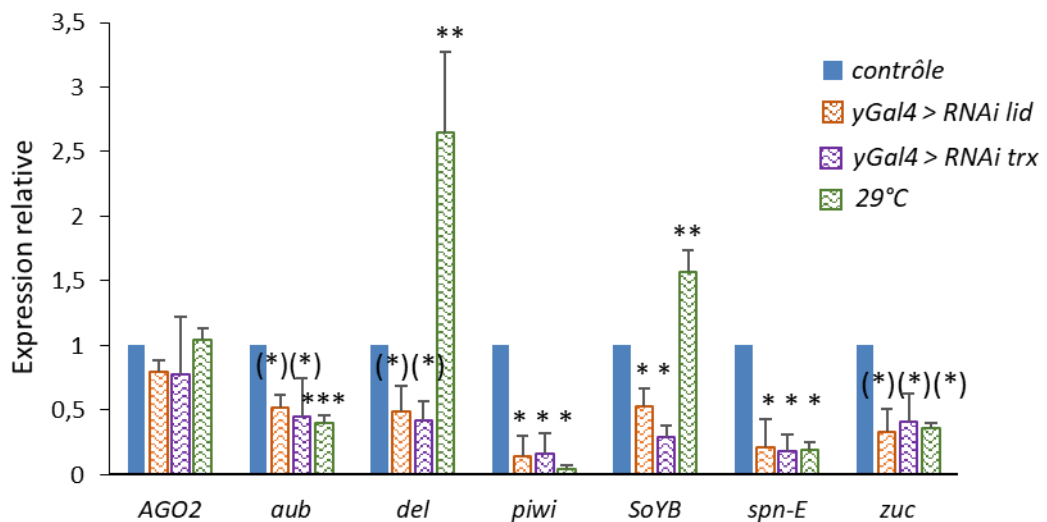


Figure 49 : Analyse par RT-qPCR de l'expression de gènes de la voie des piRNA dans l'épiderme abdominal de pupes. Quantification de l'expression dans des épidermes de pupes âgées *y-Gal4 > RNAi-lid*, *y-Gal4 > RNAi-trx*, ou de pupes *w¹¹¹⁸* élevées à 29°C. Les résultats d'expression ont été normalisés par rapport au contrôle *y-Gal4* pour les

conditions *RNAi-lid* et *RNAi-trx* et au contrôle 18°C pour les pupes élevées à 29°C. n=3. (*): p-val entre 0,05 et 0,17; *: p-val entre 0,01 et 0,05; **: p-val entre 0,001 et 0,01; ***: p-val inférieure à 0,001.

Pour confirmer l'effet de la diminution de l'expression de ces gènes sur la pigmentation abdominale, j'ai quantifié la pigmentation des segments abdominaux A5, A6 et A7 de femelles exprimant des transgènes *RNAi* pour ces gènes sous contrôle du pilote *y-Gal4* (Tableau 4, Figure 50 et 51). Afin de travailler dans le même fond génétique, j'ai utilisé pour les gènes *AGO2*, *piwi*, *zuc*, *aub*, *spn-E*, *mael*, *del* des lignées transgéniques *RNAi* de la collection *TRIP* (*The Drosophila Transgenic RNAi Project*, Perkins et al. 2015). Dans ces lignées, le transgène *RNAi* est inséré soit sur le chromosome II (plate-forme génomique *AttP40*), soit sur le chromosome III (plate-forme génomique *AttP2*). A titre de contrôle, j'ai utilisé des lignées avec un transgène *RNAi-GFP* intégré dans les mêmes plate-formes. Pour *AGO2*, *piwi*, *aub*, *spn-E*, *mael*, *del*, on observe une diminution de la pigmentation de A6 et/ou A7 par rapport au contrôle. Pour *zuc*, l'effet est moins fort et limité à A5. Pour *SoYB*, en l'absence de lignée *TRIP* disponible, j'ai utilisé une lignée *RNAi* de la collection *VDRC* (kk104474). Les femelles *y-Gal4>RNAi-SoYB* ne présentent pas de différence de pigmentation par rapport au contrôle, je n'ai donc pas réalisé de quantification pour ce gène.

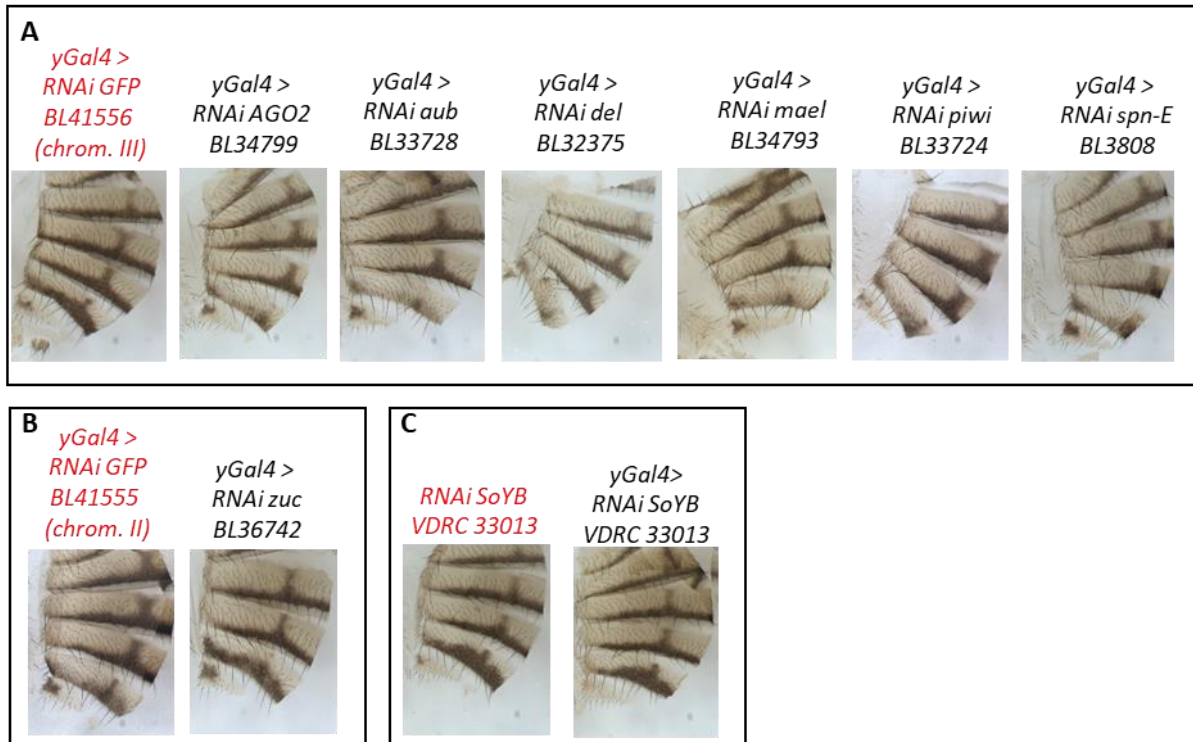


Figure 50 : Phénotypes de pigmentation abdominale induits par une diminution d'expression de gènes de la voie des piRNA. Cuticules de femelles exprimant un transgène *RNAi* contre un gène de la voie des piRNA sous contrôle du pilote *y-GalA*. A, B) Lignées transgéniques de la collection *TRIP*, insertion du transgène sur le chromosome III (A) ou II (B). Le contrôle exprime un transgène *RNAi-GFP* au même site d'insertion. C) Femelles *RNAi-SoYB* (VDRC) avec ou sans le pilote *y-Gal4*.

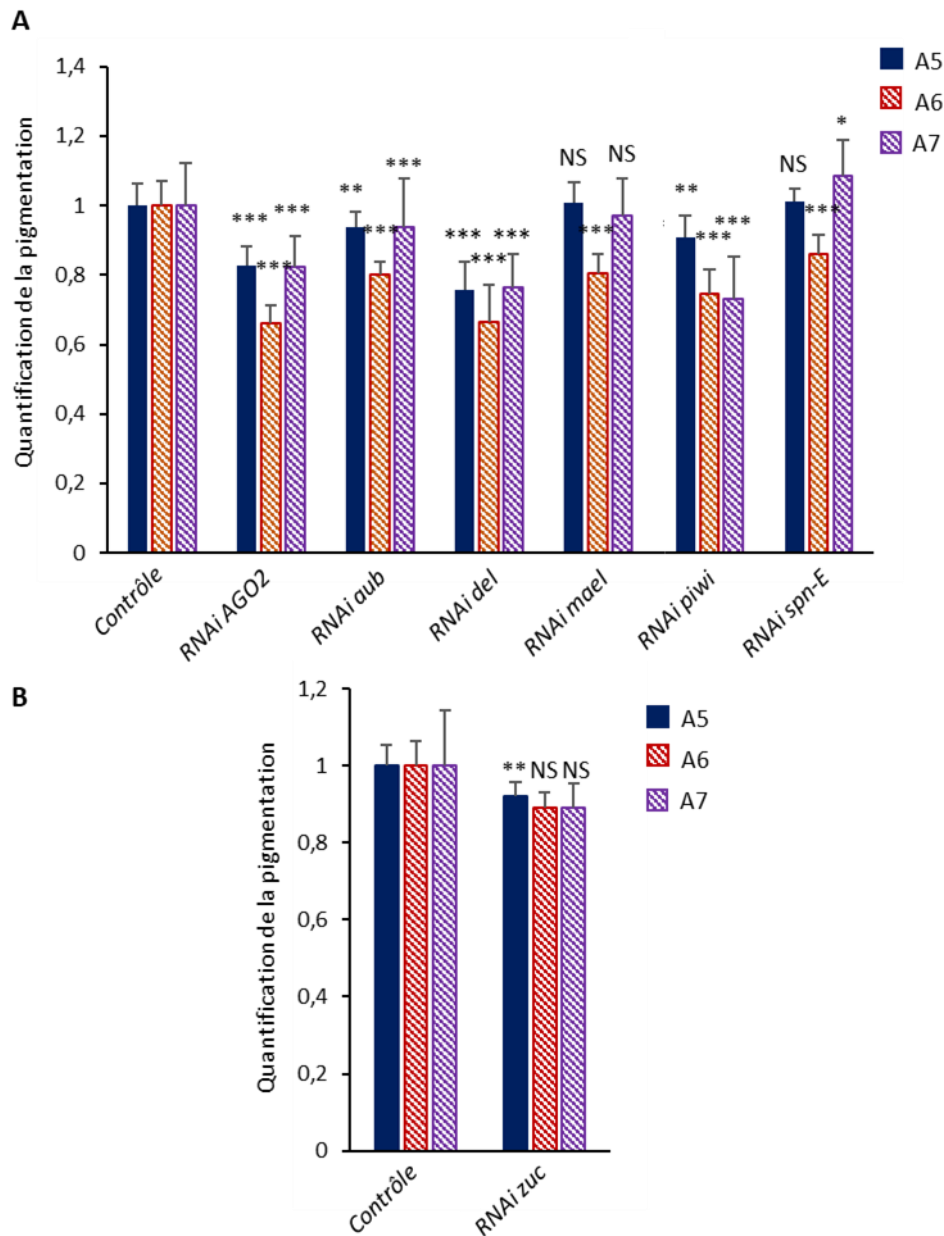
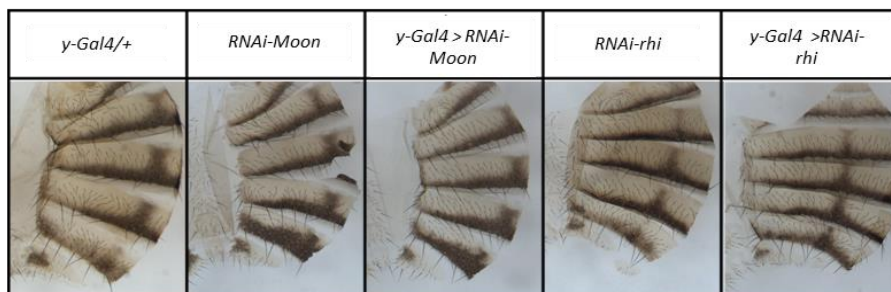


Figure 51 : Quantification des phénotypes de pigmentation induits par une diminution d'expression de gènes de la voie des piRNA. Quantification de la pigmentation des segments A5, A6, A7, de femelles des génotypes présentée figure 50. Lignées *RNAi* transgéniques de la collection *TRIP*, insertion du transgène sur le chromosome III (A) ou II (B). Le contrôle exprime un transgène *RNAi-GFP* au même site d'insertion. *: p-val entre 0,01 et 0,05; **: p-val entre 0,001 et 0,01; ***: p-val inférieure à 0,001.

Afin de vérifier que le phénotype de baisse de pigmentation observé pour ces gènes était bien spécifique et pas dû à un effet non spécifique de la dérégulation de la voie des piRNA sur le système RNAi utilisé dans l'expérience, j'ai quantifié la pigmentation abdominale de

femelles exprimant, sous contrôle du pilote *y-Gal4*, des RNAi dirigés contre les gènes *moonshiner* (*moon*) et *rhino* (*rhi*). Ces deux gènes sont indispensables pour la production des piRNA, mais leur expression n'est pas modulée dans les transcriptomes *lid KD* et *trx KD*. La pigmentation abdominale de femelles *y-Gal4>RNAi-moon* ou *y-Gal4>RNAi-rhi* n'est pas modifiée par rapport à celle de contrôles contenant le pilote *y-Gal4* seul ou le transgène RNAi seul (Figure 52). Ce résultat montre donc que les phénotypes observés avec *AGO2*, *piwi*, *aub*, *spn-E*, *mael*, et *del* sont spécifiques.

A



B

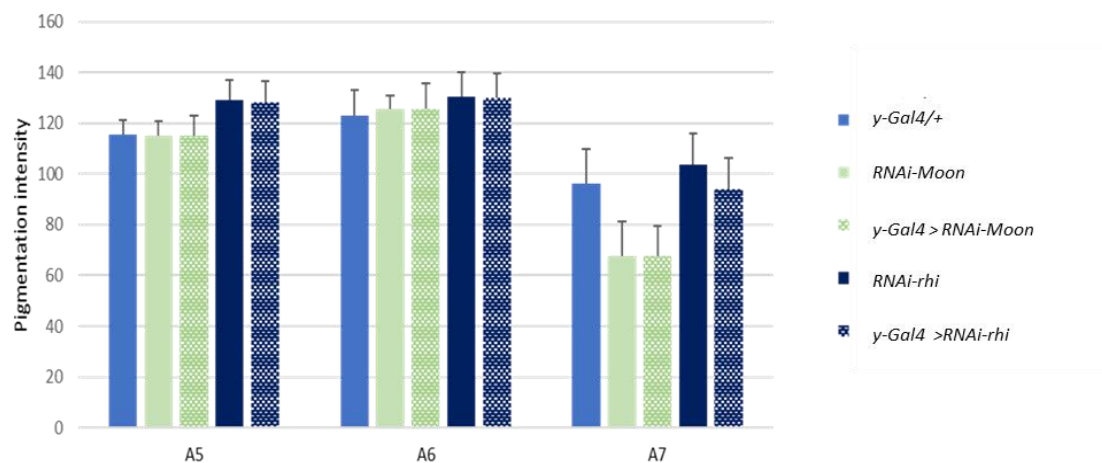


Figure 52 : Phénotypes de pigmentation abdominale induits par une diminution d'expression de *rhi* et *moon*. A) Cuticules de femelles *RNAi-moon* (Andersen et al., 2017) et *RNAi-rhi* (BL35171) avec ou sans le pilote *y-Gal4*. B) Quantification de la pigmentation des segments A5, A6, A7 des individus des génotypes présentés en A. n=30.

3) *piwi* et *aub* régulent l'expression des gènes de pigmentation *tan* et *y*

Afin de confirmer au niveau moléculaire le phénotype de baisse de pigmentation observé chez les femelles RNAi pour les gènes candidats de la voie des piRNA, j'ai analysé par RT-qPCR, chez ces femelles, l'expression des gènes de pigmentation dans les épidermes abdominaux des segments A5, A6, A7. J'ai réalisé dans un premier temps cette expérience pour des femelles exprimant un transgène RNAi *piwi* ou *aub* sous contrôle du pilote *y-Gal4* (Figure 53).

On observe une nette diminution de l'expression de *tan* dans les deux conditions, ce qui est cohérent avec le phénotype de dépigmentation observé puisque *tan* est impliqué dans la synthèse des mélanines noire et brune. Le gène *y* est sur-exprimé dans les deux conditions ce qui n'est pas cohérent avec le phénotype de pigmentation observé car *y* est impliqué dans la production de mélanines noires. Cependant, la sur-expression de *y* doit être couplée à une sur-expression de *tan* ou une sous-expression de *ebony* pour augmenter la production de mélanine (Wittkopp et al 2001; Jeong et al 2008). Enfin, *ebony* est légèrement moins exprimé en condition RNAi-*aub*, ce qui n'est pas non plus cohérent avec le phénotype. Cependant, la conséquence sur la pigmentation en est probablement masquée par la forte baisse de l'expression de *tan* qui code l'enzyme antagoniste d'Ebony.

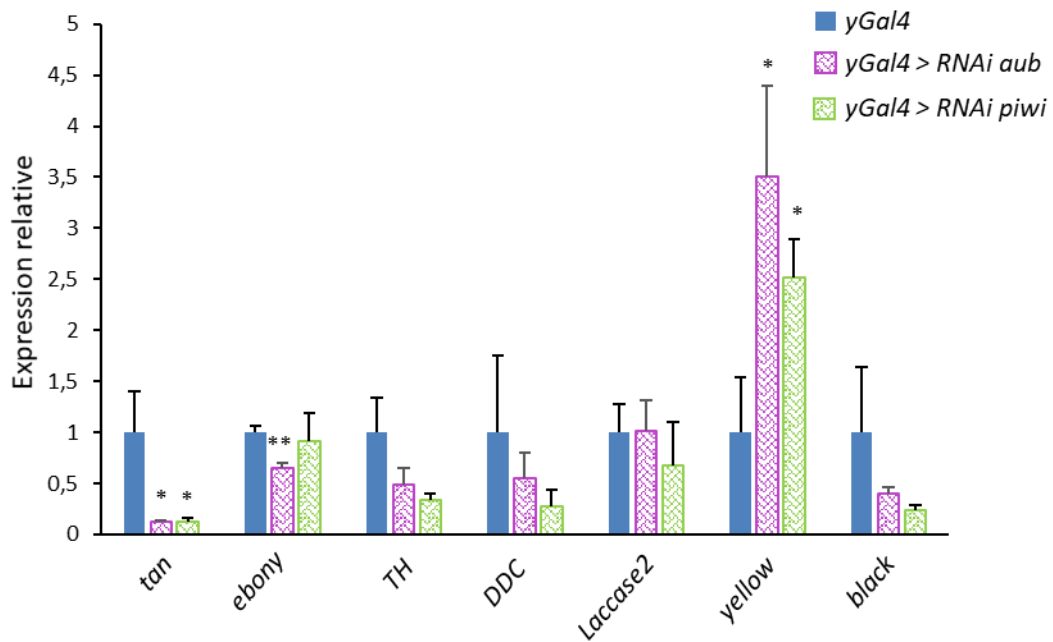


Figure 53 : Régulation de l'expression des gènes de pigmentation par *aub* et *piwi*. Quantification de l'expression des gènes de pigmentation dans les épidermes abdominaux (A5, A6, A7) de jeunes femelles *RNAi-piwi* ou *RNAi-aub* sous contrôle du pilote *y-Gal4*. n=3, *p<0,05 et **p<0,01.

VI) Etude du rôle de *lid* dans la plasticité thermique de la pigmentation

En plus de mieux comprendre le rôle de *lid* dans le réseau de régulation des gènes de la pigmentation, nous avons testé son rôle dans la plasticité thermique de la pigmentation. Le système *UAS-Gal4* étant sensible à la température, nous avons utilisé des individus portant un allèle perte de fonction pour *lid*, *lid^{k06801}* (Gildea et al., 2000) Cet allèle a été introgressé pendant 10 générations dans notre fond de référence *w¹¹¹⁸*. Les normes de réactions ont été réalisées avec des femelles *lid^{k06801}* hétérozygotes, car cet allèle est létal à l'état homozygote. Nous avons mesuré la pigmentation des segments A5, A6 et A7 de femelles *lid^{k06801/+}* et *w¹¹¹⁸* élevées à 18°C, 25°C et

29°C (Figure 54A). Les femelles *lid*^{k06801/+} sont moins pigmentées que les femelles *w*¹¹¹⁸ (effet G), mais cette baisse de pigmentation, similaire au phénotype des femelles *RNAi-trx*, n'est observée que pour A5. Pour les 3 segments, il y a un fort effet de la température (effet T), montrant que cette mutation n'abolit pas la plasticité thermique de la pigmentation. On n'observe une interaction entre le génotype et la température (effet GxT) que pour le segment A7. Cet effet faible ne permet pas de conclure de manière certaine sur un rôle de *lid* dans la plasticité de la pigmentation.

La diminution d'expression de *lid* et *trx* par *RNAi* induisant toutes les deux une baisse de pigmentation, nous avons combiné l'allèle *lid*^{k06801} avec l'allèle perte-de-fonction pour *trx*, *trx*^{14A6}. Ce mutant, déjà utilisé, a un faible effet sur la plasticité (Gibert et al., 2016). Comparé aux femelles *w*¹¹¹⁸, l'effet de du double hétérozygote *lid*^{k06801}, *trx*^{14A6} sur le génotype et la plasticité est faible (Figure 54B). Ces résultats ne permettent donc pas de conclure sur une implication de *lid* dans la plasticité thermique de la pigmentation. Il faudrait peut-être pouvoir le tester en condition perte de fonction totale pour pouvoir mettre en évidence un effet clair sur la plasticité thermique de la pigmentation. De plus une autre KDM, KDM2, chez la Drosophile, est impliquée comme Lid dans la déméthylation de H3K4me3 et pourrait avoir un effet redondant avec Lid.

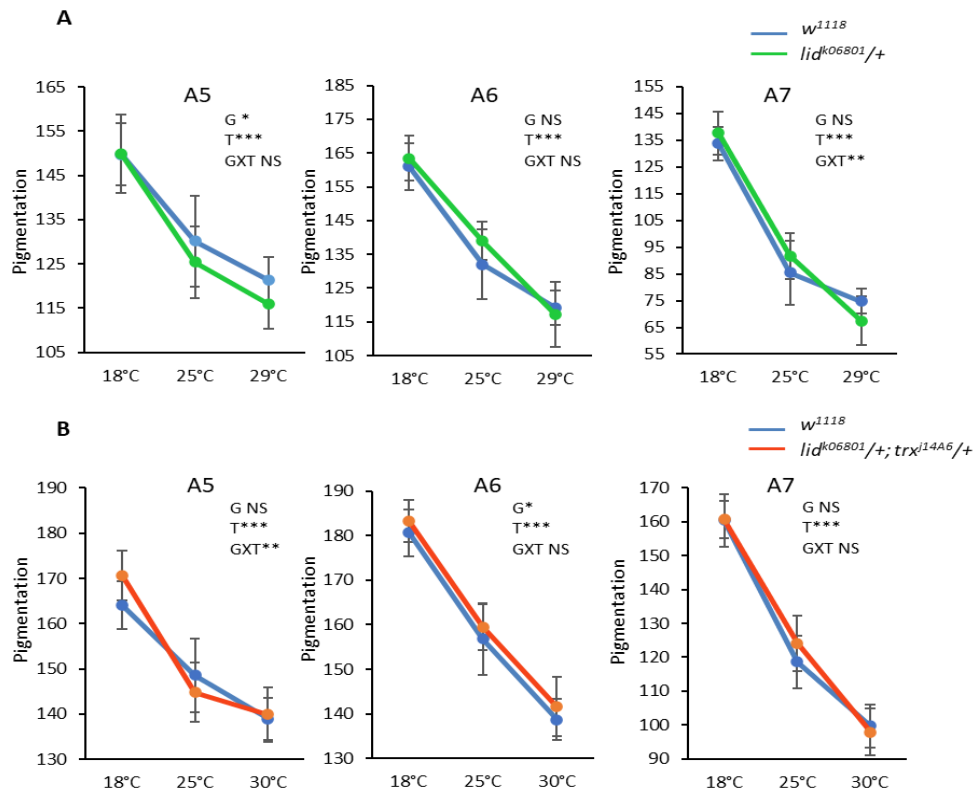


Figure 54 : Normes de réaction des mutants perte de fonction hétérozygotes *lid*^{k06801} et *lid*^{k06801}, *trx*^{J14A6} isogénisés en fond *w*¹¹¹⁸. n=15 cuticules par génotype et température. ANOVA Benjamini (*: <0,01; ** entre 0,001 et 0,01; * entre 0,01 et 0,05).**

VII) Conclusion : enrichissement du réseau de régulation des gènes de pigmentation.

L'étude du rôle de *lid* dans l'établissement de la pigmentation abdominale et la comparaison des transcriptomes *lid* KD et *trx* KD a mis en évidence de nouveaux acteurs dans le réseau de régulation des gènes de pigmentation, notamment *tan* (Figure 55). Ainsi, *lid* réprime *bab1* et active *tan*, mais *tan* ne semble pas être une cible directe de *lid*. De plus, nos résultats mettent en évidence l'implication dans ce réseau de régulation de certains gènes de la voie des piRNA, activés par *lid* et *trx*, dont *piwi* et *aub*, qui activent *tan*. Des expériences préliminaires suggèrent par ailleurs que

les voies de régulation de *tan* par *piwi/aub* et *bab1* sont indépendantes. La régulation de *tan* par *lid* pourrait donc être une conséquence de son action sur l'expression de *piwi/aub* et *bab1*, ce dernier étant un répresseur de *tan* (De Castro et al 2018). Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine de ces régulations, et notamment si l'effet de *piwi* et *aub* implique ou non des piRNA.

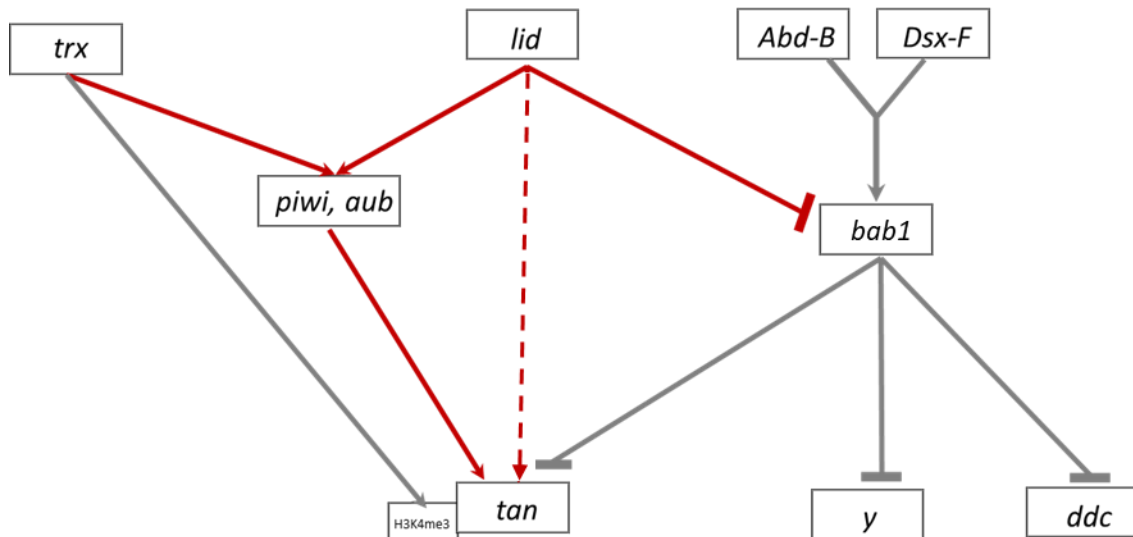


Figure 55 : Enrichissement du réseau de régulation des gènes de pigmentation. Les flèches rouges indiquent les régulations impliquant les nouveaux acteurs mis en évidence dans ce travail.

Matériel et méthodes

I) Stocks des lignées de drosophile

Les lignées utilisés pour *lid* sont les lignées *RNAi-lid* BL28944 et BL36652 de la collection *TRIP*, la lignée *UAS-lidHA* (Fly ORF, F001888), la lignée *UAS-lid^{MJC*}* (don de Julie Secombe) et la lignée *lid^{k06801}* (BL10403). Concernant *trx*, le mutant *trx^{14A6}* (BL12137) a été utilisé pour les normes de réaction et le transcriptome *trx KD* a été réalisé avec la lignée *TRIP RNAi-trx* BL33703. Les lignées *RNAi* des gènes candidats issus des analyses de transcriptomes sont pour la plupart (à l'exception de *SoYB*) des lignées *TRIP* dont la référence est indiquée dans le tableau 4 (voir résultats partie II, chapitre III). Les interactions génétiques avec *tan* et *bab1* ont été réalisées avec la lignée *UAS-tan* (don de Nicolas Gompel) et la lignée *RNAi-bab1* (KK106010, VDRC). Les pilotes Gal4 utilisés sont issus des lignées *pn-Gal4* (BL3039) et *y-Gal4* (BL44267). Toutes les lignées BL sont issues du « Bloomington Drosophila Stock Center ».

II) Préparation des cuticules pour la quantification de la pigmentation et l'acquisition des images

Pour l'observation et la quantification de la pigmentation des lignées utilisant le système *UAS-Gal4*, les drosophiles ont été élevées à 25°C. Pour les normes de réactions, les drosophiles ont été élevées à 18°C, 25°C ou 29°C. La pigmentation abdominale des segments A5, A6 et A7 est mesurée sur des femelles âgées de 5 jours. Celles-ci sont placées pendant 10 jours dans de l'éthanol à 70% puis disséquées dans ce même milieu. Pour la dissection, elles sont coupées au niveau du segment A1 et à gauche de la ligne médiane

dorsale, puis les abdomens sont vidés de leur contenu. Les cuticules disséquées sont déshydratées pendant 5 minutes dans de l'éthanol à 100% puis montées à plat entre lame et lamelle dans l'Euparal (Roth). La préparation est ensuite solidifiée pendant une nuit à 65°C. Les lames sont observées sous une loupe à la lumière blanche et photographiées avec le logiciel Leica IM50 Image Manager en conservant à chaque fois les mêmes réglages. La pigmentation des héli-segments A5, A6 et A7 de 15 drosophiles femelles est quantifiée avec le logiciel ImageJ. Chaque héli-segment est encerclé jusqu'au milieu de la ligne dorsale médiane (Figure 56, cadre jaune) puis la pigmentation est mesurée en utilisant l'intensité moyenne de la pigmentation en pixels (Figure 56, cadre rouge). La significativité des résultats de quantification est déterminée par T.TEST pour la comparaison de la pigmentation entre femelles *RNAi* et femelles contrôles, ou par ANOVA pour l'analyse des normes de réaction. L'homogénéité des variances entre les groupes est testée avec un test de Levene. Si elles sont homogènes et si les résidus sont normalement distribués, une ANOVA à 2 facteurs est utilisée (Génotype et température). Si les variances ne sont pas homogènes, ou si les résidus de l'ANOVA ne sont pas normalement distribués, une « ANOVA on aligned rank transformed data » est utilisée.

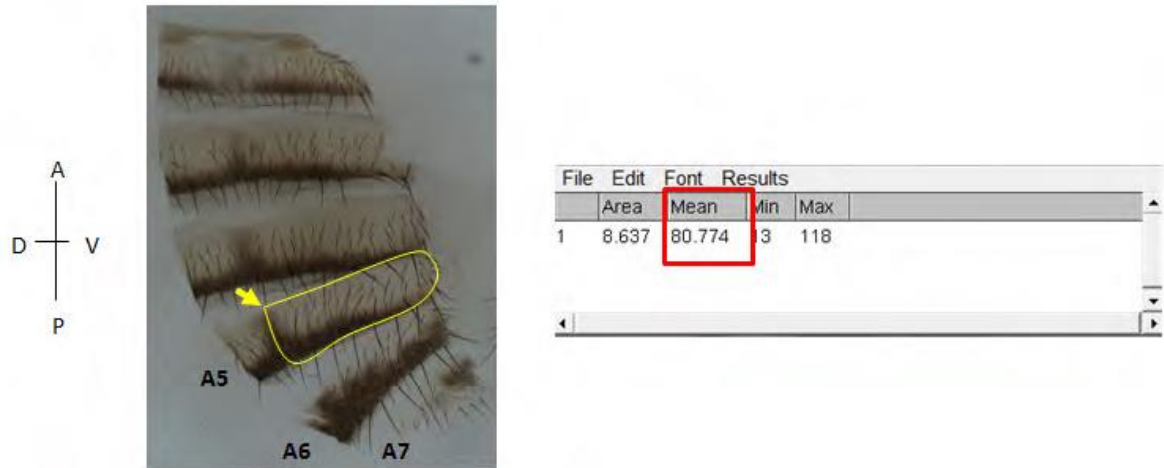


Figure 56 : Quantification de la pigmentation abdominale des héli-segments (A5, A6 et A7). Quantification du segment A5 d'une drosophile femelle sur ImageJ. L'ensemble de l'héli-segment est entouré jusqu'au milieu de la ligne dorsale médiane (flèche jaune). A-Antérieur, P-Postérieur, D-Dos, V-Ventre (d'après De Castro, thèse Sorbonne Université).

III) Analyse de l'expression de gènes par RT-qPCR sur épidermes abdominaux postérieurs de drosophiles femelles

L'expression des gènes dans les épidermes abdominaux postérieurs de jeunes femelles est mesurée dans un pool de 30 abdomens postérieurs (A5, A6 et A7) disséqués (Figure 57). Pour chaque expérience, 3 réplicats sont analysés. L'ARN est extrait de ce matériel en utilisant le kit RNeasy mini (Quiagen). Après extraction les ARN sont traités à la DNase, la synthèse des ADNc est faite grâce à la LunaScrip RT SuperMix (Biolabs) avec des « randoms primers » en suivant le protocole du kit. L'expression des gènes est quantifiée par qPCR (SYBR-Green, Ssofast Eva Green Supermix ») sur une machine CFX96 (Biorad). La quantification d'expression est réalisée avec la méthode de Pfaffl (Pfaffl, 2001) en normalisant sur la moyenne géométrique de 2 gènes de référence, *RP49* et *Spt6* (Vandesompele et al., 2002).

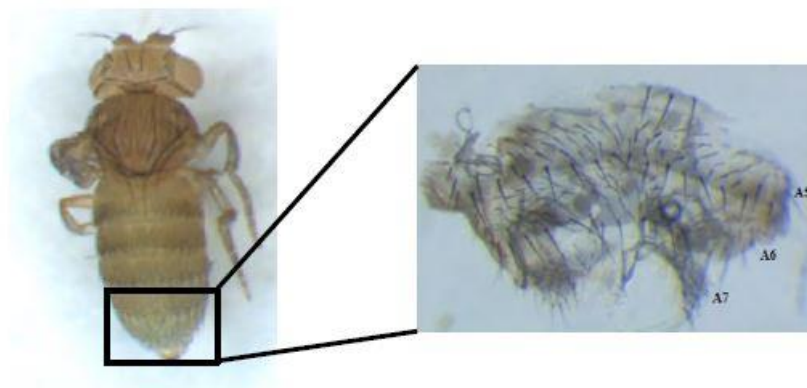


Figure 57 : Photo des segments A5, A6 et A7 après dissection pour extraction d'ARN. A gauche, une jeune drosophile femelle âgée de moins d'une heure. L'abdomen est complètement non pigmenté, c'est à ce stade que les femelles sont disséquées. A droite, photo d'un épiderme abdominal postérieur après dissection. Seuls les segments postérieurs A5, A6 et A7 sont disséqués en enlevant l'appareil génital (d'après De Castro, thèse Sorbonne Université).

IV) Immunoprécipitation de chromatine (ChIP)

La chromatine est extraite d'un lot de 170 abdomens postérieurs de jeunes femelles disséquées dans du PBS, selon le même protocole de dissection que pour les extractions d'ARN (Figure 57). Les abdomens sont fixés pendant 10 minutes à 25°C en PFA 1%, puis la fixation est stoppée par ajout de glycine 1,25M suivi de lavages au PBS. Les tissus ainsi fixés sont stockés à -80°C jusqu'à préparation de la chromatine. La préparation de chromatine et l'expérience de ChIP ont été réalisées comme précédemment décrit (Gibert et al., 2016), en utilisant un anti- H3K4me3 de lapin (15410003, Diagenode) ou un sérum de lapin comme contrôle négatif (Diagenode). Un aliquot de chromatine avant immunoprécipitation est conservé pour la quantification (« input »). Les fragments immunoprécipités sont analysés par qPCR et leur enrichissement calculé en « pourcentage d'input ».

V) Amorces utilisées pour les expériences de RT-qPCR et ChIP-qPCR

Pour la quantification de l'expression des gènes de pigmentation et de *bab1* et la quantification de la marque H3K4me3 sur le promoteur de *tan*, les amorces utilisées ont été décrites précédemment (Gibert et al. 2016, De Castro et al. 2018). Le tableau 5 présente les amorces utilisées pour la quantification de l'expression des gènes candidats issus des analyses transcriptomiques.

Gène	Amorce	Séquence 5'-3'
<i>aub</i>	aub F	ACCAGTACCGCGTCGATTTT
	aub R	AATGTTTTCGCCAGCACGAC
<i>del</i>	del F	CCGAGCATACCGCTGAGAAA
	del R	CTTGCTGGGACTCGGATGTT
<i>spn-E</i>	spn-E F	TCGTCGCCAAGGAAAAGTGT
	spn-E R	TCGGTGTCCAAAATCGTCCAG
<i>piwi</i>	piwi F	TGGAGTTTGAGCCGAGCATC
	piwi R	AGCTTCGACTTTCCGCTGAG
<i>zuc</i>	zuc F	CGTCCCCATTACCACGAACT
	zuc R	GTCCAAGAGCCGTCCAGTTT
<i>Ago2</i>	Ago2 F	CGAGACAACAGCCATCCACA
	Ago2 R	CATCCTTCTGCGTCTTGGGA
<i>mael</i>	mael F	ATGGCGGACTTGACTATCCCT
	mael R	CTTGGCTTCTGTTGCGAGTG

Tableau 5 : Liste des amorces utilisées pour quantifier l'expression de certains gènes candidats.

VI) Obtention par RNA-seq des transcriptomes *lid-KD* et *trx-KD* et analyse

Les ARN de 3 réplicats de 30 abdomens de pupes femelles âgées pour chaque génotype (*y-Gal4, y-Gal4, RNAi-lid, y-Gal4, RNAi-trx/+*) ont été extraits en utilisant le kit RNeasy mini (Quiagen). Les bibliothèques ont été préparées (kit « Stranded_Total-RNA_RiboZero-Gold”) et les séquençages réalisés (Illumina NovaSeq 600) par Fasteris. Le contrôle de la qualité des séquences a été réalisé en utilisant FastQC (version 0.11.9). Pour l’alignement des séquences, la version 6.41 (dmel6.41 Flybase) du génome de *D. melanogaster* a été utilisée. Les séquences ont été alignées sur le génome dmel6.41 en utilisant HISAT2 (Galaxy version 2.1.0) et comptées avec FeatureCount (Galaxy version 1.6.4). L’analyse différentielle a été faite avec DESeq2 (Galaxy version 1.6.0.6). Le tableau 6 indique le nombre de séquences (« reads ») obtenus et analysés pour chaque échantillon.

Nom de l'échantillon	génotype	Reads totaux	Reads non alignés	Reads multi-alignés	Reads alignés une seule fois, utilisés pour l'analyse
L1	w1118 ; y-Gal4	46,31	18,17	6,16	21,98
L3	w1118 ; y-Gal4	57,66	19,16	9,21	29,29
L4	w1118 ; y-Gal4	46,91	17,99	9,2	19,72
T1	y-Gal4 ; UAS-RNAi-trx	52,26	19,84	9,89	22,53
T2	y-Gal4 ; UAS-RNAi-trx	50,14	19,19	6,94	24,01
T3	y-Gal4 ; UAS-RNAi-trx	47,14	16,7	7,82	22,62
Y1	y-Gal4 ; UAS-RNAi-lid	41,99	15,54	7,52	18,93
Y3	y-Gal4 ; UAS-RNAi-lid	45,49	17,58	6,91	21
Y5	y-Gal4 ; UAS-RNAi-lid	51,43	17,22	7,92	26,29

Tableau 6 : Nombres de séquences (« reads ») totales et utilisées pour l’analyse transcriptomiques des lignée RNAi-lid et RNAi-trx. L’unité est en millions de reads (10^6).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

DISCUSSION & PERSPECTIVES

Mes travaux de thèse ont consisté à analyser les rôles de régulateurs de marques d'histones dans le réseau de régulation des gènes de la pigmentation et sa plasticité. J'ai étudié les membres du complexe DotCom qui dépose la marque H3K79me3 grâce à l'activité de l'histone méthyl-transférase Grappa (Gpp) ainsi que l'histone déméthylase Lid qui retire la marque H3K4me3. J'ai montré que le complexe DotCom est impliqué dans la mise en place de la pigmentation *via* la régulation des gènes *yellow* et *tan* et qu'il joue aussi un rôle dans la plasticité thermique de la pigmentation. Concernant Lid, j'ai confirmé et complété les résultats du crible génétique qui avait montré son implication dans l'établissement de la pigmentation. Lid étant impliqué dans la régulation de la même marque d'histone que Trx, j'ai généré et analysé le transcriptome d'épidermes abdominaux d'individus *RNAi* pour *lid* ou *trx*. Ce travail m'a permis d'identifier les cibles transcriptionnelles de ces deux gènes. Pour certaines de ces cibles, j'ai montré qu'elles étaient impliquées dans l'établissement de la pigmentation abdominale. Parmi ces cibles, j'ai approfondi mon étude sur des gènes de la voie des piRNA, dont *aub* et *piwi*, qui sont activés par *lid* et *trx* dans les épidermes abdominaux et également modulés par la température. J'ai montré que *aub* et *piwi* activent l'expression de *tan*. Ce travail m'a permis d'enrichir le réseau de régulation déjà connu des gènes de pigmentation, et ouvre de nouvelles perspectives sur l'implication de nouveaux acteurs et mécanismes. Ces résultats devront être complétés pour identifier les mécanismes par lesquels certains gènes de la voie des piRNA interviennent dans l'établissement de la pigmentation.

I) Régulation de l'établissement et la plasticité de la pigmentation abdominale par le complexe DotCom

L'étude de l'implication du complexe DotCom dans l'établissement de la pigmentation a révélé que sa sous-unité catalytique, Gpp, joue des rôles différents dans la mise en place de la pigmentation en fonction du stade de développement. Ceci est corrélé avec le fait que l'action de Gpp pendant la vie larvaire induit une répression de *yellow*, et son action à la fin de la vie pupale induit une activation de *tan*. Aucun de ces gènes de pigmentation ne semble être une cible directe de Gpp. En effet, on observe une augmentation de l'expression de *yellow*, un gène qui s'exprime en fin de vie pupale, quand le RNAi *gpp* est induit dès le stade larvaire, avec le pilote *pn-Gal4*. Quant à *tan*, le niveau de la marque H3K479me3 sur son promoteur ne varie pas chez les individus *RNAi gpp*. Des expériences de RNA-seq dans des épidermes abdominaux d'individus *RNAi gpp* couplées à des expériences de ChIP-seq contre la marque H3K79me3 sont nécessaires pour identifier les cibles directes de Gpp aux différents stades du développement et les acteurs intermédiaires entre Gpp et les gènes de pigmentation.

Comme expliqué dans l'introduction, les marques d'histones H2BK120ub et H4K16ac facilitent le dépôt de la marque H3K79me3. Chez *D. melanogaster*, ces marques sont déposées respectivement par Bre1 et MOF. Il serait intéressant d'étudier les effets d'une sous-expression de ces gènes sur la pigmentation abdominale et sa plasticité. On pourrait ensuite identifier les cibles communes à DotCom, MOF et Bre1 par RNA-seq et ChIP-seq.

L'étude des normes de réaction d'un mutant hétérozygote perte de fonction pour *gpp* et *alh* montrent que le complexe DotCom est impliqué dans la plasticité thermique de la pigmentation. Afin de déterminer les mécanismes médiant l'effet de la température sur

l'action de ce complexe, il serait intéressant d'identifier, par ChIP-seq, les gènes dont le niveau de H3K79me3 varie entre 18°C et 29°C dans des épidermes pupaux. Cette liste, comparée aux résultats de transcriptome d'individus *RNAi gpp* et d'individus contrôles élevés à 18°C et 29°C, permettra d'identifier les cibles de Gpp impliquées dans la plasticité thermique de la pigmentation.

Chez l'homme, l'enzyme KDM2B a été identifiée comme étant une déméthylase de H3K79me3. Son homologue fonctionnel chez *D. melanogaster* est Kdm2. Cependant les études biochimiques réalisées sur cette enzyme n'ont mis en évidence qu'une activité déméthylase pour les marques H3K36me3 et H3K4me3 qui est redondante avec l'activité déméthylase de Lid. Comme discuté plus bas, des individus *RNAi kdm2* présentent une diminution de pigmentation similaire à celle d'individus *RNAi gpp* et *RNAi lid*. Ce résultat montre donc que *kdm2* joue un rôle dans l'établissement de la pigmentation abdominale. L'analyse du niveau des marques H3K4me3 et H3K79me3 dans les épidermes abdominaux d'individus *RNAi kdm2*, comparé à celui d'individus *RNAi lid*, permettrait de déterminer si Kdm2 est également impliquée dans le retrait de la marque H3K79me3.

II) Implication des protéines régulant la marque d'histone H3K4me3 dans la mise en place de la pigmentation et sa plasticité

Les analyses des transcriptomes d'épidermes abdominaux d'individus *RNAi* pour *lid* et *trx* montrent que ces deux gènes partagent un nombre important de cibles communes, qu'ils régulent dans le même sens. Ainsi, bien que Lid et Trx aient une action antagoniste sur la même marque d'histone, ce résultat suggère qu'ils régulent ensemble l'expression de nombreux gènes. Ce travail m'a également permis d'identifier, comme acteurs du réseau

de régulation des gènes de pigmentation, certains gènes de la voie des piRNA, comme *piwi* et *aub*. Cette observation est surprenante car les mécanismes liés aux piRNA ont longtemps été considérés comme exclusifs de la lignée germinale, dans laquelle ils régulent les éléments transposables, et aucune régulation par des acteurs de la voie des piRNA n'a été décrite dans des épidermes.

1) Par quels mécanismes *aub* et *piwi* sont-ils impliqués dans la mise en place de la pigmentation et sa plasticité ?

Les résultats obtenus suite à l'analyse des candidats Aub et Piwi sont surprenants. En effet Piwi et Aub sont deux protéines impliquées dans la voie de biosynthèse des piRNA dans les ovaires, à la fois dans les cellules germinales et les cellules folliculaire, ces dernières étant des cellules somatiques tout comme les cellules de l'épiderme abdominale. Mes résultats ont été obtenus avec le pilote *yGal4* qui s'exprime pendant la deuxième moitié du développement pupal. Il serait intéressant d'utiliser le pilote *pnrGal4* et le système *Gal80^{ts}* afin de mieux comprendre la temporalité de ce mécanisme de régulation. Le phénotype de baisse de pigmentation des individus *RNAi aub* et *piwi* doit être confirmé avec des mutants perte de fonction pour ces gènes, isogénisés en fond *w¹¹¹¹⁸*. Ces mutants permettront aussi d'établir des normes de réaction afin de voir si *piwi* et *aub* sont impliqués dans la plasticité phénotypique. De façon intéressante, la quantité de piRNA dans les ovaires est plus faible à 18°C qu'à 29°C (Fast et al., 2017).

Concernant le mécanisme d'action de Piwi et Aub au cours de l'établissement de la pigmentation abdominale, la première possibilité est qu'il fasse intervenir des piRNA. En effet, de plus en plus de travaux mettent en évidence leur présence dans des tissus somatiques chez des organismes variés, par exemple dans le système nerveux (Wakisaka et al., 2019). Des expériences de « small-seq » permettront de caractériser les petit ARN

présents dans l'épiderme abdominal pupal d'individus contrôles. Si nous mettons en évidence des piRNA, leur analyse permettra de déterminer s'il s'agit de piRNA primaires ou secondaires et d'identifier leurs cibles. Il existe peu d'exemples de piRNA régulant directement la transcription de gènes (Saito et al., 2009). Néanmoins la présence d'éléments transposables cibles de ces piRNA, localisés à proximité ou dans des gènes, pourrait avoir un effet sur l'expression de ces gènes. Dans un second temps, le séquençage des petits ARN pourra être réalisé dans les épidermes abdominaux d'individus perte de fonction ou *RNAi* pour *piwi*, *aub* et *lid*. En plus de réguler l'expression de *piwi* et *aub*, *Lid* pourrait aussi intervenir directement dans la régulation de la production des piRNA. En effet, dans cellules folliculaires, les piRNA « clusters » sont dits « uni-strand ». Ils possèdent un promoteur enrichi en H3K4me3 et sont transcrits par l'ARN PolIII, ce qui n'est pas le cas des « clusters » germinaux (Czech et al, 2018). D'après le modèle de Lloret-Linares et al. (Figure 35) (Lloret-Linares et al., 2012), *Lid* participerait à l'activation de la transcription en permettant le dépôt de H3K4me3 par le recrutement de ASH2 qui recrute ensuite l'ARN Pol II. *Lid* pourrait donc participer à l'activation des « clusters uni-strand » pour réguler la production des piRNA.

Il est aussi possible que *Piwi* et *Aub* participent à l'établissement de la pigmentation par un mécanisme indépendant des piRNA. En effet, il existe plusieurs exemples de régulation de l'expression des gènes chez différents organismes impliquant ces protéines sans l'intervention de piRNA (Figure 48) (Rammat et Simonelig, 2021). Si nous ne détectons pas de piRNA dans l'épiderme abdominal, nous caractériserons les ARN et protéines interagissant avec *Piwi* et *Aub* grâce à des expériences d'immunoprécipitation à partir d'extraits protéiques d'épidermes abdominaux contrôles, suivies de la caractérisation par séquençage ou spectrométrie de masse des ARN et protéines co-immunoprécipitées avec *Piwi* et *Aub*.

2) Comment préciser la position de *lid*, *piwi* et *aub* dans le réseau de régulation des gènes de pigmentation ?

Nos travaux ont montré que *lid* est impliqué dans la régulation de l'expression du gène de pigmentation *tan*, et que cette régulation pourrait se faire notamment par l'intermédiaire du facteur de transcription Bab1. De nouveaux gènes en aval de *lid* dans le réseau de régulation ont été identifiés grâce aux analyses de transcriptomes. Afin de positionner ces gènes et d'identifier les cibles directes de Lid, il faudrait étudier par ChIP-seq la distribution de la marque H3K4me3 dans des épidermes abdominaux contrôles, et comparer ces données avec les transcriptomes des épidermes d'individus *RNAi-lid*. Il serait également intéressant d'identifier par ChIP-seq les sites de fixation à la chromatine de Lid. La comparaison des gènes enrichis en H3K4me3 et en Lid pourrait nous renseigner sur les mécanismes d'action de Lid dans notre modèle. En effet, nous avons montré que l'activité déméthylase de Lid est impliquée dans la mise en place de la pigmentation. Cependant, le phénotype de diminution de pigmentation induit par la sur-expression d'une forme de Lid dépourvue d'activité déméthylase n'est pas complètement identique à celui induit par un RNAi dirigé contre *lid*. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que certains mécanismes d'actions de Lid sont indépendants de son activité déméthylase (Li et al. 2010 ; Drelon et al., 2018 ; Liu et al., 2014 ; Liu et Secomb 2015). De plus, Lid interagit avec le complexe histone déacétylase SIN3 (Torres-Campana et al., 2020, Torres-Campana et al., 2022). La recherche des partenaires physiques de Lid dans les protéomes de têtes de *D. melanogaster* a permis d'identifier de nouveaux interacteurs physiques comme des membres des complexes de remodelage SWI/SNF et NURF, le complexe NSL et plusieurs protéines insulatrices (Yheskel et al., 2023). Il serait intéressant d'étudier si

le complexe SIN3 ainsi que les partenaires de Lid identifiés dans les protéomes de têtes participent, avec Lid, à l'établissement de la pigmentation abdominale.

L'identification des cibles directes de Lid dans l'épiderme abdominal permettra également de déterminer si *piwi* et *aub* en font partie. Si ce n'est pas le cas, il sera intéressant d'identifier les facteurs de transcription médiant l'effet de Lid sur l'expression de ces gènes. J'ai réalisé une analyse préliminaire de recherche de motifs de fixation pour des facteurs de transcriptions dans les séquences en amont des gènes de la voie des piRNA dérégulés dans le transcriptome *RNAi lid* et j'ai comparé les motifs enrichis aux motifs enrichis issus de l'analyse de tous les gènes sous-exprimés dans le *RNAi lid* (STREME, MEME suite 5.5.0). Parmi la liste des facteurs de transcription ainsi identifiés se trouvent Bab1 (motif de fixation sur *piwi*) et Aef (motif de fixation sur *aub* et *spn-E*). Il faudra poursuivre cette analyse bio-informatique, puis analyser par des expériences d'interaction génétique, d'étude d'expression et de fixation à la chromatine, si les facteurs de transcription identifiés jouent un rôle dans l'établissement de la pigmentation en amont de *piwi* et *aub*.

3) L'histone déméthylase Kdm2 est-elle redondante fonctionnellement avec Lid dans l'établissement de la pigmentation et sa plasticité ?

Chez *D. melanogaster*, il existe deux déméthylases spécifiques de H3K4me3, Lid et Kdm2. Des résultats préliminaires du laboratoire montrent que les individus *RNAi kdm2* présentent le même phénotype de baisse de pigmentation que les individus *RNAi lid* et *lid* et *kdm2* ont un effet additif sur la pigmentation abdominale. Par ailleurs *kdm2*, comme *lid*, active *tan*. Enfin, la perte de fonction totale de *kdm2*, qui est viable contrairement à celle de *lid*, modifie la plasticité thermique de la pigmentation. Ces résultats suggèrent donc que *lid* et *kdm2* pourraient agir de manière redondante dans l'établissement et la

plasticité de la pigmentation. Une telle redondance a déjà été mise en évidence dans le contrôle du développement (Li et al., 2010). Cette redondance pourrait expliquer le fait que le mutant hétérozygote *lidk⁰⁶⁸⁰¹* n'ait pas un effet significatif sur la pigmentation et sa plasticité. L'analyse du transcriptome d'épidermes abdominaux d'individus RNAi pour *lid* et *kdm2* permettrait de confirmer les cibles déjà identifiées et peut être d'en découvrir de nouvelles.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- Agbleke, Andrews Akwasi, Assaf Amitai, Jason D. Buenrostro, Aditi Chakrabarti, Lingluo Chu, Anders S. Hansen, and others, 'Advances in Chromatin and Chromosome Research: Perspectives from Multiple Fields', *Molecular Cell*, 79.6 (2020), 881–901 <<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.07.003>>
- Agrawal, Anurag A., Christian Laforsch, and Ralph Tollrian, 'Transgenerational Induction of Defences in Animals and Plants', *Nature*, 401.6748 (1999), 60–63 <<https://doi.org/10.1038/43425>>
- Ahmad, Kami, Steven Henikoff, and Srinivas Ramachandran, 'Managing the Steady State Chromatin Landscape by Nucleosome Dynamics', *Annual Review of Biochemistry*, 91.1 (2022), 183–95 <<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-032620-104508>>
- Akhtar, A., D. Zink, and P. B. Becker, 'Chromodomains Are Protein-RNA Interaction Modules', *Nature*, 407.6802 (2000), 405–9 <<https://doi.org/10.1038/35030169>>
- Akiyama, Noriyoshi, Shoma Sato, Kentaro M. Tanaka, Takaomi Sakai, and Aya Takahashi, 'The Role of the Epidermis Enhancer Element in Positive and Negative Transcriptional Regulation of Ebony in *Drosophila Melanogaster*', *G3 (Bethesda, Md.)*, 12.3 (2022), jkac010 <<https://doi.org/10.1093/g3journal/jkac010>>
- Allfrey, V. G., R. Faulkner, and A. E. Mirsky, 'ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 51.5 (1964), 786–94 <<https://doi.org/10.1073/pnas.51.5.786>>
- Allis, C. David, and Thomas Jenuwein, 'The Molecular Hallmarks of Epigenetic Control', *Nature Reviews Genetics*, 17.8 (2016), 487–500 <<https://doi.org/10.1038/nrg.2016.59>>
- Armeev, Grigoriy A., Anastasiia S. Kniazeva, Galina A. Komarova, Mikhail P. Kirpichnikov, and Alexey K. Shaytan, 'Histone Dynamics Mediate DNA Unwrapping and Sliding in Nucleosomes', *Nature Communications*, 12.1 (2021), 2387 <<https://doi.org/10.1038/s41467-021-22636-9>>
- Aubret, Fabien, and Richard Shine, 'Genetic Assimilation and the Postcolonization Erosion of Phenotypic Plasticity in Island Tiger Snakes', *Current Biology*, 19.22 (2009), 1932–36 <<https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.09.061>>
- Auld, Josh R., Anurag A. Agrawal, and Rick A. Relyea, 'Re-Evaluating the Costs and Limits of Adaptive Phenotypic Plasticity', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277.1681 (2010), 503–11 <<https://doi.org/10.1098/rspb.2009.1355>>
- Baldwin, J. Mark, "A New Factor in Evolution." *The American Naturalist* 30, No. 354: 441–51. 0., 1896

- Bannister, Andrew J, and Tony Kouzarides, 'Regulation of Chromatin by Histone Modifications', *Cell Research*, 21.3 (2011), 381–95
<<https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>>
- Barski, Artem, Suresh Cuddapah, Kairong Cui, Tae-Young Roh, Dustin E. Schones, Zhibin Wang, and others, 'High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome', *Cell*, 129.4 (2007), 823–37
<<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.009>>
- Bartke, Till, Michiel Vermeulen, Blerta Xhemalce, Samuel C. Robson, Matthias Mann, and Tony Kouzarides, 'Nucleosome-Interacting Proteins Regulated by DNA and Histone Methylation', *Cell*, 143.3 (2010), 470–84
<<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.012>>
- Bastide, Héloïse, Andrea Betancourt, Viola Nolte, Raymond Tobler, Petra Stöbe, Andreas Futschik, and others, 'A Genome-Wide, Fine-Scale Map of Natural Pigmentation Variation in *Drosophila Melanogaster*', *PLoS Genetics*, 9.6 (2013), e1003534
<<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003534>>
- Bastide, Héloïse, Amir Yassin, Evan J Johanning, and John E Pool, 'Pigmentation in *Drosophila Melanogaster* Reaches Its Maximum in Ethiopia and Correlates Most Strongly with Ultra-Violet Radiation in Sub-Saharan Africa', *BMC Evolutionary Biology*, 14.1 (2014), 179 <<https://doi.org/10.1186/s12862-014-0179-y>>
- Bateman, K. G., 'The Genetic Assimilation of the Dumpy Phenocopy', *Journal of Genetics*, 56.3 (1959), 341–51 <<https://doi.org/10.1007/BF02984790>>
- Beisel, Christian, Andreas Bunes, Ian M. Roustan-Espinosa, Britta Koch, Sabine Schmitt, Stefan A. Haas, and others, 'Comparing Active and Repressed Expression States of Genes Controlled by the Polycomb/Trithorax Group Proteins', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104.42 (2007), 16615–20
<<https://doi.org/10.1073/pnas.0701538104>>
- Bergland, Alan O, Anne Genissel, Sergey V Nuzhdin, and Marc Tatar, 'Quantitative Trait Loci Affecting Phenotypic Plasticity and the Allometric Relationship of Ovariole Number and Thorax Length in *Drosophila Melanogaster*', *Genetics*, 180.1 (2008), 567–82 <<https://doi.org/10.1534/genetics.108.088906>>
- Beuchle, Dirk, Gary Struhl, and Jürg Müller, 'Polycomb Group Proteins and Heritable Silencing of *Drosophila* Hox Genes', *Development*, 128.6 (2001), 993–1004
<<https://doi.org/10.1242/dev.128.6.993>>
- Black, Joshua C., Capucine Van Rechem, and Johnathan R. Whetstine, 'Histone Lysine Methylation Dynamics: Establishment, Regulation, and Biological Impact', *Molecular Cell*, 48.4 (2012), 491–507
<<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.11.006>>
- Blackledge, Neil P., Anca M. Farcas, Takashi Kondo, Hamish W. King, Joanna F. McGouran, Lars L.P. Hanssen, and others, 'Variant PRC1 Complex-Dependent H2A Ubiquitylation Drives PRC2 Recruitment and Polycomb Domain Formation', *Cell*, 157.6 (2014), 1445–59 <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.004>>

- Boeger, Hinrich, Joachim Griesenbeck, J.Seth Strattan, and Roger D Kornberg, 'Removal of Promoter Nucleosomes by Disassembly Rather Than Sliding In Vivo', *Molecular Cell*, 14.5 (2004), 667–73 <<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.05.013>>
- Bonasio, Roberto, Qiye Li, Jinmin Lian, Navdeep S. Mutti, Lijun Jin, Hongmei Zhao, and others, 'Genome-Wide and Caste-Specific DNA Methylation of the Ants *Camponotus Floridanus* and *Harpegnathos Saltator*', *Current Biology*, 22.19 (2012), 1755–64 <<https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.07.042>>
- Bonn, Stefan, Robert P Zinzen, Charles Girardot, E Hilary Gustafson, Alexis Perez-Gonzalez, Nicolas Delhomme, and others, 'Tissue-Specific Analysis of Chromatin State Identifies Temporal Signatures of Enhancer Activity during Embryonic Development', *Nature Genetics*, 44.2 (2012), 148–56 <<https://doi.org/10.1038/ng.1064>>
- Bracken, Adrian P., Nikolaj Dietrich, Diego Pasini, Klaus H. Hansen, and Kristian Helin, 'Genome-Wide Mapping of Polycomb Target Genes Unravels Their Roles in Cell Fate Transitions', *Genes & Development*, 20.9 (2006), 1123–36 <<https://doi.org/10.1101/gad.381706>>
- Brackley, Chris A., James Johnson, Steven Kelly, Peter R. Cook, and Davide Marenduzzo, 'Simulated Binding of Transcription Factors to Active and Inactive Regions Folds Human Chromosomes into Loops, Rosettes and Topological Domains', *Nucleic Acids Research*, 44.8 (2016), 3503–12 <<https://doi.org/10.1093/nar/gkw135>>
- Bradshaw, A.D., 'Evolutionary Significance of Phenotypic Plasticity in Plants', in *Advances in Genetics* (Elsevier, 1965), XIII, 115–55 <[https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(08\)60048-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(08)60048-6)>
- Breiling, Achim, and Frank Lyko, 'Epigenetic Regulatory Functions of DNA Modifications: 5-Methylcytosine and Beyond', *Epigenetics & Chromatin*, 8.1 (2015), 24 <<https://doi.org/10.1186/s13072-015-0016-6>>
- Britten, R. J., and D. E. Kohne, 'Repeated Sequences in DNA: Hundreds of Thousands of Copies of DNA Sequences Have Been Incorporated into the Genomes of Higher Organisms.', *Science*, 161.3841 (1968), 529–40 <<https://doi.org/10.1126/science.161.3841.529>>
- Brockdorff, Neil, Joseph S. Bowness, and Guifeng Wei, 'Progress toward Understanding Chromosome Silencing by Xist RNA', *Genes & Development*, 34.11–12 (2020), 733–44 <<https://doi.org/10.1101/gad.337196.120>>
- Brown, J. Lesley, Diane Mucci, Mary Whiteley, Marie-Luise Dirksen, and Judith A. Kassis, 'The *Drosophila* Polycomb Group Gene *Pleiohomeotic* Encodes a DNA Binding Protein with Homology to the Transcription Factor YY1', *Molecular Cell*, 1.7 (1998), 1057–64 <[https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80106-9](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80106-9)>
- Buckle, Adam, Chris A. Brackley, Shelagh Boyle, Davide Marenduzzo, and Nick Gilbert, 'Polymer Simulations of Heteromorphic Chromatin Predict the 3D Folding of Complex Genomic Loci', *Molecular Cell*, 72.4 (2018), 786–797.e11 <<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.09.016>>

- Calleja, Manuel, Hector Herranz, Carlos Estella, José Casal, Peter Lawrence, Pat Simpson, and others, 'Generation of Medial and Lateral Dorsal Body Domains by the *Pannier* Gene of *Drosophila*', *Development*, 127.18 (2000), 3971–80
<<https://doi.org/10.1242/dev.127.18.3971>>
- Camino, Eric M., John C. Butts, Alison Ordway, Jordan E. Vellky, Mark Rebeiz, and Thomas M. Williams, 'The Evolutionary Origination and Diversification of a Dimorphic Gene Regulatory Network through Parallel Innovations in Cis and Trans', ed. by Michael B. Eisen, *PLOS Genetics*, 11.4 (2015), e1005136
<<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005136>>
- Cao, Ru, Liangjun Wang, Hengbin Wang, Li Xia, Hediye Erdjument-Bromage, Paul Tempst, and others, 'Role of Histone H3 Lysine 27 Methylation in Polycomb-Group Silencing', *Science*, 298.5595 (2002), 1039–43
<<https://doi.org/10.1126/science.1076997>>
- Casier, Karine, Valérie Delmarre, Nathalie Gueguen, Catherine Hermant, Elise Viodé, Chantal Vaury, and others, 'Environmentally-Induced Epigenetic Conversion of a piRNA Cluster', *eLife*, 8 (2019), e39842 <<https://doi.org/10.7554/eLife.39842>>
- Charlet, Jessica, Christopher E. Duymich, Fides D. Lay, Kamilla Mundbjerg, Karina Dalsgaard Sørensen, Gangning Liang, and others, 'Bivalent Regions of Cytosine Methylation and H3K27 Acetylation Suggest an Active Role for DNA Methylation at Enhancers', *Molecular Cell*, 62.3 (2016), 422–31
<<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.03.033>>
- Chen, Jiekai, He Liu, Jing Liu, Jing Qi, Bei Wei, Jiaqi Yang, and others, 'H3K9 Methylation Is a Barrier during Somatic Cell Reprogramming into iPSCs', *Nature Genetics*, 45.1 (2013), 34–42 <<https://doi.org/10.1038/ng.2491>>
- Cheng, Dong, Zhaoming Dong, Ping Lin, Guanwang Shen, and Qingyou Xia, 'Transcriptional Activation of Ecdysone-Responsive Genes Requires H3K27 Acetylation at Enhancers', *International Journal of Molecular Sciences*, 23.18 (2022), 10791 <<https://doi.org/10.3390/ijms231810791>>
- Choppin, Marina, Barbara Feldmeyer, and Susanne Foitzik, 'Histone Acetylation Regulates the Expression of Genes Involved in Worker Reproduction in the Ant *Temnothorax rugatulus*', *BMC Genomics*, 22.1 (2021), 871
<<https://doi.org/10.1186/s12864-021-08196-8>>
- Cicccone, David N., Hui Su, Sarah Hevi, Frédérique Gay, Hong Lei, Jeffrey Bajko, and others, 'KDM1B Is a Histone H3K4 Demethylase Required to Establish Maternal Genomic Imprints', *Nature*, 461.7262 (2009), 415–18
<<https://doi.org/10.1038/nature08315>>
- Clapier, Cedric R., Janet Iwasa, Bradley R. Cairns, and Craig L. Peterson, 'Mechanisms of Action and Regulation of ATP-Dependent Chromatin-Remodelling Complexes', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18.7 (2017), 407–22
<<https://doi.org/10.1038/nrm.2017.26>>
- Collins, Bridget E., Celeste B. Greer, Benjamin C. Coleman, and J. David Sweatt, 'Histone

- H3 Lysine K4 Methylation and Its Role in Learning and Memory', *Epigenetics & Chromatin*, 12.1 (2019), 7 <<https://doi.org/10.1186/s13072-018-0251-8>>
- Copur, Ömer, and Jürg Müller, 'The Histone H3-K27 Demethylase Utx Regulates HOX Gene Expression in *Drosophila* in a Temporally Restricted Manner', *Development*, 140.16 (2013), 3478–85 <<https://doi.org/10.1242/dev.097204>>
- Couderc, Jean-Louis, Dorothea Godt, Susan Zollman, Jiong Chen, Michelle Li, Stanley Tiong, and others, 'The Bric à Brac Locus Consists of Two Paralogous Genes Encoding BTB/POZ Domain Proteins and Acts as a Homeotic and Morphogenetic Regulator of Imaginal Development in *Drosophila*', *Development (Cambridge, England)*, 129.10 (2002), 2419–33 <<https://doi.org/10.1242/dev.129.10.2419>>
- Cremer, T., and M. Cremer, 'Chromosome Territories', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2.3 (2010), a003889–a003889 <<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003889>>
- Crosetto, Nicola, and Magda Bienko, 'Radial Organization in the Mammalian Nucleus', *Frontiers in Genetics*, 11 (2020), 33 <<https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00033>>
- Curtis, Brenda J., Claudia B. Zraly, Daniel R. Marendia, and Andrew K. Dingwall, 'Histone Lysine Demethylases Function as Co-Repressors of SWI/SNF Remodeling Activities during *Drosophila* Wing Development', *Developmental Biology*, 350.2 (2011), 534–47 <<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.12.001>>
- Cutler, Jevon A., Florian Perner, and Scott A. Armstrong, 'Histone PTM Crosstalk Stimulates Dot1 Methyltransferase Activity', *Trends in Biochemical Sciences*, 46.7 (2021), 522–24 <<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2021.04.001>>
- Czermin, Birgit, Raffaella Melfi, Donna McCabe, Volker Seitz, Axel Imhof, and Vincenzo Pirrotta, 'Drosophila Enhancer of Zeste/ESC Complexes Have a Histone H3 Methyltransferase Activity That Marks Chromosomal Polycomb Sites', *Cell*, 111.2 (2002), 185–96 <[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00975-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00975-3)>
- Czermin, Birgit, Gunnar Schotta, Bastian B Hülsmann, Alexander Brehm, Peter B Becker, Gunter Reuter, and others, 'Physical and Functional Association of SU(VAR)3-9 and HDAC1 in *Drosophila*', *EMBO Reports*, 2.10 (2001), 915–19 <<https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve210>>
- Daniels, Emily V., Rabi Murad, Ali Mortazavi, and Robert D. Reed, 'Extensive Transcriptional Response Associated with Seasonal Plasticity of Butterfly Wing Patterns', *Molecular Ecology*, 23.24 (2014), 6123–34 <<https://doi.org/10.1111/mec.12988>>
- 'D'Anna, J. A. J. & Isenberg, I. A Histone Crosscomplexing Pattern. *Biochemistry* 13, 4992–4997., 1974
- De Ayala Alonso, Andrés Gaytán, Luis Gutiérrez, Cornelia Fritsch, Bernadett Papp, Dirk Beuchle, and Jürg Müller, 'A Genetic Screen Identifies Novel Polycomb Group Genes in *Drosophila*', *Genetics*, 176.4 (2007), 2099–2108

<<https://doi.org/10.1534/genetics.107.075739>>

- De Castro, Sandra, Frédérique Peronnet, Jean-François Gilles, Emmanuèle Mouchel-Vielh, and Jean-Michel Gibert, 'Bric à Brac (Bab), a Central Player in the Gene Regulatory Network That Mediates Thermal Plasticity of Pigmentation in *Drosophila Melanogaster*', ed. by Artyom Kopp, *PLoS Genetics*, 14.8 (2018), e1007573 <<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007573>>
- Debat, Vincent, and Patrice David, 'Mapping Phenotypes: Canalization, Plasticity and Developmental Stability', *Trends in Ecology & Evolution*, 16.10 (2001), 555–61 <[https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02266-2](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02266-2)>
- Dekker, Job, and Tom Misteli, 'Long-Range Chromatin Interactions', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7.10 (2015), a019356 <<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019356>>
- Delandre, Caroline, and Owen J. Marshall, 'United Colours of Chromatin? Developmental Genome Organisation in Flies', *Biochemical Society Transactions*, 47.2 (2019), 691–700 <<https://doi.org/10.1042/BST20180605>>
- Deng, Shuang, Jialiang Zhang, Jiachun Su, Zhixiang Zuo, Lingxing Zeng, Kaijing Liu, and others, 'RNA m6A Regulates Transcription via DNA Demethylation and Chromatin Accessibility', *Nature Genetics*, 54.9 (2022), 1427–37 <<https://doi.org/10.1038/s41588-022-01173-1>>
- DeWitt, Thomas J., Andrew Sih, and David Sloan Wilson, 'Costs and Limits of Phenotypic Plasticity', *Trends in Ecology & Evolution*, 13.2 (1998), 77–81 <[https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(97\)01274-3](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(97)01274-3)>
- Di Stefano, Marco, and Giacomo Cavalli, 'Integrative Studies of 3D Genome Organization and Chromatin Structure', *Current Opinion in Structural Biology*, 77 (2022), 102493 <<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2022.102493>>
- Disatham, Joshua, Lisa Brennan, Xiaodong Jiao, Zhiwei Ma, J. Fielding Hejtmancik, and Marc Kantorow, 'Changes in DNA Methylation Hallmark Alterations in Chromatin Accessibility and Gene Expression for Eye Lens Differentiation', *Epigenetics & Chromatin*, 15.1 (2022), 8 <<https://doi.org/10.1186/s13072-022-00440-z>>
- Dixon, Jesse R., Inkyung Jung, Siddarth Selvaraj, Yin Shen, Jessica E. Antosiewicz-Bourget, Ah Young Lee, and others, 'Chromatin Architecture Reorganization during Stem Cell Differentiation', *Nature*, 518.7539 (2015), 331–36 <<https://doi.org/10.1038/nature14222>>
- Dixon, Jesse R., David U. Gorkin, and Bing Ren, 'Chromatin Domains: The Unit of Chromosome Organization', *Molecular Cell*, 62.5 (2016), 668–80 <<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.018>>
- Dulac, Catherine, 'Brain Function and Chromatin Plasticity', *Nature*, 465.7299 (2010), 728–35 <<https://doi.org/10.1038/nature09231>>
- Duncan, Elizabeth J, Megan P Leask, and Peter K Dearden, 'Genome Architecture

- Facilitates Phenotypic Plasticity in the Honeybee (*Apis Mellifera*)', ed. by Patricia Wittkopp, *Molecular Biology and Evolution*, 37.7 (2020), 1964–78
<<https://doi.org/10.1093/molbev/msaa057>>
- Duncan, Marilyn J., and Bruce D. Goldman, 'Hormonal Regulation of the Annual Pelage Color Cycle in the Djungarian Hamster, *Phodopus Sungorus*. II. Role of Prolactin', *Journal of Experimental Zoology*, 230.1 (1984), 97–103
<<https://doi.org/10.1002/jez.1402300113>>
- Eeftens, Jorine M., Manya Kapoor, Davide Michieletto, and Clifford P. Brangwynne, 'Polycomb Condensates Can Promote Epigenetic Marks but Are Not Required for Sustained Chromatin Compaction', *Nature Communications*, 12.1 (2021), 5888
<<https://doi.org/10.1038/s41467-021-26147-5>>
- Elgin, S. C. R., and G. Reuter, 'Position-Effect Variegation, Heterochromatin Formation, and Gene Silencing in *Drosophila*', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5.8 (2013), a017780–a017780 <<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a017780>>
- Engreitz, Jesse M., Amy Pandya-Jones, Patrick McDonel, Alexander Shishkin, Klara Sirokman, Christine Surka, and others, 'The Xist lncRNA Exploits Three-Dimensional Genome Architecture to Spread Across the X Chromosome', *Science*, 341.6147 (2013), 1237973 <<https://doi.org/10.1126/science.1237973>>
- Fanti, Laura, Lucia Piacentini, Ugo Cappucci, Assunta M Casale, and Sergio Pimpinelli, 'Canalization by Selection of *de Novo* Induced Mutations', *Genetics*, 206.4 (2017), 1995–2006 <<https://doi.org/10.1534/genetics.117.201079>>
- Fei, Jia, Sharon E. Torigoe, Christopher R. Brown, Mai T. Khuong, George A. Kassavetis, Hinrich Boeger, and others, 'The Prenucleosome, a Stable Conformational Isomer of the Nucleosome', *Genes & Development*, 29.24 (2015), 2563–75
<<https://doi.org/10.1101/gad.272633.115>>
- Felsenfeld, Gary, and Mark Groudine, 'Controlling the Double Helix', *Nature*, 421.6921 (2003), 448–53 <<https://doi.org/10.1038/nature01411>>
- Feng, Qin, Hengbin Wang, Huck Hui Ng, Hediye Erdjument-Bromage, Paul Tempst, Kevin Struhl, and others, 'Methylation of H3-Lysine 79 Is Mediated by a New Family of HMTases without a SET Domain', *Current Biology*, 12.12 (2002), 1052–58
<[https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00901-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00901-6)>
- Ferraro, Angelo, 'Altered Primary Chromatin Structures and Their Implications in Cancer Development', *Cellular Oncology*, 39.3 (2016), 195–210
<<https://doi.org/10.1007/s13402-016-0276-6>>
- Fields, Brandon D., and Scott Kennedy, 'Chromatin Compaction by Small RNAs and the Nuclear RNAi Machinery in *C. Elegans*', *Scientific Reports*, 9.1 (2019), 9030
<<https://doi.org/10.1038/s41598-019-45052-y>>
- Filion, Guillaume J., Joke G. van Bommel, Ulrich Braunschweig, Wendy Talhout, Jop Kind, Lucas D. Ward, and others, 'Systematic Protein Location Mapping Reveals Five Principal Chromatin Types in *Drosophila* Cells', *Cell*, 143.2 (2010), 212–24

<<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.09.009>>

Fischle, Wolfgang, Boo Shan Tseng, Holger L. Dormann, Beatrix M. Ueberheide, Benjamin A. Garcia, Jeffrey Shabanowitz, and others, 'Regulation of HP1–Chromatin Binding by Histone H3 Methylation and Phosphorylation', *Nature*, 438.7071 (2005), 1116–22 <<https://doi.org/10.1038/nature04219>>

Fischle, Wolfgang, Yanming Wang, and C David Allis, 'Histone and Chromatin Cross-Talk', *Current Opinion in Cell Biology*, 15.2 (2003), 172–83 <[https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(03\)00013-9](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(03)00013-9)>

Flemming, Walther, 'Zellsubstanz, Kern Und Zelltheilung.', in *Zellsubstanz, Kern Und Zelltheilung*, 1882, pp. 409–19 <[ark:/13960/t4mk6vz0h](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(03)00013-9)>

Foret, Sylvain, Robert Kucharski, Matteo Pellegrini, Suhua Feng, Steven E. Jacobsen, Gene E. Robinson, and others, 'DNA Methylation Dynamics, Metabolic Fluxes, Gene Splicing, and Alternative Phenotypes in Honey Bees', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109.13 (2012), 4968–73 <<https://doi.org/10.1073/pnas.1202392109>>

Francis, Nicole J., Robert E. Kingston, and Christopher L. Woodcock, 'Chromatin Compaction by a Polycomb Group Protein Complex', *Science*, 306.5701 (2004), 1574–77 <<https://doi.org/10.1126/science.1100576>>

Frank, Christopher L, Fang Liu, Ranjula Wijayatunge, Lingyun Song, Matthew T Biegler, Marty G Yang, and others, 'Regulation of Chromatin Accessibility and Zic Binding at Enhancers in the Developing Cerebellum', *Nature Neuroscience*, 18.5 (2015), 647–56 <<https://doi.org/10.1038/nn.3995>>

Fraser, James, Carmelo Ferrai, Andrea M Chiariello, Markus Schueler, Tiago Rito, Giovanni Laudanno, and others, 'Hierarchical Folding and Reorganization of Chromosomes Are Linked to Transcriptional Changes in Cellular Differentiation', *Molecular Systems Biology*, 11.12 (2015), 852 <<https://doi.org/10.15252/msb.20156492>>

Freoa, Laurent, Luis-Miguel Chevin, Philippe Christol, Sylvie Méléard, Michael Rera, Amandine Véber, and others, 'Drosophilids with Darker Cuticle Have Higher Body Temperature under Light', *Scientific Reports*, 13.1 (2023), 3513 <<https://doi.org/10.1038/s41598-023-30652-6>>

Fyodorov, Dmitry V., Bing-Rui Zhou, Arthur I. Skoultchi, and Yawen Bai, 'Emerging Roles of Linker Histones in Regulating Chromatin Structure and Function', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19.3 (2018), 192–206 <<https://doi.org/10.1038/nrm.2017.94>>

Gall, JG, 'Kinetics of Deoxyribonuclease Action on Chromosomes. *Nature*. ;198:36–38.', 1963

Gamarra, Nathan, and Geeta J. Narlikar, 'Collaboration through Chromatin: Motors of Transcription and Chromatin Structure', *Journal of Molecular Biology*, 433.14 (2021), 166876 <<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.166876>>

- Ghavi-Helm, Yad, Aleksander Jankowski, Sascha Meiers, Rebecca R. Viales, Jan O. Korbel, and Eileen E. M. Furlong, 'Highly Rearranged Chromosomes Reveal Uncoupling between Genome Topology and Gene Expression', *Nature Genetics*, 51.8 (2019), 1272–82 <<https://doi.org/10.1038/s41588-019-0462-3>>
- Gibert, Jean-Michel, Jorge Blanco, Marlies Dolezal, Viola Nolte, Frédérique Peronnet, and Christian Schlötterer, 'Strong Epistatic and Additive Effects of Linked Candidate SNPs for *Drosophila* Pigmentation Have Implications for Analysis of Genome-Wide Association Studies Results', *Genome Biology*, 18.1 (2017), 126 <<https://doi.org/10.1186/s13059-017-1262-7>>
- Gibert, Jean-Michel, Emmanuèle Mouchel-Vielh, Sandra De Castro, and Frédérique Peronnet, 'Phenotypic Plasticity through Transcriptional Regulation of the Evolutionary Hotspot Gene Tan in *Drosophila Melanogaster*', ed. by Artyom Kopp, *PLoS Genetics*, 12.8 (2016), e1006218 <<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006218>>
- Gibert, Jean-Michel, Emmanuèle Mouchel-Vielh, and Frédérique Peronnet, 'Modulation of Yellow Expression Contributes to Thermal Plasticity of Female Abdominal Pigmentation in *Drosophila Melanogaster*', *Scientific Reports*, 7.1 (2017), 43370 <<https://doi.org/10.1038/srep43370>>
- Gibert, P., P. Capy, A. Imasheva, B. Moreteau, J. P. Morin, G. Pétavy, and others, 'Comparative Analysis of Morphological Traits among *Drosophila Melanogaster* and *D. Simulans*: Genetic Variability, Clines and Phenotypic Plasticity', *Genetica*, 120.1–3 (2004), 165–79 <<https://doi.org/10.1023/b:gene.0000017639.62427.8b>>
- Gibert, Patricia, Brigitte Moreteau, and Jean R. David, 'Developmental Constraints on an Adaptive Plasticity: Reaction Norms of Pigmentation in Adult Segments of *Drosophila Melanogaster*', *Evolution & Development*, 2.5 (2000), 249–60 <<https://doi.org/10.1046/j.1525-142x.2000.00064.x>>
- Gildea, John J, Rocio Lopez, and Allen Shearn, 'A Screen for New Trithorax Group Genes Identified *Little Imaginal Discs*, the *Drosophila Melanogaster* Homologue of Human Retinoblastoma Binding Protein 2', *Genetics*, 156.2 (2000), 645–63 <<https://doi.org/10.1093/genetics/156.2.645>>
- Godfrey, Laura, Nicholas T. Crump, Ross Thorne, I-Jun Lau, Emmanouela Repapi, Dimitra Dimou, and others, 'DOT1L Inhibition Reveals a Distinct Subset of Enhancers Dependent on H3K79 Methylation', *Nature Communications*, 10.1 (2019), 2803 <<https://doi.org/10.1038/s41467-019-10844-3>>
- Goldberg, Aaron D., Laura A. Banaszynski, Kyung-Min Noh, Peter W. Lewis, Simon J. Elsaesser, Sonja Stadler, and others, 'Distinct Factors Control Histone Variant H3.3 Localization at Specific Genomic Regions', *Cell*, 140.5 (2010), 678–91 <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.003>>
- Gong, Fade, and Kyle M. Miller, 'Histone Methylation and the DNA Damage Response', *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 780 (2019), 37–47 <<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.09.003>>

- Grau, Daniel J., Brad A. Chapman, Joe D. Garlick, Mark Borowsky, Nicole J. Francis, and Robert E. Kingston, 'Compaction of Chromatin by Diverse Polycomb Group Proteins Requires Localized Regions of High Charge', *Genes & Development*, 25.20 (2011), 2210–21 <<https://doi.org/10.1101/gad.17288211>>
- Grewal, Shiv I. S., and Songtao Jia, 'Heterochromatin Revisited', *Nature Reviews Genetics*, 8.1 (2007), 35–46 <<https://doi.org/10.1038/nrg2008>>
- Grover, Sumant, Melissa E. Williams, Rebecca Kaiser, Jesse T. Hughes, Lauren Gresham, Mark Rebeiz, and others, 'Augmentation of a Wound Response Element Accompanies the Origin of a Hox-Regulated Drosophila Abdominal Pigmentation Trait', *Developmental Biology*, 441.1 (2018), 159–75 <<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.07.001>>
- Gutteling, E W, A Doroszuk, J A G Riksen, Z Prokop, J Reszka, and J E Kammenga, 'Environmental Influence on the Genetic Correlations between Life-History Traits in Caenorhabditis Elegans', *Heredity*, 98.4 (2007), 206–13 <<https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800929>>
- Han, Qian, Jianmin Fang, Haizhen Ding, Jody K. Johnson, Bruce M. Christensen, and Jianyong Li, 'Identification of Drosophila Melanogaster Yellow-f and Yellow-F2 Proteins as Dopachrome-Conversion Enzymes', *The Biochemical Journal*, 368.Pt 1 (2002), 333–40 <<https://doi.org/10.1042/BJ20020272>>
- Hansen, Klaus H., Adrian P. Bracken, Diego Pasini, Nikolaj Dietrich, Simmi S. Gehani, Astrid Monrad, and others, 'A Model for Transmission of the H3K27me3 Epigenetic Mark', *Nature Cell Biology*, 10.11 (2008), 1291–1300 <<https://doi.org/10.1038/ncb1787>>
- Heintzman, Nathaniel D, Rhona K Stuart, Gary Hon, Yutao Fu, Christina W Ching, R David Hawkins, and others, 'Distinct and Predictive Chromatin Signatures of Transcriptional Promoters and Enhancers in the Human Genome', *Nature Genetics*, 39.3 (2007), 311–18 <<https://doi.org/10.1038/ng1966>>
- Herz, Hans-Martin, Laurence D. Madden, Zhihong Chen, Clare Bolduc, Eugene Buff, Ravi Gupta, and others, 'The H3K27me3 Demethylase dUTX Is a Suppressor of Notch- and Rb-Dependent Tumors in Drosophila', *Molecular and Cellular Biology*, 30.10 (2010), 2485–97 <<https://doi.org/10.1128/MCB.01633-09>>
- Hill, Mark S., Pétra Vande Zande, and Patricia J. Wittkopp, 'Molecular and Evolutionary Processes Generating Variation in Gene Expression', *Nature Reviews Genetics*, 22.4 (2021), 203–15 <<https://doi.org/10.1038/s41576-020-00304-w>>
- Hinaux, H el ene, Katharina Bachem, Margherita Battistara, Matteo Rossi, Yaqun Xin, Rita Jaenichen, and others, 'Revisiting the Developmental and Cellular Role of the Pigmentation Gene Yellow in Drosophila Using a Tagged Allele', *Developmental Biology*, 438.2 (2018), 111–23 <<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.04.003>>
- Ho, Joshua W. K., Youngsook L. Jung, Tao Liu, Burak H. Alver, Soohyun Lee, Kohta Ikegami, and others, 'Comparative Analysis of Metazoan Chromatin Organization', *Nature*, 512.7515 (2014), 449–52 <<https://doi.org/10.1038/nature13415>>

- Hocher, Antoine, Myriam Ruault, Petra Kaferle, Marc Describes, Mickaël Garnier, Antonin Morillon, and others, 'Expanding Heterochromatin Reveals Discrete Subtelomeric Domains Delimited by Chromatin Landscape Transitions', *Genome Research*, 28.12 (2018), 1867–81 <<https://doi.org/10.1101/gr.236554.118>>
- Hödl, Martina, and Konrad Basler, 'Transcription in the Absence of Histone H3.2 and H3K4 Methylation', *Current Biology*, 22.23 (2012), 2253–57 <<https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.10.008>>
- Holoch, Daniel, and Danesh Moazed, 'RNA-Mediated Epigenetic Regulation of Gene Expression', *Nature Reviews Genetics*, 16.2 (2015), 71–84 <<https://doi.org/10.1038/nrg3863>>
- Holowatyj, Andreana, Zeng-Quan Yang, and Lori A Pile, 'Histone Lysine Demethylases in *Drosophila Melanogaster*', *Fly*, 9.1 (2015), 36–44 <<https://doi.org/10.1080/19336934.2015.1074787>>
- Hoover, Shelley E.R., Christopher I. Keeling, Mark L. Winston, and Keith N. Slessor, 'The Effect of Queen Pheromones on Worker Honey Bee Ovary Development', *Naturwissenschaften*, 90.10 (2003), 477–80 <<https://doi.org/10.1007/s00114-003-0462-z>>
- Huff, Jason T, Alex M Plocik, Christine Guthrie, and Keith R Yamamoto, 'Reciprocal Intronic and Exonic Histone Modification Regions in Humans', *Nature Structural & Molecular Biology*, 17.12 (2010), 1495–99 <<https://doi.org/10.1038/nsmb.1924>>
- Huff, Jason T., and Daniel Zilberman, 'Dnmt1-Independent CG Methylation Contributes to Nucleosome Positioning in Diverse Eukaryotes', *Cell*, 156.6 (2014), 1286–97 <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.029>>
- Hyun, Kwangbeom, Jongcheol Jeon, Kihyun Park, and Jaehoon Kim, 'Writing, Erasing and Reading Histone Lysine Methylations', *Experimental & Molecular Medicine*, 49.4 (2017), e324–e324 <<https://doi.org/10.1038/emm.2017.11>>
- Iguchi-Arigo, S M, and W Schaffner, 'CpG Methylation of the cAMP-Responsive Enhancer/Promoter Sequence TGACGTCA Abolishes Specific Factor Binding as Well as Transcriptional Activation.', *Genes & Development*, 3.5 (1989), 612–19 <<https://doi.org/10.1101/gad.3.5.612>>
- Ito, Takashi, Michael Bulger, Michael J Pazin, Ryuji Kobayashi, and James T Kadonaga, 'ACF, an ISWI-Containing and ATP-Utilizing Chromatin Assembly and Remodeling Factor', *Cell*, 90.1 (1997), 145–55 <[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80321-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80321-9)>
- Jang, Seongmin, and Ji-Joon Song, 'The Big Picture of Chromatin Biology by Cryo-EM', *Current Opinion in Structural Biology*, 58 (2019), 76–87 <<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.05.017>>
- Jenuwein, Thomas, and C. David Allis, 'Translating the Histone Code', *Science*, 293.5532 (2001), 1074–80 <<https://doi.org/10.1126/science.1063127>>

- Jeong, Sangyun, Mark Rebeiz, Peter Andolfatto, Thomas Werner, John True, and Sean B. Carroll, 'The Evolution of Gene Regulation Underlies a Morphological Difference between Two Drosophila Sister Species', *Cell*, 132.5 (2008), 783–93 <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.014>>
- Jeong, Sangyun, Antonis Rokas, and Sean B. Carroll, 'Regulation of Body Pigmentation by the Abdominal-B Hox Protein and Its Gain and Loss in Drosophila Evolution', *Cell*, 125.7 (2006), 1387–99 <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.04.043>>
- Johannsen, W., 'The Genotype Conception of Heredity', *The American Naturalist*, 45.531 (1911), 129–59 <<https://doi.org/10.1086/279202>>
- 'Johns, E. W. The Histones, Their Interactions with DNA and Some Aspects of Gene Control. 128.', 1969
- Jong, Peter W. De, Sander W. S. Gussekloo, and Paul M. Brakefield, 'Differences in Thermal Balance, Body Temperature and Activity Between Non-Melanic and Melanic Two-Spot Ladybird Beetles (*Adalia Bipunctata*) Under Controlled Conditions', *Journal of Experimental Biology*, 199.12 (1996), 2655–66 <<https://doi.org/10.1242/jeb.199.12.2655>>
- Jozwik, Kamila M., Igor Chernukhin, Aurelien A. Serandour, Sankari Nagarajan, and Jason S. Carroll, 'FOXA1 Directs H3K4 Monomethylation at Enhancers via Recruitment of the Methyltransferase MLL3', *Cell Reports*, 17.10 (2016), 2715–23 <<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.11.028>>
- Kang, Joo-Young, Ji-Young Kim, Kee-Beom Kim, Jin Woo Park, Hana Cho, Ja Young Hahm, and others, 'KDM2B Is a Histone H3K79 Demethylase and Induces Transcriptional Repression via Sirtuin-1-mediated Chromatin Silencing', *The FASEB Journal*, 32.10 (2018), 5737–50 <<https://doi.org/10.1096/fj.201800242R>>
- Kassis, Judith A, James A Kennison, and John W Tamkun, 'Polycomb and Trithorax Group Genes in *Drosophila*', *Genetics*, 206.4 (2017), 1699–1725 <<https://doi.org/10.1534/genetics.115.185116>>
- Kharchenko, Peter V., Artyom A. Alekseyenko, Yuri B. Schwartz, Aki Minoda, Nicole C. Riddle, Jason Ernst, and others, 'Comprehensive Analysis of the Chromatin Landscape in *Drosophila Melanogaster*', *Nature*, 471.7339 (2011), 480–85 <<https://doi.org/10.1038/nature09725>>
- Kim, Jaehoon, Jung-Ae Kim, Robert K. McGinty, Uyen T.T. Nguyen, Tom W. Muir, C. David Allis, and others, 'The N-SET Domain of Set1 Regulates H2B Ubiquitylation-Dependent H3K4 Methylation', *Molecular Cell*, 49.6 (2013), 1121–33 <<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.034>>
- Kim, TaeSoo, and Stephen Buratowski, 'Dimethylation of H3K4 by Set1 Recruits the Set3 Histone Deacetylase Complex to 5' Transcribed Regions', *Cell*, 137.2 (2009), 259–72 <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.045>>
- Klemm, Sandy L., Zohar Shipony, and William J. Greenleaf, 'Chromatin Accessibility and

- the Regulatory Epigenome', *Nature Reviews Genetics*, 20.4 (2019), 207–20
<<https://doi.org/10.1038/s41576-018-0089-8>>
- Klosin, Adam, Eduard Casas, Cristina Hidalgo-Carcedo, Tanya Vavouri, and Ben Lehner, 'Transgenerational Transmission of Environmental Information in *C. Elegans*', *Science*, 356.6335 (2017), 320–23 <<https://doi.org/10.1126/science.aah6412>>
- Klymenko, Tetyana, Bernadett Papp, Wolfgang Fischle, Thomas Köcher, Malgorzata Schelder, Cornelia Fritsch, and others, 'A Polycomb Group Protein Complex with Sequence-Specific DNA-Binding and Selective Methyl-Lysine-Binding Activities', *Genes & Development*, 20.9 (2006), 1110–22
<<https://doi.org/10.1101/gad.377406>>
- Kopp, A., I. Duncan, D. Godt, and S. B. Carroll, 'Genetic Control and Evolution of Sexually Dimorphic Characters in *Drosophila*', *Nature*, 408.6812 (2000), 553–59
<<https://doi.org/10.1038/35046017>>
- Kopp, Artyom, and Ian Duncan, 'Anteroposterior Patterning in Adult Abdominal Segments of *Drosophila*', *Developmental Biology*, 242.1 (2002), 15–30
<<https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0529>>
- Kopp, Artyom, Rita M. Graze, Shizhong Xu, Sean B. Carroll, and Sergey V. Nuzhdin, 'Quantitative Trait Loci Responsible for Variation in Sexually Dimorphic Traits in *Drosophila Melanogaster*', *Genetics*, 163.2 (2003), 771–87
<<https://doi.org/10.1093/genetics/163.2.771>>
- Kouzarides, Tony, 'Chromatin Modifications and Their Function', *Cell*, 128.4 (2007), 693–705 <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>>
- Kucharski, R., J. Maleszka, S. Foret, and R. Maleszka, 'Nutritional Control of Reproductive Status in Honeybees via DNA Methylation', *Science*, 319.5871 (2008), 1827–30
<<https://doi.org/10.1126/science.1153069>>
- Kulkarni, Saurabh S., and Daniel R. Buchholz, 'Beyond Synergy: Corticosterone and Thyroid Hormone Have Numerous Interaction Effects on Gene Regulation in *Xenopus Tropicalis* Tadpoles', *Endocrinology*, 153.11 (2012), 5309–24
<<https://doi.org/10.1210/en.2012-1432>>
- Kulkarni, Saurabh S., Robert J. Denver, Ivan Gomez-Mestre, and Daniel R. Buchholz, 'Genetic Accommodation via Modified Endocrine Signalling Explains Phenotypic Divergence among Spadefoot Toad Species', *Nature Communications*, 8.1 (2017), 993 <<https://doi.org/10.1038/s41467-017-00996-5>>
- Kumar, Suresh, Simardeep Kaur, Karishma Seem, Santosh Kumar, and Trilochan Mohapatra, 'Understanding 3D Genome Organization and Its Effect on Transcriptional Gene Regulation Under Environmental Stress in Plant: A Chromatin Perspective', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9 (2021), 774719 <<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.774719>>
- Kutch, Ian C., Hasan Sevgili, Tyler Wittman, and Kenneth M. Fedorka, 'Thermoregulatory Strategy May Shape Immune Investment in *Drosophila Melanogaster*', *Journal of*

- Experimental Biology*, 2014, jeb.106294 <<https://doi.org/10.1242/jeb.106294>>
- Kuyucu, Arda Cem, Mehmet Kursat Sahin, and Selim Sualp Caglar, 'The Relation between Melanism and Thermal Biology in a Colour Polymorphic Bush Cricket, *Isophya Rizeensis*', *Journal of Thermal Biology*, 71 (2018), 212–20
<<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2017.11.017>>
- Kwon, Youngtae, and Yun Doo Chung, 'RNA-Mediated Regulation of Chromatin Structures', *Genes & Genomics*, 42.6 (2020), 609–17
<<https://doi.org/10.1007/s13258-020-00929-5>>
- Lagarou, Anna, Adone Mohd-Sarip, Yuri M. Moshkin, Gillian E. Chalkley, Karel Bezstarosti, Jeroen A.A. Demmers, and others, 'dKDM2 Couples Histone H2A Ubiquitylation to Histone H3 Demethylation during Polycomb Group Silencing', *Genes & Development*, 22.20 (2008), 2799–2810
<<https://doi.org/10.1101/gad.484208>>
- Lauberth, Shannon M., Takahiro Nakayama, Xiaolin Wu, Andrea L. Ferris, Zhanyun Tang, Stephen H. Hughes, and others, 'H3K4me3 Interactions with TAF3 Regulate Preinitiation Complex Assembly and Selective Gene Activation', *Cell*, 152.5 (2013), 1021–36 <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.052>>
- Lee, Hun-Goo, Tatyana G. Kahn, Amanda Simcox, Yuri B. Schwartz, and Vincenzo Pirrotta, 'Genome-Wide Activities of Polycomb Complexes Control Pervasive Transcription', *Genome Research*, 25.8 (2015), 1170–81
<<https://doi.org/10.1101/gr.188920.114>>
- Lee, Nara, Junyu Zhang, Robert J Klose, Hediye Erdjument-Bromage, Paul Tempst, Richard S Jones, and others, 'The Trithorax-Group Protein Lid Is a Histone H3 Trimethyl-Lys4 Demethylase', *Nature Structural & Molecular Biology*, 14.4 (2007), 341–43 <<https://doi.org/10.1038/nsmb1216>>
- Leung, Amy, Brian W. Parks, Juan Du, Candi Trac, Ryan Setten, Yin Chen, and others, 'Open Chromatin Profiling in Mice Livers Reveals Unique Chromatin Variations Induced by High Fat Diet', *Journal of Biological Chemistry*, 289.34 (2014), 23557–67 <<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.581439>>
- Lewis, E. B., 'A Gene Complex Controlling Segmentation in *Drosophila*', *Nature*, 276.5688 (1978), 565–70 <<https://doi.org/10.1038/276565a0>>
- Li, Guohong, and Danny Reinberg, 'Chromatin Higher-Order Structures and Gene Regulation', *Current Opinion in Genetics & Development*, 21.2 (2011), 175–86
<<https://doi.org/10.1016/j.gde.2011.01.022>>
- Li, Shuxiang, Tiejun Wei, and Anna R. Panchenko, 'Histone Variant H2A.Z Modulates Nucleosome Dynamics to Promote DNA Accessibility', *Nature Communications*, 14.1 (2023), 769 <<https://doi.org/10.1038/s41467-023-36465-5>>
- Lieberman-Aiden, Erez, Nynke L. Van Berkum, Louise Williams, Maxim Imakaev, Tobias Ragozy, Agnes Telling, and others, 'Comprehensive Mapping of Long-Range Interactions Reveals Folding Principles of the Human Genome', *Science*, 326.5950

- (2009), 289–93 <<https://doi.org/10.1126/science.1181369>>
- Lister, Ryan, Mattia Pelizzola, Yasuyuki S. Kida, R. David Hawkins, Joseph R. Nery, Gary Hon, and others, 'Hotspots of Aberrant Epigenomic Reprogramming in Human Induced Pluripotent Stem Cells', *Nature*, 471.7336 (2011), 68–73
<<https://doi.org/10.1038/nature09798>>
- Liu, S. John, Max A. Horlbeck, Seung Woo Cho, Harjus S. Birk, Martina Malatesta, Daniel He, and others, 'CRISPRi-Based Genome-Scale Identification of Functional Long Noncoding RNA Loci in Human Cells', *Science*, 355.6320 (2017), eaah7111
<<https://doi.org/10.1126/science.aah7111>>
- Liu, Xingyin, Christina Greer, and Julie Secombe, 'KDM5 Interacts with Foxo to Modulate Cellular Levels of Oxidative Stress', ed. by Bingwei Lu, *PLoS Genetics*, 10.10 (2014), e1004676 <<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004676>>
- Liu, Xingyin, and Julie Secombe, 'The Histone Demethylase KDM5 Activates Gene Expression by Recognizing Chromatin Context through Its PHD Reader Motif', *Cell Reports*, 13.10 (2015), 2219–31 <<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.11.007>>
- Lloret-Llinares, Marta, Clément Carré, Alejandro Vaquero, Natalia De Olano, and Fernando Azorín, 'Characterization of Drosophila Melanogaster JmjC+N Histone Demethylases', *Nucleic Acids Research*, 36.9 (2008), 2852–63
<<https://doi.org/10.1093/nar/gkn098>>
- Lloret-Llinares, Marta, Sílvia Pérez-Lluch, David Rossell, Tomás Morán, Joan Ponsa-Cobas, Herbert Auer, and others, 'dKDM5/LID Regulates H3K4me3 Dynamics at the Transcription-Start Site (TSS) of Actively Transcribed Developmental Genes', *Nucleic Acids Research*, 40.19 (2012), 9493–9505
<<https://doi.org/10.1093/nar/gks773>>
- Longbotham, James E., Meng Yao Zhang, and Danica Galonić Fujimori, 'Domain Cross-Talk in Regulation of Histone Modifications: Molecular Mechanisms and Targeting Opportunities', *Current Opinion in Chemical Biology*, 57 (2020), 105–13
<<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.06.001>>
- Lopes, Ricardo J., James D. Johnson, Matthew B. Toomey, Mafalda S. Ferreira, Pedro M. Araujo, José Melo-Ferreira, and others, 'Genetic Basis for Red Coloration in Birds', *Current Biology*, 26.11 (2016), 1427–34
<<https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.03.076>>
- Lu, Brett Y, Peter C R Emtage, Brenda J Duyf, Arthur J Hilliker, and Joel C Eisenberg, 'Heterochromatin Protein 1 Is Required for the Normal Expression of Two Heterochromatin Genes in Drosophila', *Genetics*, 155.2 (2000), 699–708
<<https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.699>>
- Lu, Xu, Matthew D Simon, Jayanth V Chodaparambil, Jeffrey C Hansen, and Karolin Luger, 'The Effect of H3K79 Dimethylation and H4K20 Trimethylation on Nucleosome and Chromatin Structure', 2009
- Luger, Karolin, 'Crystal Structure of the Nucleosome Core Particle at 2.8 Å Resolution',

389 (1997)

- Lusser, Alexandra, Debra L Urwin, and James T Kadonaga, 'Distinct Activities of CHD1 and ACF in ATP-Dependent Chromatin Assembly', *Nature Structural & Molecular Biology*, 12.2 (2005), 160–66 <<https://doi.org/10.1038/nsmb884>>
- Lyons, L. A., D. L. Imes, H. C. Rah, and R. A. Grahn, 'Tyrosinase Mutations Associated with Siamese and Burmese Patterns in the Domestic Cat (*Felis Catus*)', *Animal Genetics*, 36.2 (2005), 119–26 <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2005.01253.x>>
- Maleszka, Ryszard, 'Epigenetic Code and Insect Behavioural Plasticity', *Current Opinion in Insect Science*, 15 (2016), 45–52 <<https://doi.org/10.1016/j.cois.2016.03.003>>
- Mansisidor, Andrés R., and Viviana I. Risca, 'Chromatin Accessibility: Methods, Mechanisms, and Biological Insights', *Nucleus*, 13.1 (2022), 238–78 <<https://doi.org/10.1080/19491034.2022.2143106>>
- Margueron, Raphael, Neil Justin, Katsuhito Ohno, Miriam L. Sharpe, Jinsook Son, William J. Drury Iii, and others, 'Role of the Polycomb Protein EED in the Propagation of Repressive Histone Marks', *Nature*, 461.7265 (2009), 762–67 <<https://doi.org/10.1038/nature08398>>
- Margueron, Raphael, Guohong Li, Kavitha Sarma, Alexandre Blais, Jiri Zavadil, Christopher L. Woodcock, and others, 'Ezh1 and Ezh2 Maintain Repressive Chromatin through Different Mechanisms', *Molecular Cell*, 32.4 (2008), 503–18 <<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.11.004>>
- Marshall, Owen J., and Andrea H. Brand, 'Chromatin State Changes during Neural Development Revealed by in Vivo Cell-Type Specific Profiling', *Nature Communications*, 8.1 (2017), 2271 <<https://doi.org/10.1038/s41467-017-02385-4>>
- Marson, Alexander, Stuart S. Levine, Megan F. Cole, Garrett M. Frampton, Tobias Brambrink, Sarah Johnstone, and others, 'Connecting microRNA Genes to the Core Transcriptional Regulatory Circuitry of Embryonic Stem Cells', *Cell*, 134.3 (2008), 521–33 <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.020>>
- Martire, Sara, and Laura A. Banaszynski, 'The Roles of Histone Variants in Fine-Tuning Chromatin Organization and Function', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21.9 (2020), 522–41 <<https://doi.org/10.1038/s41580-020-0262-8>>
- McClintock, B., 'CHROMOSOME ORGANIZATION AND GENIC EXPRESSION', *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 16.0 (1951), 13–47 <<https://doi.org/10.1101/SQB.1951.016.01.004>>
- McGinty, Robert K., and Song Tan, 'Nucleosome Structure and Function', *Chemical Reviews*, 115.6 (2015), 2255–73 <<https://doi.org/10.1021/cr500373h>>
- Meller, Victoria H., and Barbara P. Rattner, 'The roX Genes Encode Redundant Male-Specific Lethal Transcripts Required for Targeting of the MSL Complex', *The EMBO Journal*, 21.5 (2002), 1084–91

<<https://doi.org/10.1093/emboj/21.5.1084>>

Méndez-González, Iván D., Thomas M. Williams, and Mark Rebeiz, 'Changes in Locus Wide Repression Underlie the Evolution of Drosophila Abdominal Pigmentation', ed. by Artyom Kopp, *PLoS Genetics*, 19.5 (2023), e1010722
<<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010722>>

Meshorer, Eran, Dhananjay Yellajoshula, Eric George, Peter J. Scambler, David T. Brown, and Tom Misteli, 'Hyperdynamic Plasticity of Chromatin Proteins in Pluripotent Embryonic Stem Cells', *Developmental Cell*, 10.1 (2006), 105–16
<<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.10.017>>

Mikkelsen, Tarjei S., Manching Ku, David B. Jaffe, Biju Issac, Erez Lieberman, Georgia Giannoukos, and others, 'Genome-Wide Maps of Chromatin State in Pluripotent and Lineage-Committed Cells', *Nature*, 448.7153 (2007), 553–60
<<https://doi.org/10.1038/nature06008>>

Millán-Zambrano, Gonzalo, Adam Burton, Andrew J. Bannister, and Robert Schneider, 'Histone Post-Translational Modifications — Cause and Consequence of Genome Function', *Nature Reviews Genetics*, 23.9 (2022), 563–80
<<https://doi.org/10.1038/s41576-022-00468-7>>

Mills, L. Scott, Marketa Zimova, Jared Oyler, Steven Running, John T. Abatzoglou, and Paul M. Lukacs, 'Camouflage Mismatch in Seasonal Coat Color Due to Decreased Snow Duration', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110.18 (2013), 7360–65 <<https://doi.org/10.1073/pnas.1222724110>>

Milne, Thomas A., Jaehoon Kim, Gang G. Wang, Sonja C. Stadler, Venkatesha Basrur, Sarah J. Whitcomb, and others, 'Multiple Interactions Recruit MLL1 and MLL1 Fusion Proteins to the HOXA9 Locus in Leukemogenesis', *Molecular Cell*, 38.6 (2010), 853–63 <<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.05.011>>

Minajigi, Anand, John E. Froberg, Chunyao Wei, Hongjae Sunwoo, Barry Kesner, David Colognori, and others, 'A Comprehensive Xist Interactome Reveals Cohesin Repulsion and an RNA-Directed Chromosome Conformation', *Science*, 349.6245 (2015), aab2276 <<https://doi.org/10.1126/science.aab2276>>

Mishra, Kankadeb, and Chandrasekhar Kanduri, 'Understanding Long Noncoding RNA and Chromatin Interactions: What We Know So Far', *Non-Coding RNA*, 5.4 (2019), 54 <<https://doi.org/10.3390/ncrna5040054>>

Misteli, Tom, 'The Self-Organizing Genome: Principles of Genome Architecture and Function', *Cell*, 183.1 (2020), 28–45
<<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.014>>

Moczek, Armin P., Sonia Sultan, Susan Foster, Cris Ledón-Rettig, Ian Dworkin, H. Fred Nijhout, and others, 'The Role of Developmental Plasticity in Evolutionary Innovation', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278.1719 (2011), 2705–13 <<https://doi.org/10.1098/rspb.2011.0971>>

Mohan, Man, Hans-Martin Herz, Edwin R. Smith, Ying Zhang, Jessica Jackson, Michael P.

- Washburn, and others, 'The COMPASS Family of H3K4 Methylases in *Drosophila*', *Molecular and Cellular Biology*, 31.21 (2011), 4310–18
<<https://doi.org/10.1128/MCB.06092-11>>
- Mohan, Man, Hans-Martin Herz, Yoh-Hei Takahashi, Chengqi Lin, Ka Chun Lai, Ying Zhang, and others, 'Linking H3K79 Trimethylation to Wnt Signaling through a Novel Dot1-Containing Complex (DotCom)', *Genes & Development*, 24.6 (2010), 574–89 <<https://doi.org/10.1101/gad.1898410>>
- Mohanta, Tapan Kumar, Awdhesh Kumar Mishra, and Ahmed Al-Harrasi, 'The 3D Genome: From Structure to Function', *International Journal of Molecular Sciences*, 22.21 (2021), 11585 <<https://doi.org/10.3390/ijms222111585>>
- Mohn, Fabio, Michael Weber, Michael Rebhan, Tim C. Roloff, Jens Richter, Michael B. Stadler, and others, 'Lineage-Specific Polycomb Targets and De Novo DNA Methylation Define Restriction and Potential of Neuronal Progenitors', *Molecular Cell*, 30.6 (2008), 755–66 <<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.007>>
- Monteiro, Antónia, Xiaoling Tong, Ashley Bear, Seng Fatt Liew, Shivam Bhardwaj, Bethany R. Wasik, and others, 'Differential Expression of Ecdysone Receptor Leads to Variation in Phenotypic Plasticity across Serial Homologs', ed. by Artyom Kopp, *PLOS Genetics*, 11.9 (2015), e1005529
<<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005529>>
- Morrison, Olivia, and Jitendra Thakur, 'Molecular Complexes at Euchromatin, Heterochromatin and Centromeric Chromatin', *International Journal of Molecular Sciences*, 22.13 (2021), 6922 <<https://doi.org/10.3390/ijms22136922>>
- Moshkovich, Nellie, and Elissa P. Lei, 'HP1 Recruitment in the Absence of Argonaute Proteins in *Drosophila*', ed. by Jeannie T. Lee, *PLoS Genetics*, 6.3 (2010), e1000880
<<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000880>>
- Müller, Jürg, Craig M. Hart, Nicole J. Francis, Marcus L. Vargas, Aditya Sengupta, Brigitte Wild, and others, 'Histone Methyltransferase Activity of a *Drosophila* Polycomb Group Repressor Complex', *Cell*, 111.2 (2002), 197–208
<[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00976-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00976-5)>
- Murray, K., 'The Occurrence of ϵ -N-Methyl Lysine in Histones', *Biochemistry*, 3.1 (1964), 10–15 <<https://doi.org/10.1021/bi00889a003>>
- Murren, C J, J R Auld, H Callahan, C K Ghalambor, C A Handelsman, M A Heskell, and others, 'Constraints on the Evolution of Phenotypic Plasticity: Limits and Costs of Phenotype and Plasticity', *Heredity*, 115.4 (2015), 293–301
<<https://doi.org/10.1038/hdy.2015.8>>
- Musselman, Catherine A., Sepideh Khorasanizadeh, and Tatiana G. Kutateladze, 'Towards Understanding Methyllysine Readout', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1839.8 (2014), 686–93
<<https://doi.org/10.1016/j.bbarm.2014.04.001>>
- Nadal-Ribelles, Mariona, Glòria Mas, Gonzalo Millán-Zambrano, Carme Solé, Gustav

- Ammerer, Sebastián Chávez, and others, 'H3K4 Monomethylation Dictates Nucleosome Dynamics and Chromatin Remodeling at Stress-Responsive Genes', *Nucleic Acids Research*, 43.10 (2015), 4937–49
<<https://doi.org/10.1093/nar/gkv220>>
- Nakayama, Jun-ichi, Judd C. Rice, Brian D. Strahl, C. David Allis, and Shiv I. S. Grewal, 'Role of Histone H3 Lysine 9 Methylation in Epigenetic Control of Heterochromatin Assembly', *Science*, 292.5514 (2001), 110–13
<<https://doi.org/10.1126/science.1060118>>
- Nalabothula, Narasimharao, Graham McVicker, John Maiorano, Rebecca Martin, Jonathan K Pritchard, and Yvonne N Fondufe-Mittendorf, 'The Chromatin Architectural Proteins HMGD1 and H1 Bind Reciprocally and Have Opposite Effects on Chromatin Structure and Gene Regulation', *BMC Genomics*, 15.1 (2014), 92
<<https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-92>>
- Nguyen, Anh Tram, and Yi Zhang, 'The Diverse Functions of Dot1 and H3K79 Methylation', *Genes & Development*, 25.13 (2011), 1345–58
<<https://doi.org/10.1101/gad.2057811>>
- Nijhout, H. Frederik, 'Development and Evolution of Adaptive Polyphenisms', *Evolution and Development*, 5.1 (2003), 9–18 <<https://doi.org/10.1046/j.1525-142X.2003.03003.x>>
- Ninova, Maria, Katalin Fejes Tóth, and Alexei A. Aravin, 'The Control of Gene Expression and Cell Identity by H3K9 Trimethylation', *Development*, 146.19 (2019), dev181180 <<https://doi.org/10.1242/dev.181180>>
- O'Connell, Sinead, Liangjun Wang, Stanley Robert, Clark A. Jones, Robert Saint, and Richard S. Jones, 'Polycomblike PHD Fingers Mediate Conserved Interaction with Enhancer of Zeste Protein', *Journal of Biological Chemistry*, 276.46 (2001), 43065–73 <<https://doi.org/10.1074/jbc.M104294200>>
- Olins, Donald E., and Ada L. Olins, 'Chromatin History: Our View from the Bridge', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4.10 (2003), 809–14
<<https://doi.org/10.1038/nrm1225>>
- Opachaloemphan, Comzit, Hua Yan, Alexandra Leibholz, Claude Desplan, and Danny Reinberg, 'Recent Advances in Behavioral (Epi)Genetics in Eusocial Insects', *Annual Review of Genetics*, 52.1 (2018), 489–510
<<https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120116-024456>>
- 'Oudet, P., Gross-Bellard, M. & Chambon, P. Electron Microscopic and Biochemical Evidence That Chromatin Structure Is a Repeating Unit. *Cell* 4, 281–300.', 1975
- Paro, R, and D S Hogness, 'The Polycomb Protein Shares a Homologous Domain with a Heterochromatin-Associated Protein of Drosophila.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88.1 (1991), 263–67
<<https://doi.org/10.1073/pnas.88.1.263>>
- Parry, W. H., F. Martorano, and E. K. Cotton, 'Management of Life-Threatening Asthma

- with Intravenous Isoproterenol Infusions', *American Journal of Diseases of Children* (1960), 130.1 (1976), 39–42
<<https://doi.org/10.1001/archpedi.1976.02120020041006>>
- Patalano, Solenn, Anna Vlasova, Chris Wyatt, Philip Ewels, Francisco Camara, Pedro G. Ferreira, and others, 'Molecular Signatures of Plastic Phenotypes in Two Eusocial Insect Species with Simple Societies', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112.45 (2015), 13970–75
<<https://doi.org/10.1073/pnas.1515937112>>
- Pengelly, Ana Raquel, Ömer Copur, Herbert Jäckle, Alf Herzig, and Jürg Müller, 'A Histone Mutant Reproduces the Phenotype Caused by Loss of Histone-Modifying Factor Polycomb', *Science*, 339.6120 (2013), 698–99
<<https://doi.org/10.1126/science.1231382>>
- Penke, Taylor J.R., Daniel J. McKay, Brian D. Strahl, A. Gregory Matera, and Robert J. Duronio, 'Direct Interrogation of the Role of H3K9 in Metazoan Heterochromatin Function', *Genes & Development*, 30.16 (2016), 1866–80
<<https://doi.org/10.1101/gad.286278.116>>
- Pfennig, David W., Matthew A. Wund, Emilie C. Snell-Rood, Tami Cruickshank, Carl D. Schlichting, and Armin P. Moczek, 'Phenotypic Plasticity's Impacts on Diversification and Speciation', *Trends in Ecology & Evolution*, 25.8 (2010), 459–67 <<https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.05.006>>
- Pigliucci, Massimo, *Phenotypic Plasticity: Beyond Nature and Nurture* (Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2001)
- Pinheiro, Ines, and Edith Heard, 'X Chromosome Inactivation: New Players in the Initiation of Gene Silencing', *F1000Research*, 6 (2017), 344
<<https://doi.org/10.12688/f1000research.10707.1>>
- Preissl, Sebastian, Rongxin Fang, Hui Huang, Yuan Zhao, Ramya Raviram, David U. Gorkin, and others, 'Single-Nucleus Analysis of Accessible Chromatin in Developing Mouse Forebrain Reveals Cell-Type-Specific Transcriptional Regulation', *Nature Neuroscience*, 21.3 (2018), 432–39
<<https://doi.org/10.1038/s41593-018-0079-3>>
- Prendergast, George C., and Edward B. Ziff, 'Methylation-Sensitive Sequence-Specific DNA Binding by the c-Myc Basic Region', *Science*, 251.4990 (1991), 186–89
<<https://doi.org/10.1126/science.1987636>>
- Price, Trevor D., 'Phenotypic Plasticity, Sexual Selection and the Evolution of Colour Patterns', *Journal of Experimental Biology*, 209.12 (2006), 2368–76
<<https://doi.org/10.1242/jeb.02183>>
- Rajpurohit, Subhash, Rani Richardson, John Dean, Raul Vazquez, Grace Wong, and Paul S. Schmidt, 'Pigmentation and Fitness Trade-Offs through the Lens of Artificial Selection', *Biology Letters*, 12.10 (2016), 20160625
<<https://doi.org/10.1098/rsbl.2016.0625>>

- Ransohoff, Julia D., Yuning Wei, and Paul A. Khavari, 'The Functions and Unique Features of Long Intergenic Non-Coding RNA', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19.3 (2018), 143–57 <<https://doi.org/10.1038/nrm.2017.104>>
- Rebeiz, Mark, John E. Pool, Victoria A. Kassner, Charles F. Aquadro, and Sean B. Carroll, 'Stepwise Modification of a Modular Enhancer Underlies Adaptation in a *Drosophila* Population', *Science (New York, N.Y.)*, 326.5960 (2009), 1663–67 <<https://doi.org/10.1126/science.1178357>>
- Riedel, Falko, Daniela Vorkel, and Suzanne Eaton, 'Megalin-Dependent Yellow Endocytosis Restricts Melanization in the *Drosophila* Cuticle', *Development*, 138.1 (2011), 149–58 <<https://doi.org/10.1242/dev.056309>>
- 'Roark, D. E., Geoghegan, T. E. & Keller, G. H. A Twosubunit Histone Complex from Calf Thymus. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 59, 542–547.', 1974
- Robertson, Alan, D. A. Briscoe, and J. H. Louw, 'Variation in Abdomen Pigmentation in *Drosophila Melanogaster* Females', *Genetica*, 47.1 (1977), 73–76 <<https://doi.org/10.1007/BF00122443>>
- Robertson, Keith D, 'DNA Methylation and Chromatin – Unraveling the Tangled Web', *Oncogene*, 21.35 (2002), 5361–79 <<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205609>>
- Roeske, Maxwell J., Eric M. Camino, Sumant Grover, Mark Rebeiz, and Thomas Michael Williams, 'Cis-Regulatory Evolution Integrated the Bric-à-Brac Transcription Factors into a Novel Fruit Fly Gene Regulatory Network', *eLife*, 7 (2018), e32273 <<https://doi.org/10.7554/eLife.32273>>
- Sadakierska-Chudy, Anna, and Małgorzata Filip, 'A Comprehensive View of the Epigenetic Landscape. Part II: Histone Post-Translational Modification, Nucleosome Level, and Chromatin Regulation by ncRNAs', *Neurotoxicity Research*, 27.2 (2015), 172–97 <<https://doi.org/10.1007/s12640-014-9508-6>>
- Sanchez, Roberto, and Ming-Ming Zhou, 'The PHD Finger: A Versatile Epigenome Reader', *Trends in Biochemical Sciences*, 2011, S0968000411000491 <<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.03.005>>
- Sánchez-Herrero, E., I. Vernós, R. Marco, and G. Morata, 'Genetic Organization of *Drosophila* Bithorax Complex', *Nature*, 313.5998 (1985), 108–13 <<https://doi.org/10.1038/313108a0>>
- Sanulli, S., M. J. Trnka, V. Dharmarajan, R. W. Tibble, B. D. Pascal, A. L. Burlingame, and others, 'HP1 Reshapes Nucleosome Core to Promote Phase Separation of Heterochromatin', *Nature*, 575.7782 (2019), 390–94 <<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1669-2>>
- Sauer, Paul V, Yajie Gu, Wallace H Liu, Francesca Mattioli, Daniel Panne, Karolin Luger, and others, 'Mechanistic Insights into Histone Deposition and Nucleosome Assembly by the Chromatin Assembly Factor-1', *Nucleic Acids Research*, 46.19 (2018), 9907–17 <<https://doi.org/10.1093/nar/gky823>>

- Sawada, Ken, Zhe Yang, John R. Horton, Robert E. Collins, Xing Zhang, and Xiaodong Cheng, 'Structure of the Conserved Core of the Yeast Dot1p, a Nucleosomal Histone H3 Lysine 79 Methyltransferase', *Journal of Biological Chemistry*, 279.41 (2004), 43296–306 <<https://doi.org/10.1074/jbc.M405902200>>
- Schertel, Claus, Monica Albarca, Claudia Rockel-Bauer, Nicholas W. Kelley, Johannes Bischof, Korneel Hens, and others, '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 (2015), 514–23 <<https://doi.org/10.1101/gr.181305.114>>
- Schneider, Ralf F., and Axel Meyer, 'How Plasticity, Genetic Assimilation and Cryptic Genetic Variation May Contribute to Adaptive Radiations', *Molecular Ecology*, 26.1 (2017), 330–50 <<https://doi.org/10.1111/mec.13880>>
- Schotta, Gunnar, Anja Ebert, Rainer Dorn, and Gunter Reuter, 'Position-Effect Variegation and the Genetic Dissection of Chromatin Regulation in *Drosophila*', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 14.1 (2003), 67–75 <[https://doi.org/10.1016/S1084-9521\(02\)00138-6](https://doi.org/10.1016/S1084-9521(02)00138-6)>
- Schuettengruber, Bernd, Henri-Marc Bourbon, Luciano Di Croce, and Giacomo Cavalli, 'Genome Regulation by Polycomb and Trithorax: 70 Years and Counting', *Cell*, 171.1 (2017), 34–57 <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.002>>
- Schuettengruber, Bernd, Daniel Chourrout, Michel Vervoort, Benjamin Leblanc, and Giacomo Cavalli, 'Genome Regulation by Polycomb and Trithorax Proteins', *Cell*, 128.4 (2007), 735–45 <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.009>>
- Schultz, David C., Kasirajan Ayyanathan, Dmitri Negorev, Gerd G. Maul, and Frank J. Rauscher, 'SETDB1: A Novel KAP-1-Associated Histone H3, Lysine 9-Specific Methyltransferase That Contributes to HP1-Mediated Silencing of Euchromatic Genes by KRAB Zinc-Finger Proteins', *Genes & Development*, 16.8 (2002), 919–32 <<https://doi.org/10.1101/gad.973302>>
- Schwartz, Yuri B, Tatyana G Kahn, David A Nix, Xiao-Yong Li, Richard Bourgon, Mark Biggin, and others, 'Genome-Wide Analysis of Polycomb Targets in *Drosophila Melanogaster*', *Nature Genetics*, 38.6 (2006), 700–705 <<https://doi.org/10.1038/ng1817>>
- Schwartz, Yuri B., and Vincenzo Pirrotta, 'Polycomb Silencing Mechanisms and the Management of Genomic Programmes', *Nature Reviews Genetics*, 8.1 (2007), 9–22 <<https://doi.org/10.1038/nrg1981>>
- Shaban, Haitham A., Roman Barth, Ludmila Recoules, and Kerstin Bystricky, 'Hi-D: Nanoscale Mapping of Nuclear Dynamics in Single Living Cells', *Genome Biology*, 21.1 (2020), 95 <<https://doi.org/10.1186/s13059-020-02002-6>>
- Shaban, Haitham A, and Andrew Seeber, 'Monitoring the Spatio-Temporal Organization and Dynamics of the Genome', *Nucleic Acids Research*, 48.7 (2020), 3423–34 <<https://doi.org/10.1093/nar/gkaa135>>

- Shahbazian, Mona D., and Michael Grunstein, 'Functions of Site-Specific Histone Acetylation and Deacetylation', *Annual Review of Biochemistry*, 76.1 (2007), 75–100 <<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.052705.162114>>
- Shakhmantsir, Iryna, Nicole L. Massad, and Jennifer A. Kennell, 'Regulation of Cuticle Pigmentation in *Drosophila* by the Nutrient Sensing Insulin and TOR Signaling Pathways: Insulin and TOR Pathways Regulate Pigmentation', *Developmental Dynamics*, 243.3 (2014), 393–401 <<https://doi.org/10.1002/dvdy.24080>>
- Shalaby, Nevine A., Raheel Sayed, Qiao Zhang, Shane Scoggin, Susan Eliazer, Adrian Rothenfluh, and others, 'Systematic Discovery of Genetic Modulation by Jumonji Histone Demethylases in *Drosophila*', *Scientific Reports*, 7.1 (2017), 5240 <<https://doi.org/10.1038/s41598-017-05004-w>>
- Shao, Zhaohui, Florian Raible, Ramin Mollaaghababa, Jeffrey R. Guyon, Chao-ting Wu, Welcome Bender, and others, 'Stabilization of Chromatin Structure by PRC1, a Polycomb Complex', *Cell*, 98.1 (1999), 37–46 <[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80604-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80604-2)>
- Shevelyov, Yuri Y., Sergey V. Ulianov, Mikhail S. Gelfand, Stepan N. Belyakin, and Sergey V. Razin, 'Dosage Compensation in *Drosophila*: Its Canonical and Non-Canonical Mechanisms', *International Journal of Molecular Sciences*, 23.18 (2022), 10976 <<https://doi.org/10.3390/ijms231810976>>
- Shi, Yujiang, Fei Lan, Caitlin Matson, Peter Mulligan, Johnathan R. Whetstine, Philip A. Cole, and others, 'Histone Demethylation Mediated by the Nuclear Amine Oxidase Homolog LSD1', *Cell*, 119.7 (2004), 941–53 <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.012>>
- Shi, Yun-Bo, 'Unliganded Thyroid Hormone Receptor Regulates Metamorphic Timing via the Recruitment of Histone Deacetylase Complexes', in *Current Topics in Developmental Biology* (Elsevier, 2013), cv, 275–97 <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396968-2.00010-5>>
- Shilatifard, Ali, 'The COMPASS Family of Histone H3K4 Methylases: Mechanisms of Regulation in Development and Disease Pathogenesis', *Annual Review of Biochemistry*, 81.1 (2012), 65–95 <<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-051710-134100>>
- Shukla, A., P. Chaurasia, and S. R. Bhaumik, 'Histone Methylation and Ubiquitination with Their Cross-Talk and Roles in Gene Expression and Stability', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66.8 (2009), 1419–33 <<https://doi.org/10.1007/s00018-008-8605-1>>
- Sibilia, Carly D, Kelly A Brosko, Christopher J Hickling, Lily M Thompson, Kristine L Grayson, and Jennifer R Olson, 'Thermal Physiology and Developmental Plasticity of Pigmentation in the Harlequin Bug (Hemiptera: Pentatomidae)', *Journal of Insect Science*, 18.4 (2018) <<https://doi.org/10.1093/jisesa/iey066>>
- Sienski, Grzegorz, Julia Batki, Kirsten-André Senti, Derya Dönertas, Laszlo Tirian, Katharina Meixner, and others, 'Silencio/CG9754 Connects the Piwi-piRNA

- Complex to the Cellular Heterochromatin Machinery', *Genes & Development*, 29.21 (2015), 2258–71 <<https://doi.org/10.1101/gad.271908.115>>
- Simola, Daniel F., Riley J. Graham, Cristina M. Brady, Brittany L. Enzmann, Claude Desplan, Anandasankar Ray, and others, 'Epigenetic (Re)Programming of Caste-Specific Behavior in the Ant *Camponotus Floridanus*', *Science*, 351.6268 (2016), aac6633 <<https://doi.org/10.1126/science.aac6633>>
- Simon, Matthew D., Stefan F. Pinter, Rui Fang, Kavitha Sarma, Michael Rutenberg-Schoenberg, Sarah K. Bowman, and others, 'High-Resolution Xist Binding Maps Reveal Two-Step Spreading during X-Chromosome Inactivation', *Nature*, 504.7480 (2013), 465–69 <<https://doi.org/10.1038/nature12719>>
- Singer, Miriam S, Alon Kahana, Alexander J Wolf, Lia L Meisinger, Suzanne E Peterson, Colin Goggin, and others, 'Identification of High-Copy Disruptors of Telomeric Silencing in *Saccharomyces Cerevisiae*', *Genetics*, 150.2 (1998), 613–32 <<https://doi.org/10.1093/genetics/150.2.613>>
- Slijper, E. J., 'Proc. Koninklijke Nederlandse Akademie Van Wetenschappen 45, Pp. 288–295, 407–415.', 1942, pp. 288–95, 407-415.
- Smith, Edwin R., Min Gyu Lee, Benjamin Winter, Nathan M. Droz, Joel C. Eissenberg, Ramin Shiekhatar, and others, '*Drosophila* UTX Is a Histone H3 Lys27 Demethylase That Colocalizes with the Elongating Form of RNA Polymerase II', *Molecular and Cellular Biology*, 28.3 (2008), 1041–46 <<https://doi.org/10.1128/MCB.01504-07>>
- Smith-Gill, Sandra J., 'Developmental Plasticity: Developmental Conversion versus Phenotypic Modulation', *American Zoologist*, 23.1 (1983), 47–55 <<https://doi.org/10.1093/icb/23.1.47>>
- Stearns, Stephen C., 'The Evolutionary Significance of Phenotypic Plasticity', *BioScience*, 39.7 (1989), 436–45 <<https://doi.org/10.2307/1311135>>
- Stillman, Bruce, 'Histone Modifications: Insights into Their Influence on Gene Expression', *Cell*, 175.1 (2018), 6–9 <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.032>>
- Strahl, Brian D, and C David Allis, 'The Language of Covalent Histone Modifications', 403 (2000)
- Suganuma, Tamaki, and Jerry L. Workman, 'Chromatin and Metabolism', *Annual Review of Biochemistry*, 87.1 (2018), 27–49 <<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012634>>
- Symmons, Orsolya, and Arjun Raj, 'What's Luck Got to Do with It: Single Cells, Multiple Fates, and Biological Nondeterminism', *Molecular Cell*, 62.5 (2016), 788–802 <<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.023>>
- Tachibana, Makoto, Kenji Sugimoto, Tatsunobu Fukushima, and Yoichi Shinkai, 'SET Domain-Containing Protein, G9a, Is a Novel Lysine-Preferring Mammalian

- Histone Methyltransferase with Hyperactivity and Specific Selectivity to Lysines 9 and 27 of Histone H3', *Journal of Biological Chemistry*, 276.27 (2001), 25309–17 <<https://doi.org/10.1074/jbc.M101914200>>
- Tachiwana, Hiroaki, Mariko Dacher, Kazumitsu Maehara, Akihito Harada, Yosuke Seto, Ryohei Katayama, and others, 'Chromatin Structure-Dependent Histone Incorporation Revealed by a Genome-Wide Deposition Assay', *eLife*, 10 (2021), e66290 <<https://doi.org/10.7554/eLife.66290>>
- Tamkun, John W, 'The Role of Brahma and Related Proteins in Transcription and Development', *Current Opinion in Genetics & Development*, 5.4 (1995), 473–77 <[https://doi.org/10.1016/0959-437X\(95\)90051-H](https://doi.org/10.1016/0959-437X(95)90051-H)>
- Tang, Hui Yuan, Martha S. B. Smith-Caldas, Michael V. Driscoll, Samy Salhadar, and Alexander W. Shingleton, 'FOXO Regulates Organ-Specific Phenotypic Plasticity In *Drosophila*', ed. by Ernst Hafen, *PLoS Genetics*, 7.11 (2011), e1002373 <<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002373>>
- Tatsumi, Daiki, Yohei Hayashi, Mai Endo, Hisato Kobayashi, Takumi Yoshioka, Kohei Kiso, and others, 'DNMTs and SETDB1 Function as Co-Repressors in MAX-Mediated Repression of Germ Cell-Related Genes in Mouse Embryonic Stem Cells', ed. by Osman El-Maarri, *PLOS ONE*, 13.11 (2018), e0205969 <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205969>>
- Tessarz, Peter, and Tony Kouzarides, 'Histone Core Modifications Regulating Nucleosome Structure and Dynamics', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15.11 (2014), 703–8 <<https://doi.org/10.1038/nrm3890>>
- Thakur, Jitendra, and Steven Henikoff, 'Architectural RNA in Chromatin Organization', *Biochemical Society Transactions*, 48.5 (2020), 1967–78 <<https://doi.org/10.1042/BST20191226>>
- Tie, Feng, Rakhee Banerjee, Chen Fu, Carl A. Stratton, Ming Fang, and Peter J. Harte, 'Polycomb Inhibits Histone Acetylation by CBP by Binding Directly to Its Catalytic Domain', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113.6 (2016) <<https://doi.org/10.1073/pnas.1515465113>>
- Tie, Feng, Jayashree Prasad-Sinha, Anna Birve, Åsa Rasmuson-Lestander, and Peter J. Harte, 'A 1-Megadalton ESC/E(Z) Complex from *Drosophila* That Contains Polycomblike and RPD3', *Molecular and Cellular Biology*, 23.9 (2003), 3352–62 <<https://doi.org/10.1128/MCB.23.9.3352-3362.2003>>
- Toomey, Matthew B., Ricardo J. Lopes, Pedro M. Araújo, James D. Johnson, Małgorzata A. Gazda, Sandra Afonso, and others, 'High-Density Lipoprotein Receptor SCARB1 Is Required for Carotenoid Coloration in Birds', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114.20 (2017), 5219–24 <<https://doi.org/10.1073/pnas.1700751114>>
- True, John R., 'Insect Melanism: The Molecules Matter', *Trends in Ecology & Evolution*, 18.12 (2003), 640–47 <<https://doi.org/10.1016/j.tree.2003.09.006>>

- Tsompana, Maria, and Michael J Buck, 'Chromatin Accessibility: A Window into the Genome', *Epigenetics & Chromatin*, 7.1 (2014), 33
<<https://doi.org/10.1186/1756-8935-7-33>>
- Turner, B. M., 'Decoding the Nucleosome', *Cell*, 75.1 (1993), 5–8
- Valencia-Sánchez, Marco Igor, Pablo De Ioannes, Miao Wang, David M. Truong, Rachel Lee, Jean-Paul Armache, and others, 'Regulation of the Dot1 Histone H3K79 Methyltransferase by Histone H4K16 Acetylation', *Science*, 371.6527 (2021), eabc6663 <<https://doi.org/10.1126/science.abc6663>>
- van Bemmelen, Joke G., Guillaume J. Filion, Arantxa Rosado, Wendy Talhout, Marcel de Haas, Tibor van Welsem, and others, 'A Network Model of the Molecular Organization of Chromatin in *Drosophila*', *Molecular Cell*, 49.4 (2013), 759–71
<<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.040>>
- Venkatesh, Swaminathan, and Jerry L. Workman, 'Histone Exchange, Chromatin Structure and the Regulation of Transcription', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16.3 (2015), 178–89 <<https://doi.org/10.1038/nrm3941>>
- Vermeulen, Michiel, H. Christian Eberl, Filomena Matarese, Hendrik Marks, Sergei Denisov, Falk Butter, and others, 'Quantitative Interaction Proteomics and Genome-Wide Profiling of Epigenetic Histone Marks and Their Readers', *Cell*, 142.6 (2010), 967–80 <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.08.020>>
- Vermeulen, Michiel, Klaas W. Mulder, Sergei Denisov, W.W.M. Pim Pijnappel, Frederik M.A. Van Schaik, Radhika A. Varier, and others, 'Selective Anchoring of TFIID to Nucleosomes by Trimethylation of Histone H3 Lysine 4', *Cell*, 131.1 (2007), 58–69 <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.016>>
- Via, Sara, Richard Gomulkiewicz, Gerdien De Jong, Samuel M. Scheiner, Carl D. Schlichting, and Peter H. Van Tienderen, 'Adaptive Phenotypic Plasticity: Consensus and Controversy', *Trends in Ecology & Evolution*, 10.5 (1995), 212–17
<[https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)89061-8](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)89061-8)>
- Vitaliano-Prunier, Adeline, Alexandra Menant, Maria Hobeika, Vincent Géli, Carole Gwizdek, and Catherine Dargemont, 'Ubiquitylation of the COMPASS Component Ssd2 Links H2B Ubiquitylation to H3K4 Trimethylation', *Nature Cell Biology*, 10.11 (2008), 1365–71 <<https://doi.org/10.1038/ncb1796>>
- Vogelmann, Jutta, Alessandro Valeri, Emmanuelle Guillou, Olivier Cuvier, and Marcello Nollmann, 'Roles of Chromatin Insulator Proteins in Higher-Order Chromatin Organization and Transcription Regulation', *Nucleus*, 2.5 (2011), 358–69
<<https://doi.org/10.4161/nucl.2.5.17860>>
- Waddington, C. H., 'Selection of the Genetic Basis for an Acquired Character', *Nature*, 169.4302 (1952), 625–26 <<https://doi.org/10.1038/169625b0>>
- Wang, Chenfei, Xiaoyu Liu, Yawei Gao, Lei Yang, Chong Li, Wenqiang Liu, and others, 'Reprogramming of H3K9me3-Dependent Heterochromatin during Mammalian Embryo Development', *Nature Cell Biology*, 20.5 (2018), 620–31

- <<https://doi.org/10.1038/s41556-018-0093-4>>
- Wang, Hengbin, Liangjun Wang, Hediye Erdjument-Bromage, Miguel Vidal, Paul Tempst, Richard S. Jones, and others, 'Role of Histone H2A Ubiquitination in Polycomb Silencing', *Nature*, 431.7010 (2004), 873–78
<<https://doi.org/10.1038/nature02985>>
- Wang, Ruo-Ran, Ran Pan, Wenjing Zhang, Junfen Fu, Jiandie D. Lin, and Zhuo-Xian Meng, 'The SWI/SNF Chromatin-Remodeling Factors BAF60a, b, and c in Nutrient Signaling and Metabolic Control', *Protein & Cell*, 9.2 (2018), 207–15
<<https://doi.org/10.1007/s13238-017-0442-2>>
- Wang, Wei, Jun Xu, Oliver Limbo, Jia Fei, George A. Kassavetis, Jenny Chong, and others, 'Molecular Basis of Chromatin Remodeling by Rhp26, a Yeast CSB Ortholog', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116.13 (2019), 6120–29
<<https://doi.org/10.1073/pnas.1818163116>>
- Wang, Wei, and John H. Yoder, 'Hox-Mediated Regulation of Doublesex Sculpts Sex-Specific Abdomen Morphology in Drosophila', *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 241.6 (2012), 1076–90 <<https://doi.org/10.1002/dvdy.23791>>
- Wang, Xin, Anne Ramat, Martine Simonelig, and Mo-Fang Liu, 'Emerging Roles and Functional Mechanisms of PIWI-Interacting RNAs', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 24.2 (2023), 123–41 <<https://doi.org/10.1038/s41580-022-00528-0>>
- Wang, Zhibin, Chongzhi Zang, Jeffrey A Rosenfeld, Dustin E Schones, Artem Barski, Suresh Cuddapah, and others, 'Combinatorial Patterns of Histone Acetylations and Methylations in the Human Genome', *Nature Genetics*, 40.7 (2008), 897–903
<<https://doi.org/10.1038/ng.154>>
- 'Watson JD, Crick FH. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*. ;171(4356):737–8.', 1953
- Watt, Ward B., 'ADAPTIVE SIGNIFICANCE OF PIGMENT POLYMORPHISMS IN COLIAS BUTTERFLIES, II. THERMOREGULATION AND PHOTOPERIODICALLY CONTROLLED MELANIN VARIATION IN *Colias Eurytheme*', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 63.3 (1969), 767–74
<<https://doi.org/10.1073/pnas.63.3.767>>
- Wei, Yi, Craig A. Mizzen, Richard G. Cook, Martin A. Gorovsky, and C. David Allis, 'Phosphorylation of Histone H3 at Serine 10 Is Correlated with Chromosome Condensation during Mitosis and Meiosis in *Tetrahymena*', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95.13 (1998), 7480–84
<<https://doi.org/10.1073/pnas.95.13.7480>>
- Wen, Bo, Hao Wu, Yoichi Shinkai, Rafael A Irizarry, and Andrew P Feinberg, 'Large Histone H3 Lysine 9 Dimethylated Chromatin Blocks Distinguish Differentiated from Embryonic Stem Cells', *Nature Genetics*, 41.2 (2009), 246–50
<<https://doi.org/10.1038/ng.297>>

- West-Eberhard, Mary Jane, *Developmental Plasticity and Evolution* (Oxford University Press, 2003) <<https://doi.org/10.1093/oso/9780195122343.001.0001>>
- West-Eberhard, Mary Jane, 'Phenotypic Accommodation: Adaptive Innovation Due to Developmental Plasticity', *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 304B.6 (2005), 610–18
<<https://doi.org/10.1002/jez.b.21071>>
- Williams, Thomas M., Jane E. Selegue, Thomas Werner, Nicolas Gompel, Artyom Kopp, and Sean B. Carroll, 'The Regulation and Evolution of a Genetic Switch Controlling Sexually Dimorphic Traits in *Drosophila*', *Cell*, 134.4 (2008), 610–23
<<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.052>>
- Wittkopp, Patricia J., and Patrícia Beldade, 'Development and Evolution of Insect Pigmentation: Genetic Mechanisms and the Potential Consequences of Pleiotropy', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20.1 (2009), 65–71
<<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2008.10.002>>
- Wittkopp, Patricia J., Sean B. Carroll, and Artyom Kopp, 'Evolution in Black and White: Genetic Control of Pigment Patterns in *Drosophila*', *Trends in Genetics: TIG*, 19.9 (2003), 495–504 <[https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(03\)00194-X](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(03)00194-X)>
- Woltereck, R., 'Weitere experimentelle untersuchungen über Artänderung, speziell über das Wesen quantitativer Artunterschiede bei Daphniden', *Zeitschrift für Induktive Abstammungs- und Vererbungslehre*, 9.1 (1909), 146–146
<<https://doi.org/10.1007/BF01876686>>
- Wutz, Anton, 'Gene Silencing in X-Chromosome Inactivation: Advances in Understanding Facultative Heterochromatin Formation', *Nature Reviews Genetics*, 12.8 (2011), 542–53 <<https://doi.org/10.1038/nrg3035>>
- Yadav, Anupama, Kaustubh Dhole, and Himanshu Sinha, 'Genetic Regulation of Phenotypic Plasticity and Canalisation in Yeast Growth', *PloS One*, 11.9 (2016), e0162326 <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162326>>
- Yan, Hua, Roberto Bonasio, Daniel F. Simola, Jürgen Liebig, Shelley L. Berger, and Danny Reinberg, 'DNA Methylation in Social Insects: How Epigenetics Can Control Behavior and Longevity', *Annual Review of Entomology*, 60.1 (2015), 435–52
<<https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020803>>
- Yan, Hua, Daniel F. Simola, Roberto Bonasio, Jürgen Liebig, Shelley L. Berger, and Danny Reinberg, 'Eusocial Insects as Emerging Models for Behavioural Epigenetics', *Nature Reviews Genetics*, 15.10 (2014), 677–88
<<https://doi.org/10.1038/nrg3787>>
- Yang, Fu, Zhenghui Quan, Huanwei Huang, Minghui He, Xicheng Liu, Tao Cai, and others, 'Ovaries Absent Links dLsd1 to HP1a for Local H3K4 Demethylation Required for Heterochromatic Gene Silencing', *eLife*, 8 (2019), e40806
<<https://doi.org/10.7554/eLife.40806>>
- Yang, Yul W, Ryan A Flynn, Yong Chen, Kun Qu, Bingbing Wan, Kevin C Wang, and others,

- 'Essential Role of lncRNA Binding for WDR5 Maintenance of Active Chromatin and Embryonic Stem Cell Pluripotency', *eLife*, 3 (2014), e02046
<<https://doi.org/10.7554/eLife.02046>>
- Yu, Yang, Jiaqi Gu, Ying Jin, Yicheng Luo, Jonathan B. Preall, Jinbiao Ma, and others, 'Panoramix Enforces piRNA-Dependent Cotranscriptional Silencing', *Science*, 350.6258 (2015), 339–42 <<https://doi.org/10.1126/science.aab0700>>
- Yuan, Wen, Tong Wu, Hang Fu, Chao Dai, Hui Wu, Nan Liu, and others, 'Dense Chromatin Activates Polycomb Repressive Complex 2 to Regulate H3 Lysine 27 Methylation', *Science*, 337.6097 (2012), 971–75 <<https://doi.org/10.1126/science.1225237>>
- Yuan, Wen, Mo Xu, Chang Huang, Nan Liu, She Chen, and Bing Zhu, 'H3K36 Methylation Antagonizes PRC2-Mediated H3K27 Methylation', *Journal of Biological Chemistry*, 286.10 (2011), 7983–89 <<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.194027>>
- Zhang, Tianyi, Sarah Cooper, and Neil Brockdorff, 'The Interplay of Histone Modifications – Writers That Read', *EMBO Reports*, 16.11 (2015), 1467–81
<<https://doi.org/10.15252/embr.201540945>>
- Zhang, Yi, and Danny Reinberg, 'Transcription Regulation by Histone Methylation: Interplay between Different Covalent Modifications of the Core Histone Tails', *Genes & Development*, 15.18 (2001), 2343–60
<<https://doi.org/10.1101/gad.927301>>
- Zhao, Shuai, C. David Allis, and Gang Greg Wang, 'The Language of Chromatin Modification in Human Cancers', *Nature Reviews Cancer*, 21.7 (2021), 413–30
<<https://doi.org/10.1038/s41568-021-00357-x>>
- Zheng, Yani, Fu-Ning Hsu, Wu Xu, Xiao-Jun Xie, Xinjie Ren, Xinsheng Gao, and others, 'A Developmental Genetic Analysis of the Lysine Demethylase KDM2 Mutations in *Drosophila Melanogaster*', *Mechanisms of Development*, 133 (2014), 36–53
<<https://doi.org/10.1016/j.mod.2014.06.003>>
- Zhong, Zhenhui, Suhua Feng, Sascha H. Duttke, Magdalena E. Potok, Yiwei Zhang, Javier Gallego-Bartolomé, and others, 'DNA Methylation-Linked Chromatin Accessibility Affects Genomic Architecture in *Arabidopsis*', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118.5 (2021), e2023347118
<<https://doi.org/10.1073/pnas.2023347118>>
- Zhou, Wenlai, Ping Zhu, Jianxun Wang, Gabriel Pascual, Kenneth A. Ohgi, Jean Lozach, and others, 'Histone H2A Monoubiquitination Represses Transcription by Inhibiting RNA Polymerase II Transcriptional Elongation', *Molecular Cell*, 29.1 (2008), 69–80 <<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.002>>
- Zimova, Marketa, L. Scott Mills, and J. Joshua Nowak, 'High Fitness Costs of Climate Change-induced Camouflage Mismatch', ed. by Joshua Lawler, *Ecology Letters*, 19.3 (2016), 299–307 <<https://doi.org/10.1111/ele.12568>>
- 'Zubay, G. & Doty, P. The Isolation and Properties of Deoxyribonucleoprotein Particles. *J. Mol. Biol.* 1, 1–20.', 1959