



HAL
open science

**Etude des modes d'action non canoniques des enzymes
TET dans la régulation de l'expression des gènes chez la
Drosophile**
Guerric Gilbert

► **To cite this version:**

Guerric Gilbert. Etude des modes d'action non canoniques des enzymes TET dans la régulation de l'expression des gènes chez la Drosophile. Génétique. Université Clermont Auvergne, 2023. Français. NNT : 2023UCFA0139 . tel-04860602

HAL Id: tel-04860602

<https://theses.hal.science/tel-04860602v1>

Submitted on 1 Jan 2025

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

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



Université Clermont Auvergne
École doctorale des Sciences de la Vie, Santé,
Agronomie, et de l'Environnement
Institut de Génétique, Reproduction et
Développement



Thèse de doctorat

**Étude des modes d'action non canoniques des
enzymes TET dans la régulation de l'expression des gènes
chez la Drosophile**

Présentée pour obtenir le grade de Docteur
(Décret du 5 juillet 1984)

Soutenue publiquement le 24 novembre 2023

Guerric Gilbert

Membres du jury :

Muriel Boube-Trey (Rapportrice)

Chargée de Recherche - RESTAURE, Université Toulouse II Paul Sabatier

Pierre-Antoine Defossez (Rapporteur)

Directeur de Recherche - Unité Epigénétique et Destin Cellulaire, Université Paris Cité

Pierre Cattenoz (Rapporteur)

Chargé de Recherche - IGBMC, Université de Strasbourg

Émilie Brasset (Présidente)

Professeur des Universités - iGReD, Université Clermont auvergne

Lucas Waltzer (Directeur de thèse)

Directeur de Recherche - iGReD, Université Clermont auvergne

Laurence Vandell (Co-directrice de thèse)

Directrice de Recherche - iGReD, Université Clermont auvergne



Université Clermont Auvergne
École doctorale des Sciences de la Vie, Santé,
Agronomie, et de l'Environnement
Institut de Génétique, Reproduction et
Développement



Thèse de doctorat

**Étude des modes d'action non canoniques des
enzymes TET dans la régulation de l'expression des gènes
chez la Drosophile**

Présentée pour obtenir le grade de Docteur
(Décret du 5 juillet 1984)

Soutenue publiquement le 24 novembre 2023

Guerric Gilbert

Membres du jury :

Muriel Boube-Trey (Rapportrice)

Chargée de Recherche - RESTAURE, Université Toulouse II Paul Sabatier

Pierre-Antoine Defossez (Rapporteur)

Directeur de Recherche - Unité Epigénétique et Destin Cellulaire, Université Paris Cité

Pierre Cattenoz (Rapporteur)

Chargé de Recherche - IGBMC, Université de Strasbourg

Émilie Brassat (Présidente)

Professeur des Universités - iGReD, Université Clermont auvergne

Lucas Waltzer (Directeur de thèse)

Directeur de Recherche - iGReD, Université Clermont auvergne

Laurence Vandell (Co-directrice de thèse)

Directrice de Recherche - iGReD, Université Clermont auvergne

Résumé

Les protéines de la famille Ten-Eleven Translocation (TET) sont des acteurs clés de la régulation de la transcription et des mutations des gènes codant pour ces enzymes sont fréquemment associées au développement de diverses pathologies comme des cancers. Si les enzymes TET ont été largement décrites pour leur rôle dans la déméthylation des 5-méthylcytosines (5mC) sur l'ADN, ces enzymes peuvent aussi agir sur d'autres substrats ou indépendamment de leur activité enzymatique. En ce sens, le génome de la Drosophile est globalement dépourvu de 5mC mais code pour des enzymes TET, faisant de cet organisme un modèle de choix pour caractériser les fonctions de TET par-delà l'oxydation des 5mC. Au cours de ma thèse, je me suis intéressé au mécanisme moléculaire d'action de TET chez la drosophile. Tout d'abord, nous avons ré-examiné son rôle dans la déméthylation des 6-méthyladénines (6mA), une modification épigénétique dont la présence et le rôle chez les métazoaires sont controversés. Nos résultats montrent que les niveaux de 6mA sont très faibles dans le génome de la Drosophile, et que TET est incapable d'accommoder cette marque comme substrat. De plus, l'étude d'un mutant *Tet* dépourvu d'activité catalytique indique que l'activité enzymatique de TET n'est pas requise pour le développement de la mouche, et que dans le système nerveux central larvaire, son mode d'action est majoritairement indépendant de son activité catalytique. Au sein de ce tissu, nous avons pu montrer que TET interagit avec le Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) pour activer l'expression de ses gènes cibles.

Mots clés : TET, Drosophile, Polycomb, activité catalytique, régulation de la transcription, 6-méthyladénine

Abstract

Proteins from the Ten-Eleven Translocation (TET) family are key players in transcription regulation, and mutations affecting *TET* genes are frequently associated with several pathologies such as cancers. TET enzymes have been mainly described for their involvement in 5-methylcytosine (5mC) demethylation on DNA, but these enzymes can also act on other substrates or independently of their catalytic activity. Interestingly, the *Drosophila* genome is essentially deprived of 5mC but still encodes for TET enzymes. Thus, this organism stands as a valuable model system to study TET functions beyond its ability to oxidise 5mC. During my PhD, I characterised TET molecular mechanisms of action in *Drosophila*. First, I participated to the re-evaluation of TET function in 6-methyladenine (6mA) demethylation, an epigenetic modification whose presence and function in metazoans are still under debate. Our results show that 6mA levels are very low in *Drosophila* genome, and that TET is not able to accommodate this mark as a substrate. In addition, our study of a *Tet* mutant in which its catalytic activity is abolished show that TET enzymatic function isn't required for fly development, and that TET function in the larval central nervous system is mainly catalytic independent. In this tissue, our results show that TET interacts with the Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) to promote gene activation.

Keywords : TET, Drosophila, Polycomb, catalytic activity, transcription regulation, 6-methyladenine

Remerciements

Premièrement je tiens à remercier chaleureusement l'ensemble des membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Merci à mes rapporteurs les Dr. **Muriel Boubetrey**, **Pierre-Antoine Defossez** et **Pierre Cattenoz**, j'espère que ce manuscrit et la soutenance seront à la hauteur de votre expertise et de vos attentes. Merci également au Pr. **Emilie Brasset** qui a eu l'occasion de suivre le projet au cours de ces 4 années de thèse et avec qui j'ai toujours eu grand plaisir à échanger.

Je remercie tout particulièrement **Lucas** et **Laurence**, mes co-encadrants. Merci d'avoir accueilli un étudiant un peu vagabond qui cherchait encore la thématique de ses rêves. Envieux de découvrir le monde de la génétique, de la bio-informatique, et de la Drosophile, on peut dire que j'ai été servi ! Parfois dissipé, parfois réservé, j'ai néanmoins toujours* été heureux de travailler et de m'investir pour l'équipe. Nos résultats n'ont pas toujours été très motivant mais bon, le plus important (en dehors du papier), c'est de s'amuser !

Ces prochains mots sont pour l'ensemble des membres du Waltzer lab, membres passés et présents. A commencer par **Manon**, **Emilie** et **Marion**, mes mentors de la génétique de la droso. Seulement 4 paires de chromosomes mais tant de galères entre phénotypes bizarres, croisements difficiles et recombinaisons improbables... Sans vous ça aurait été chaud ! Vous m'avez accueilli avec tant de bienveillance, je me suis tout de suite senti à ma place. Depuis vos départs, tel Simba dans la savane, j'ai plusieurs fois tenté d'invoquer vos esprits lors de nuits étoilées pour que vous me guidiez dans mes croisements (super idée de photomontage d'ailleurs). **Manon**, je te remercie pour ces kilo-tonnes de bons moments passés ensemble (galères et boulettes comprises). C'est toujours un plaisir de prendre de tes nouvelles et d'échanger avec toi, tant que ce n'est pas à propos de 6mA... **Emilie**, tata, merci pour nos moments de complicité, tes conseils écolo et nutritionnels. Je ne suis toujours pas végétarien, bien que ce régime alimentaire soit compatible avec la consommation de pommes noisettes, mais je continue de prêcher ta bonne parole à chaque fois que j'en ai l'occasion. **Vincent**, un bel ajout à notre équipe de fins compères. Je te remercie pour ton investissement scientifique, pour tes imitations très réussies (la petite voix aigüe c'est ma prèf'), mais aussi pour les soirées... euh... « tisane » (même dans mes remerciements je nous couvre). N'oublie pas ma bonne parole. « Tant qu'il y a de l'ADN, il y a de l'espoir. Et quand y en a plus, 14 cycles PCR et

c'est reparti ! » **Camille** ! Hm hm... **CAMIHILLE** !! Content que tu aies rejoint la bande, bien qu'un peu frustré de ne pas pouvoir suivre la suite de ta course sur le circuit de la thèse, je compte sur toi pour continuer à mettre le Turbo(ID), tabarnak ! **Roma-romama-ane** (à lire en chantant comme Lady Gaga). Ou encore « z'ai cru voir un **Rominet** » (à lire avec la voix de Titi le petit oiseau) quand tu fais ton sourire dans les couloirs. Merci de m'avoir aidé avec les cellules HeLa HeLa HeLa (cette fois c'est Rihanna), ou encore les comptages de cellules gliales qui te sont entièrement dédiés dans cette thèse. Merci pour nos conversations « geek » (Hollow Knight). Tu auras toujours une place dans notre équipe de jeux de rôle heroic fantasy « Donjon & Waltzers ». **Yoan**, notre informaticien bien aimé, merci pour m'avoir formé tel ton padawan et pour les discussions d'informatique, de logique, de statistiques, et d'autres trucs en -ique. Je sais que tu ne seras jamais au chômage technique maiiiiis je suis sûr que mes longues listes de courses d'analyses à faire vont te manquer. **Nadège**, merci d'avoir rejoint notre équipe (en même temps, comment ne pas rejoindre notre bande de joyeux lurons ?). Merci pour toutes les manip chaussette-slip (je parle bien d'immunomarquages), les PCR et les westerns. Je n'ai toujours pas percé ton secret... Pourquoi toutes les manip que je te donne fonctionnent ? Merci à vous tous pour avoir fait partie de cet environnement de travail exceptionnel. Et surtout n'oubliez pas : *together, we can be heroes* !

Je voudrais maintenant remercier l'ensemble du personnel de l'institut GReD. En particulier la communauté des drosophilistes du 5^{ème} étage. Un grand merci aux équipes Brasset, Mirouse et Jagla, ainsi qu'au personnel technique pour la très bonne ambiance générale au labo. Merci à **Caroline** pour son aide au microscope, aux grandes inquisitrices **Graziella** et **Nath** qui font respecter la loi au 5^{ème} étage. A **Marie-Jo**, **Maryse** et **Véronique** du service administratif (**Maryse** tu vas manquer à chouchou). Merci au Dr. **David Volle** et à toute son équipe pour m'avoir fait découvrir le GReD lors de mon M2 et pour m'avoir formé dans les meilleures conditions pour suivre le chemin de la thèse. Merci aux doc/post-doc de l'institut avec lesquels j'ai partagé quelques moments. La liste est longue alors allons-y ! **Blandine**, mon homologue de thèse. On s'est croisé à Lyon, on n'a aucun souvenir l'un de l'autre, mais c'est pas grave, aujourd'hui on est là et on va en découdre avec cette thèse. **Sandy** (Hi **Sandy** !), merci pour ta douceur et ta gentillesse, la bise à **Khalil** de ma part. **Margot**, je suis actuellement en train d'écrire plus bas que terre pour te remercier comme il se doit. Je compte sur toi pour devenir la nouvelle samouraï du ChIP-seq et du Cut&Run. **Elia**, toujours

plus de gags avec toi, on adore. **Elodie** (Prince de France), je suis toujours convaincu que tu es un ange descendu du ciel pour apporter un peu de lumière dans nos tristes vies. **Fabiana**, notre wonder maman ! **Lisa** (ou Mme. Calvary pour les non-intimes), Bretonne devenue New-Yorkaise, tu nous manque beaucoup ! **Marine** (Mme. Vialat pour les autres), merci pour les pauses clope sans clope, les ralleries, les potins, les scandales, les moments GReDuates laissant libre court à notre folie, *it's f*cking showtime* n'est-ce pas ? J'espère qu'un jour nous aurons le courage de passer les portes du Chantilly pour découvrir le pays des merveilles ! **Marine** et **Lisa**, on aura vécu pas mal de (més)aventures en Getz, à Sète, au Moya, à la Bamboche, et bien plus encore. **Prikshit**, my bro ! I hope that one day you'll invite me to India so we could hang out there and see some elephants. I'm also up for some races with ~~the Celerie~~ the Swift (if I get it back one day). Can't wait to kick some a** at the Rasso with you and Marine ! And to teach you how to swim. Les boys **Victor**, **Ronan**, **Nico** et **Jonas**, serez-vous un jour les champions des mots fléchés ? Et à quand une nouvelle bamboche modérée ?? **Erwan** et **Aline**, les fans de Zelda (non, je ne parle pas du facteur de transcription pionnier).

Je remercie aussi mes camarades extérieurs au GReD, **Louis**, **Julia**, **Swen**, les filles du ~~M2ish~~ CBRV (**Léa**, **Coline**, **Margot**), **Fanny** et **Audrey** (bon vous deux vous êtes du GReD mais chut), Mme. La Présidente **Pauline** et les gens du Doctoverre. Merci de m'avoir sorti de mon rythme boulot-dodo. **Inès** qui a eu la chance (ou le malheur) de partager mes bêtises pendant de longues années. Maintenant c'est à mon tour d'en finir avec cette thèse et d'être un winner, baby ! **Arthur** et **Tom**, que je n'oublie jamais. **Mathias**, **Mathieu**, **Carine & Co** la fierté du lycée Banville.

Mention spéciale pour les drosophiles, parce que oui, moi j'aime la droso ! Ainsi qu'à mon blob, fidèle compagnon de paillasse.

Enfin, je remercie de tous mon cœur ma famille et plus particulièrement mes deux parents. Il est vrai qu'au bingo des meilleurs parents, vous cochez beaucoup de cases <3

A vous tous,

Merci d'être là, merci d'exister !

Je remercie aussi quelques sponsors dont the Pokemon compagny, le traiteur d'Auchan, les dinosaurus, le service fidélité EPpoint d'Eppendorf. ADNubis, dieu de la pesée des reads et du séquençage. Je ne remercie pas : Fedex (mauvais transporteur, très bonne agence de voyage), les ARNi qui ne marchent pas, le saboteur du labo, ADUM, les méchants reviewers/éditeurs.

* sauf jours de dissection sans fin, de NT-seq, et de « Guerric ça en est où les analyses de HiC ? »

Abréviations

ADN :	Acide Désoxyribonucléique
AEBP2 :	<i>AE Binding Protein 2</i>
ANT :	Antennapedia
ALKBH :	<i>Alkylation Repair Homolog Protein</i>
ARN :	Acide Ribonucléique
ARNi :	ARN d'interférence
ARNm :	ARN messenger
ARNr :	ARN ribosomique
ARNt :	ARN de transfert
ARN Pol :	ARN Polymérase
ASXL1 :	<i>Additionnal Sex Combs 1</i>
BAP1 :	<i>BRCA1 associated protein-1</i>
BBB :	barrière hémato-encéphalique
BEAF-32 :	<i>Boundary element-associated factor of 32kD</i>
BER :	<i>Base Excision Repair</i>
BX :	Bithorax
CB :	Cerveau central
CBP :	<i>CREB-binding protein</i>
CBX :	<i>Chromobox</i>
ChIP-seq :	<i>Chromatin Immunoprecipitation - sequencing</i>
COMPASS :	<i>Complex Proteins Associated with Set1</i>
CP190 :	<i>Centrosomal protein 190kD</i>
CTCF :	<i>CCCTC-binding factor</i>
CXXC :	Cystéine-X-X-Cystéine (où X correspond à n'importe quel acide aminé)
DAM :	<i>DNA Adenine Methyltransferase</i>
DAMT-1 :	<i>DNA N6 Adenine Methyltransferase 1</i>
DIP-seq :	<i>DNA Immunoprecipitation – sequencing</i>
DMAD :	<i>DNA 6mA demethylase</i>
DNMT :	<i>DNA Methyltransferase</i>
dRAF :	<i>dRING-Associated-Factors</i>
DSBH :	<i>Double Stranded β-helix</i>
Esc :	<i>Extra sexcomb</i>
ESC :	Cellule souche embryonnaire
E(z) :	<i>Enhancer of zeste</i>
FDR :	<i>False Discovery Rate</i>
FTO :	<i>Fat mass and Obesity-associated Protein</i>
GABA :	Acide γ -aminobutyrique
GAF :	GAGA factor
gcm :	<i>glial cell missing</i>
GMC :	Cellule mère des ganglions
HAT :	Histone Acetyltransférase
HDAC :	Histone Deacétylase
HIF1 :	<i>Hypoxia-inducible factor-1</i>
HMT :	Histone Methyltransferase
HSC :	Cellule souche hématopoïétique

HXD :	Histidine-X-Aspartate (où X correspond à n'importe quel acide aminé)
IDH :	<i>Isocitrate déshydrogénase</i>
INP :	Progéniteur neuronal intermédiaire
IPD :	<i>Inter-Pulse Duration</i>
JARID2 :	<i>Jumonji And AT-Rich Interaction Domain Containing 2</i>
JmjC :	<i>Jumonji C</i>
KDM :	<i>Lysine demethylase</i>
KO :	<i>Knock-out</i>
LINE :	<i>Long Interspersed Nuclear Elements</i>
LSD1 :	<i>Lysine-specific demethylase 1</i>
LTR :	<i>Long Tandem repeat</i>
MBD :	<i>Methyl CpG Binding Domain</i>
METTL :	<i>methyltransferase like</i>
MLL :	Mixed Lineage Leukemia
MPND :	<i>MPN-Domain containing protein</i>
NB :	Neuroblaste
NGB :	Neuroglioblaste
NGS :	<i>Next Generation Sequencing</i>
NMAD-1 :	<i>N6-Methyl Adenine Demethylase 1</i>
NPC :	Cellule progénitrice neurale
NT-seq :	<i>Nitrite Treatment - sequencing</i>
OGlcNAc :	O-linked β -N-acétylglucosamine
OL :	Lobe optique
Pc :	<i>Polycomb</i>
PcG :	<i>Polycomb Group</i>
PCGF :	<i>Polycomb group finger</i>
Pcl :	<i>Polycomb-like</i>
PG :	Glue péri-neurale
Ph :	<i>Polyhomeotic</i>
PHC :	<i>Polyhomeotic Homolog</i>
PHD :	<i>Plant Homeodomain</i>
Pho :	<i>Pleiohoméotique</i>
Pho1 :	<i>Pho-like</i>
Pho-RC :	<i>Pho-Repressive Complex</i>
PIC :	C omplexe de pré-initiation de la transcription
PR-DUB :	<i>Polycomb Repressive - Deubiquitinase</i>
PRC :	<i>Polycomb Repressive Complex</i>
PRE :	<i>Polycomb Response Element</i>
PRMT :	Protein Arginine Méthyltransférase
Psc :	<i>Posterior sexcomb</i>
Psq :	<i>Pipsqueak</i>
RAWUL :	ring-finger and WD40-associated ubiquitin-like protein
Repo :	<i>reversed polarity</i>
RING :	Really Interesting New Gene
RYBP :	<i>RING1 And YY1 Binding Protein</i>
SAM :	<i>Sterile Alpha Motif</i>
SET :	<i>Su(var)3-9, Enhancer of zeste and Tritorax</i>

Sfmbt :	<i>Scm with four Malignant Brain Tumor</i>
sli :	<i>slit</i>
SMRT-seq :	<i>Single-Molecule Real-time - sequencing</i>
SNC :	<i>Système nerveux central</i>
SPG :	<i>Glie sub-périneurale</i>
STAB1 :	<i>Special AT-Rich Sequence Binding Protein 1</i>
STR :	<i>Short Tandem Repeat</i>
Su(z)12 :	<i>Suppressor of zeste 12</i>
SWI/SNF :	<i>Switch/sucrose non-fermentable</i>
TAD :	<i>Topology-Associated Domain</i>
TDG :	<i>Thymine DNA Glycosylase</i>
TET :	<i>Ten-Eleven Translocation</i>
tgo :	<i>tango</i>
TRE :	<i>Trithorax Response Element</i>
tRFs :	<i>fragments d'ARNt</i>
TrxG :	<i>Trithorax-group Proteins</i>
tRF :	<i>Fragment d'ARNt</i>
TSS :	<i>Site d'initiation de la transcription</i>
VNC :	<i>Corde nerveuse ventrale</i>

Sommaire

Introduction.....	1
Préface	2
1. La régulation de l'expression des gènes	4
1.1. Organisation du génome eucaryote	4
1.2. Contrôle transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de l'expression des gènes	5
1.2.1 La transcription et son contrôle	5
1.2.2 Du transcrit à la protéine	6
2. Régulations épigénétiques de l'expression des gènes	8
2.1. Méthylation des cytosines sur l'ADN	8
2.1.1. Caractéristiques de la marque 5mC	8
2.1.2. Dépôt de la méthylation 5mC	8
2.1.3. Déméthylation de la marque 5mC	9
2.1.4. Fonctions de la 5mC.....	10
2.1.5. Détection de la 5mC.....	12
2.2. Méthylation 6mA sur l'ADN	13
2.2.1. La marque 6mA chez les procaryotes	13
2.2.2. La marque 6mA chez les eucaryotes unicellulaires et les plantes.....	14
2.2.3. La marque 6mA chez les métazoaires.....	14
2.2.3.1. Chez les invertébrés	14
2.2.3.2. Chez les mammifères	15
2.2.4. Remise en cause du 6mA ADN chez les métazoaires.....	17
2.3. Modifications post-traductionnelles des histones.....	19
2.3.1. Méthylation des histones.....	19
2.3.2. Acétylation des histones	21
2.3.3. Ubiquitination des histones	21
2.3.4. Phosphorylation des histones	22
2.4. Topologie du génome	23
2.5. Les modifications épitranscriptomiques.....	23
2.5.1. Diversité des marques.....	23
2.5.2. La marque m6A.....	24
2.5.3. Les marques m5C et hm5C.....	25
3. Les enzymes de la famille TET	26
3.1. Structure des protéines TET.....	26
3.1.1. Le domaine CXXC de liaison à l'ADN	26
3.1.2. Le domaine catalytique	27
3.2. Activité enzymatique des enzymes TET	27
3.2.1. Réaction d'oxydation des 5mC.....	27
3.2.2. La marque 5hmC	28
3.2.3. La marque 5fC	28
3.2.4. La amrque 5caC.....	29
3.2.5. Régulation de l'activité catalytique de TET	29
3.3. Recrutement des enzymes TET sur la chromatine.....	30
3.4. Fonctions biologiques des enzymes TET.....	31

3.4.1.	Fonctions au cours du développement embryonnaire	32
3.4.2.	Fonctions dans l'hématopoïèse	33
3.4.3.	Fonctions dans le système nerveux central	34
3.5.	Modes d'action non-canoniques	35
3.5.1.	Catalytiques-dépendants	35
3.5.2.	Catalytiques-indépendants	36
3.6.	Les protéines TET chez la Drosophile	37
3.6.1.	Structure et expression du gène <i>Tet</i> chez la Drosophile	37
3.6.2.	Fonctions biologiques de <i>Tet</i> chez la Drosophile	38
3.6.3.	Modes d'action non-canoniques proposés chez la Drosophile	38
4.	Le complexe Polycomb	41
4.1.	Identification du complexe Polycomb	41
4.2.	Diversité des complexes Polycomb	42
4.2.1.	Le complexe PRC1	42
4.2.1.1.	Le complexe PRC1 canonique	42
4.2.1.2.	Les complexes PRC1 non-canoniques	44
4.2.2.	Le complexe PRC2	44
4.2.2.1.	Le complexe PRC2 canonique	45
4.2.2.2.	Protéines accessoires et complexes PRC2 non-canoniques	45
4.2.3.	Les autres complexes	46
4.3.	Recrutement du complexe Polycomb	47
4.3.1.	Interdépendance des complexes PRC1 et PRC2	47
4.3.2.	PRE et recruteurs	48
4.4.	Régulation de la transcription par le complexe Polycomb	49
4.4.1.	Mécanismes de répression transcriptionnelle	49
4.4.2.	Mécanismes d'activation transcriptionnelle	50
4.5.	Fonctions biologiques du complexe Polycomb	51
4.5.1.	Pluripotence et différenciation	51
4.5.2.	Rôle dans la tumorigenèse	52
5.	Le système nerveux central de la Drosophile	54
5.1.	Le modèle <i>Drosophila melanogaster</i>	54
5.2.	Développement et organisation du système nerveux central	54
5.3.	Composition cellulaire du système nerveux central	55
5.3.1.	Les neuroblastes	55
5.3.2.	Les neurones	56
5.3.3.	Les cellules gliales	57
6.	Objectifs du projet de thèse	60
Résultats		61
1.	La marque 6mA est rare dans le génome de la Drosophile et n'est pas effacée par la dioxygénase TET	62
2.	TET agit avec PRC1 pour activer l'expression des gènes indépendamment de son activité catalytique	81
3.	Résultats complémentaires	116
3.1.	Rôle de <i>Tet</i> dans le système nerveux central larvaire	116
3.2.	Rôle de <i>Tet</i> dans la structure 3D de l'ADN	117

Discussion	120
1. TET ne déméthyle pas la marque 6mA.....	121
2. TET agit majoritairement <i>via</i> un mode d'action non-enzymatique.....	124
2.1. Fonction non-enzymatique de <i>Tet</i>	124
2.2. Fonction enzymatique de <i>Tet</i>	125
3. Mécanisme d'activation transcriptionnelle par TET et PRC1.....	128
4. Relation fonctionnelle entre TET et PRC2.....	130
5. Fonctions de TET dans les différents types cellulaires du SNC.....	131
Références bibliographiques.....	133
Annexes	162
Annexe 1. Prmt5 promotes vascular morphogenesis independently of its methyltransferase activity.....	163

Table des figures et tableaux

Figure 1. Organisation moléculaire de l'ADN et des nucléotides.

Figure 2. Structure et organisation des nucléosomes.

Figure 3. Les différents niveaux de compaction de la chromatine.

Figure 4. Les principaux éléments génomiques impliqués dans la régulation de la transcription.

Figure 5. Maturation des ARN messagers.

Figure 6. Diversité des modifications post-traductionnelles des protéines.

Figure 7. Structure atomique de la cytosine et de ces dérivés modifiés.

Figure 8. Mécanismes de méthylation de l'ADN par les enzymes de la famille DNA méthyltransférase (DNMT).

Figure 9. Réécriture du patron de méthylation ADN au cours du développement embryonnaire chez les mammifères.

Figure 10. Organisation génomique de la marque 5mC et impact sur la transcription.

Figure 11. Evolution et conservation des gènes codant pour les enzymes de la famille DNA méthyltrasférase (DNMT).

Figure 12. Principe de la technique de traitement de l'ADN au bisulfite.

Figure 13. Principe des technologies de séquençage de 3^{ème} génération et détection de bases modifiées.

Figure 14. La marque N6-méthyladénosine.

Figure 15. Diversité des modifications post-traductionnelles.

Figure 16. Localisation génomique des principaux résidus lysines pouvant être méthylés sur l'histone H3.

Figure 17. Architecture tri-dimensionnelle du génome.

Figure 18. Diversité des modifications épitranscriptomiques.

Figure 19. Structure des enzymes de la famille Ten-Eleven Translocation (TET).

Figure 20. Voie de méthylation et déméthylation des cytosines.

Figure 21. Modèle de leucémogénèse suite à l'acquisition de mutations épigénétiques.

Figure 22. Biogenèse et diversité des fragments d'ARN de transfert (tRFs).

Figure 23. Modèle des modes d'action enzymatiques et non-enzymatiques de Tet1 dans la régulation des ESC et de l'embryogenèse.

Figure 24. Comparaison des fonctions enzymatiques et non-enzymatiques de Tet2 au cours de l'hématopoïèse.

Figure 25. Conservation des enzymes TET chez la Drosophile.

Figure 26. Mutations du gène *Tet* et phénotypes associés à la perte de TET chez la Drosophile.

Figure 27. Modèle de la fonction de TET dans l'activation du génome zygotique chez la Drosophile.

Figure 28. Modèle d'activation des gènes neuronaux par TET chez la Drosophile.

Figure 29. Les gènes homéotiques (*Hox*) définissent l'identité segmentaire.

Figure 30. Les complexes de la famille COMPASS.

Figure 31. Les mutants PcG présentent des défauts homéotiques.

Figure 32. Les sous-unités du complexe PRC1 chez la Drosophile et leurs domaines fonctionnels.

Figure 33. Les sous-unités du complexe PRC1 chez la Drosophile et leurs homologues chez les mammifères.

Figure 34. Les complexes canoniques et non-canoniques PRC1 chez les mammifères.

Figure 35. Les sous-unités du complexe PRC2 chez la Drosophile et leurs homologues chez les mammifères.

Figure 36. Le complexe PRC2 chez les mammifères.

Figure 37. Le complexe PR-DUB chez la Drosophile.

Figure 38. Le complexe Pho-RC chez la Drosophile.

Figure 39. Modèles de recrutement du complexe Polycomb.

Figure 40. Les Polycomb Response Element (PRE) sont associés au recrutement de nombreux facteurs de transcription.

Figure 41. Mécanismes de répression de la transcription par les complexes PRC1 et PRC2.

Figure 42. Cycle de développement de *Drosophila melanogaster*.

Figure 43. Les chromosomes de *Drosophila melanogaster*.

Figure 44. Organisation du système nerveux central (SNC) embryonnaire de la Drosophile.

Figure 45. Comparaison du système nerveux central larvaire et adulte.

Figure 46. La spécification des neuroblastes.

Figure 47. Les différents modes de division des neuroblastes (NB).

Figure 48. Les cibles de *gcm*.

Figure 49. Diversité et localisation des cellules gliales chez la Drosophile.

Figure 50. Validation du knock-down de *Tet*.

Figure 51. Impact de la perte de *Tet* et Polycomb sur les connexions des neurones Fas3⁺ dans la VNC.

Figure 52. Nombre de cellules gliales dans le CB des mutants *Tet*.

Figure 53. La réexpression de TET-C restaure les niveaux de SLIT dans la VNC.

Figure 54. Colocalisation entre TET-C et Ph sur chromosomes polytènes.

Figure 55. TET n'exerce pas d'effet insulator.

Figure 56. TET se lie aux ancrs des boucles Polycomb.

Tableau 1. Viabilité des mouches surexprimant TET-L ou TET-C avec différents pilotes.

Introduction

Préface :

Une régulation précise de l'expression des gènes est requise pour le développement d'un organisme sain. Les modifications épigénétiques et les enzymes responsables de leur dynamique sont des acteurs clés de cette régulation. Ainsi, au cours de ma thèse je me suis intéressé au rôle des protéines de la famille Ten-Eleven Translocation (TET). Ces enzymes épigénétiques sont des régulateurs importants de l'expression des gènes grâce à leur fonction de déméthylation des cytosines sur l'ADN (5mC). De plus, des mutations acquises dans les gènes *TET* chez l'homme conduisent fréquemment à divers cancers notamment dans les systèmes hématopoïétique et nerveux, justifiant d'un point de vue médical l'intérêt porté à la caractérisation du mode d'action de ces enzymes. Cependant, l'existence d'organismes comme la *Drosophile* dont le génome code pour des enzymes TET tout en étant dépourvu de 5mC suggère l'existence de fonctions supplémentaires pour cette famille d'enzymes. En ce sens, différentes fonctions non-canoniques ont été proposées pour TET, incluant la déméthylation des adénines (6mA) sur l'ADN, l'oxydation des cytosines méthylées sur l'ARN (m5C), et le recrutement d'autres facteurs participant à la régulation de l'expression des gènes comme le complexe Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2).

L'objectif de ma thèse a été de caractériser les fonctions des enzymes TET au-delà de leur capacité à oxyder la marque 5mC en utilisant le système nerveux central larvaire de la *Drosophile* comme système modèle. Mes travaux ont permis de mettre en avant l'importance des fonctions enzymatiques et non-enzymatiques de TET chez cet organisme. Ainsi, j'ai participé à la réévaluation du rôle de TET dans la déméthylation de la marque 6mA, une modification épigénétique dont l'abondance et la fonction chez les métazoaires sont encore sujet à débat. J'ai également entrepris de caractériser l'importance fonctionnelle de l'activité enzymatique de TET par l'étude d'un mutant exprimant une protéine TET dépourvue d'activité catalytique et de caractériser les mécanismes de régulation de la transcription par TET dans le cerveau larvaire. Ces travaux m'ont notamment permis de découvrir un lien inattendu entre TET et le complexe Polycomb Repressive Complex 1 dans l'activation des gènes cibles de TET.

Ainsi, dans un premier chapitre, j'évoquerai rapidement les bases de la régulation de l'expression des gènes codants et aborderai les principaux mécanismes épigénétiques impliqués dans cette régulation, avec un focus sur la méthylation de l'ADN et en particulier les 6mA. Je détaillerai ensuite la structure et le rôle des enzymes TET dans la régulation de

l'expression des gènes, avant de présenter le complexe Polycomb et l'organisation du système nerveux central chez la Drosophile.

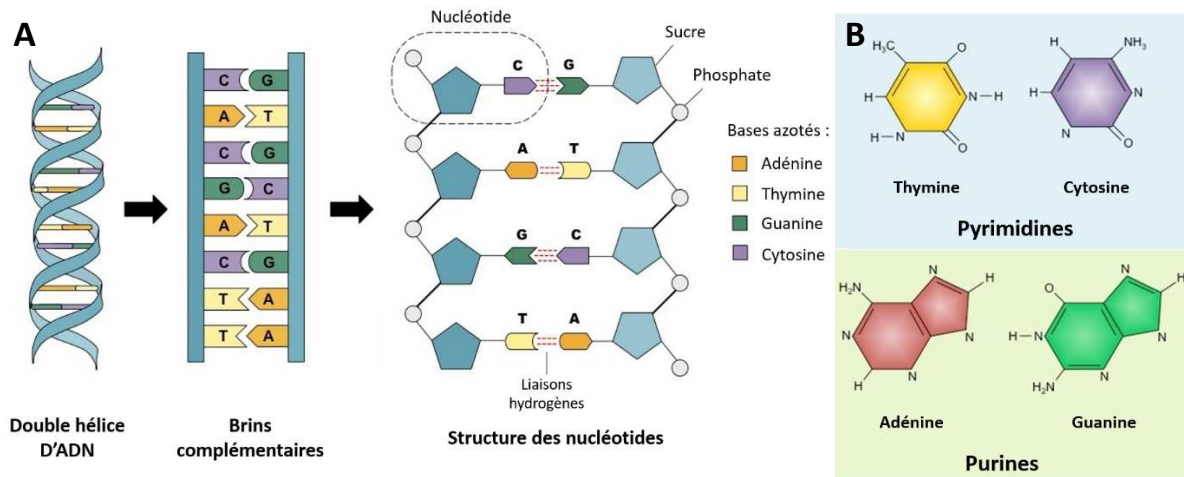


Figure 1. Organisation moléculaire de l'ADN et des nucléotides. (A) L'ADN est une macromolécule ayant la forme d'une double hélice et qui est constituée de nucléotides. (B) Classification et structure atomique des bases purines et pyrimidines constituant l'ADN.

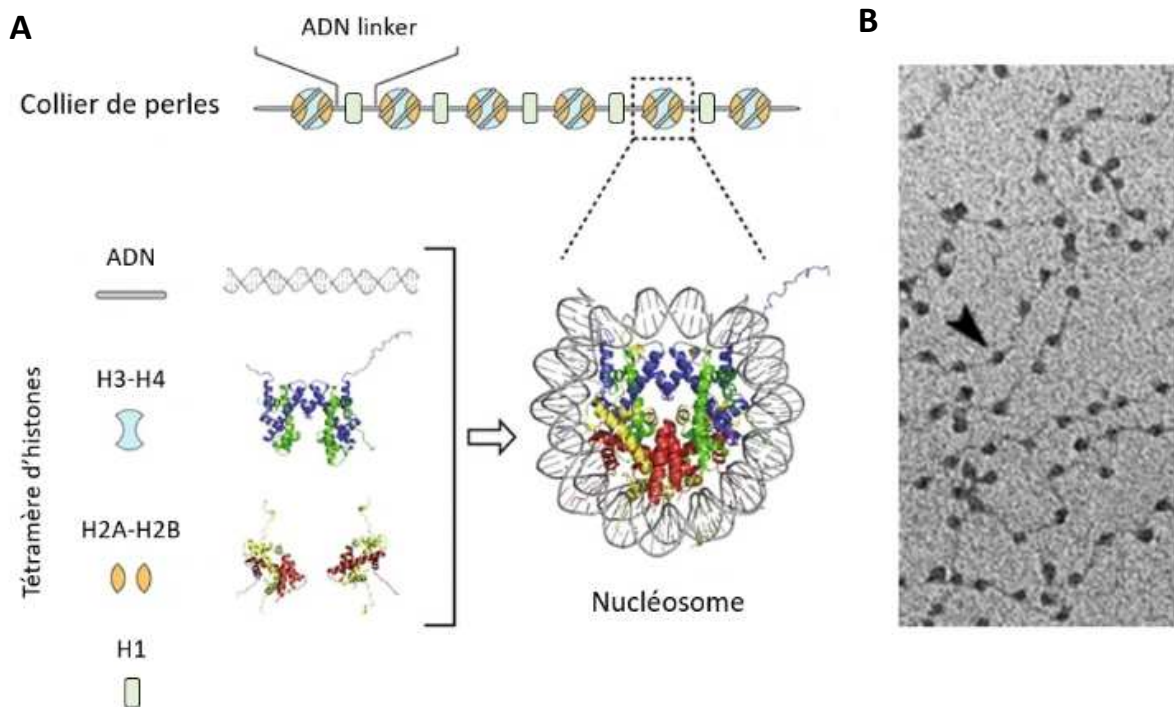


Figure 2. Structure et organisation des nucléosomes. (A) Schématisation de la composition en histones et de l'assemblage des nucléosomes. La structure cristallographique d'un nucléosome entouré par l'ADN est également montrée. (B) Image de microscopie électronique montrant l'ADN compacté sous forme de « collier de perles ». La flèche noire indique un nucléosome.

1. LA REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES

1.1. Organisation du génome eucaryote

L'information génétique d'un organisme est codée par son génome. Représenté par un ensemble de molécules d'ADN (Acide Désoxyribonucléique) (Fig.1) appelés chromosomes, le génome est majoritairement contenu dans le noyau des cellules eucaryotes et code pour toutes les fonctions d'un organisme, de son développement à sa survie et à sa reproduction. Au fil des divisions cellulaires, l'ADN est transmis à chaque cellule de l'organisme qui en contient théoriquement une copie exacte. L'unité fonctionnelle du génome est le gène, une séquence dont l'expression influence un ou plusieurs caractères chez un individu. Plus de 100 000 gènes (codants et non codants) composent le génome humain et le déroulement de l'ensemble des molécules d'ADN d'une cellule humaine représenterait une chaîne d'environ 2m de longueur. Le volume des cellules et de leur noyau étant extrêmement restreint (de l'ordre du micromètre cube), le génome doit donc être très fortement compacté. Au sein du noyau, l'ADN n'est pas nu mais associé à des protéines dont les histones pour former une structure appelée chromatine. Différents niveaux de compaction de la chromatine sont décrits allant du nucléosome au chromosome métaphasique.

Le nucléosome correspond à un assemblage de protéines histones et d'ADN (Fig.2A). Chaque nucléosome se compose d'un cœur de 8 histones, classiquement composé d'homodimères d'histones H2A, H2B, H3 et H4, autour desquels s'enroulent environ 150 paires de bases d'ADN (Arents et al. 1991). Les nucléosomes sont séparés par l'histone de liaison H1. Les histones se composent d'une queue N-terminale qui ne participe pas directement au nucléosome et d'un domaine globulaire C-terminal appelé *histone-fold* qui permet la liaison entre histones. Leurs charges positives permettent la liaison à l'ADN qui est chargé négativement par les groupements phosphates (Luger et al. 1997). Le nucléosome correspond au premier niveau de compaction de l'ADN, et ses répétitions forment une structure dite de « collier de perle » (Fig.2B) (Oudet, Gross-Bellard, et Chambon 1975). Le repliement de cette dernière, grâce à l'histone H1, permet la formation de fibres de chromatine encore plus condensées (Robinson et al. 2006). A noter que d'autres niveaux de compaction moins bien décrits sont également requis pour atteindre une condensation extrême comme celle du chromosome métaphasique observée durant la mitose (Fig.3A) (Belmont 2002). Aussi, plusieurs états de condensation peuvent être observés au sein d'un

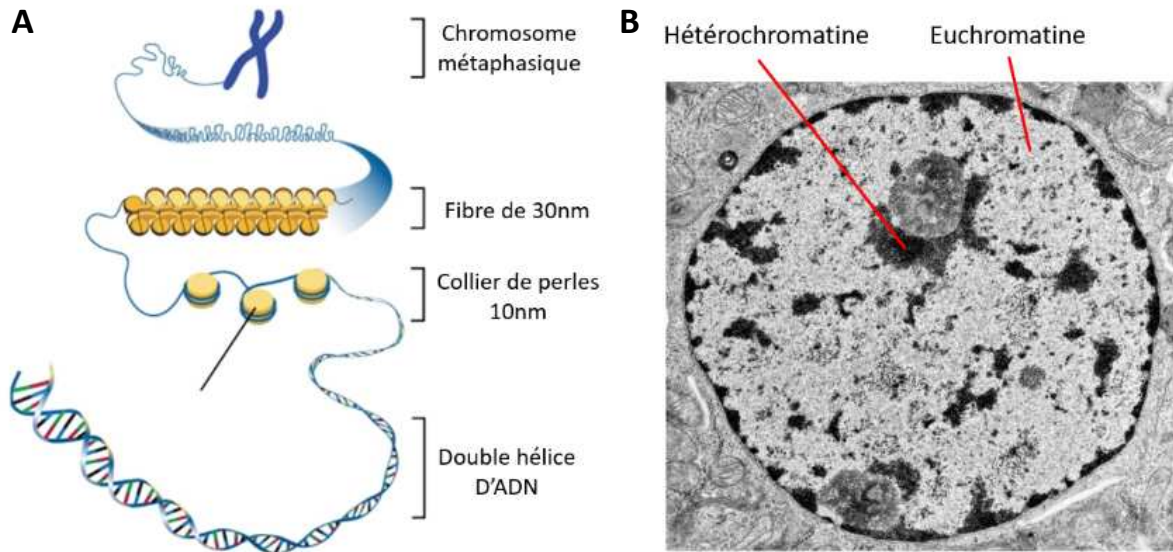
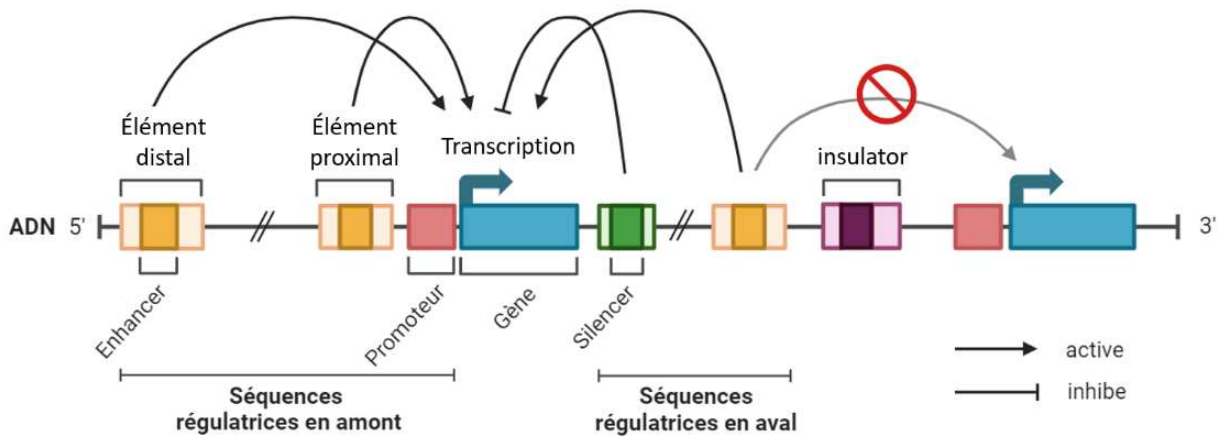


Figure 3. Les différents niveaux de compaction de la chromatine. (A) Représentation schématique des différents états de compaction de l'ADN nu au chromosome métaphasique. (B) Image de microscopie électronique montrant les différents états de la chromatine d'un noyau interphasique. L'hétérochromatine apparaît très sombre par opposition à l'euchromatine qui apparaît très claire.



Figures 4. Les principaux éléments génomiques impliqués dans la régulation de la transcription des gènes. Schéma représentant différents éléments régulateurs en fonction de leur distance et effet par rapport aux gènes cibles. Les effets sur la transcription sont représentés par des flèches.

noyau en interphase (Fig.3B). L'euchromatine constitue une forme peu condensée de la chromatine dans laquelle l'ADN est relativement accessible à la machinerie transcriptionnelle. Par opposition, l'hétérochromatine correspond à une chromatine très condensée et peu accessible. Celle-ci peut être subdivisée en deux catégories : l'hétérochromatine constitutive, la plus condensée, est composée principalement de séquences répétées et d'éléments transposables qui doivent être constamment réprimés, et l'hétérochromatine facultative, plus riche en gènes et dont l'état réprimé est réversible (Jing Liu, Ali, et Zhou 2020). Ces différents niveaux de compaction de la chromatine influencent la fixation de facteurs sur l'ADN, et donc l'expression des gènes.

1.2. Contrôle transcriptionnel et post-transcriptionnel de l'expression des gènes

1.2.1. La transcription et son contrôle

La séquence de l'ADN contient à la fois des gènes, mais aussi des signaux nécessaires à leur régulation, tels que le promoteur, localisé à proximité du site d'initiation de la transcription (TSS pour *Transcription Start Site*), et les éléments *cis*-régulateurs, appelés *enhancers* ou *silencers* lorsqu'ils ont respectivement un effet positif ou négatif sur la transcription (Fig.4) (Heintzman et Ren 2009). La distinction entre ces deux catégories dépend directement des protéines s'y fixant et de leur effet sur la transcription. Ainsi, en fonction du contexte, un *enhancer* peut aussi agir comme *silencer* et inversement (Kolovos et al. 2012). Les éléments régulateurs peuvent agir sur plusieurs gènes qui peuvent également être sous le contrôle de multiples éléments distaux. Enfin, les *insulators* sont des séquences agissant comme des barrières génétiques, empêchant les séquences régulatrices d'agir au-delà de ces régions (Fig.4) (Heintzman et Ren 2009).

La transcription d'un gène chez les eucaryotes implique la fixation sur un promoteur d'une ARN polymérase (ARN Pol I, II ou III selon la nature des gènes), une enzyme chargée de transcrire l'ADN en ARN (Acide Ribonucléique) (Goodrich, Cutler, et Tjian 1996). Plusieurs promoteurs dits alternatifs peuvent contrôler l'expression d'un même gène. Lorsque l'ARN transcrit est traduit en protéine, il s'agit alors d'un ARN messager (ARNm) et sa transcription dépend de l'ARN Pol II, du complexe de pré-initiation (PIC), ainsi que de facteurs de transcription se liant directement à des motifs ADN et qui recrutent des co-régulateurs

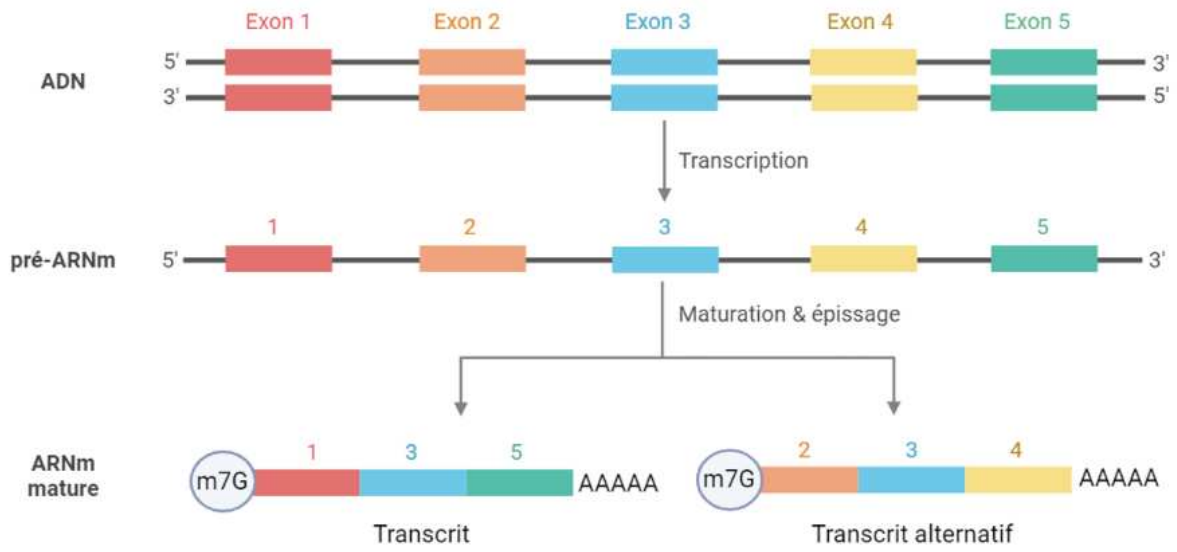
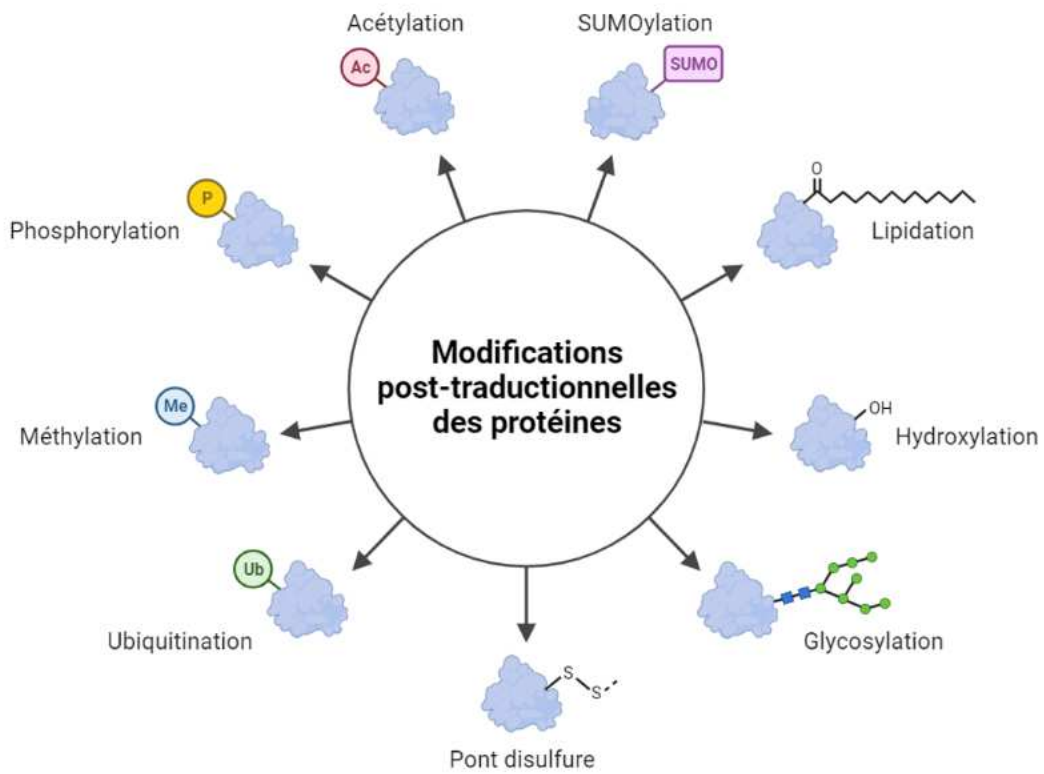


Figure 5. Maturation des ARN messagers. Schéma représentant la maturation et l'épissage alternatif des ARN messagers (ARNm).



Figures 6. Diversité des modifications post-traductionnelles des protéines.

transcriptionnels *via* des interactions protéine-protéine (Sekine et al. 2023). Cependant, il est important de noter que de nombreux gènes, dits non-codants, sont à l'origine de transcrits qui ne sont pas traduits. Différentes classes d'ARN non-codants ont été décrites comme les ARN ribosomiques (ARNr) qui participent à la structure des ribosomes, les ARN de transfert (ARNt) qui sont impliqués dans la traduction, ou les ARN interférents (ARNi) qui participent à la régulation post-transcriptionnelle des gènes. De nombreux autres mécanismes influencent l'expression des gènes au niveau transcriptionnel dont des mécanismes épigénétiques de modification de la chromatine qui seront détaillés plus loin (Chapitre 2).

1.2.2. Du transcrit à la protéine

La transcription d'un gène codant abouti à la synthèse d'un ARN pré-messager, qui va être coiffé d'une guanine méthylée sur son 7^{ème} carbone (m7G-cap) à l'extrémité 5' et polyadénylé en 3'. De plus, un processus d'épissage va conduire à l'élimination de certaines parties de la séquence des pré-ARNm (appelées introns) par le spliceosome, un complexe de nature ribonucléoprotéique (Love et al. 2023). A noter qu'un même messenger peut être épissé de différentes manières, il s'agit de l'épissage alternatif (Fig.5). Enfin, des modifications chimiques se produisent également sur les bases des transcrits. Ces modifications épitranscriptomiques seront brièvement abordées dans un chapitre dédié. Le rôle de l'ensemble de ces processus est de stabiliser l'ARNm, de favoriser son export du noyau vers le cytoplasme, ainsi que sa traduction, et éventuellement de permettre l'expression de différentes isoformes protéiques.

L'export d'un ARNm du noyau vers le cytoplasme conduit généralement à sa prise en charge par les ribosomes, les acteurs de la traduction. Ce processus consiste à convertir la séquence d'un ARN en protéine et fait intervenir les ARNt, dont le rôle canonique est d'apporter les acides aminés à assembler au ribosome. Une grande variété de modifications chimiques peut se produire sur les protéines néo-traduites afin d'en modifier l'activité ou d'en réguler la stabilité, dont notamment la phosphorylation, l'ubiquitination, ou la glycosylation (Fig.6) (Audagnotto et Peraro 2017). Au niveau de la chromatine, les histones subissent de nombreuses modifications post-traductionnelles qui seront détaillées dans les chapitres suivants. Ces modifications déposées essentiellement sur les extrémités N- et (dans une moindre mesure) C-terminale des histones influencent la stabilité du nucléosome, la

compaction de la chromatine, ainsi que la liaison de facteurs recrutés à la chromatine. De ce fait, les modifications post-traductionnelles sont également des acteurs importants de la régulation de l'expression des gènes (Millán-Zambrano et al. 2022).

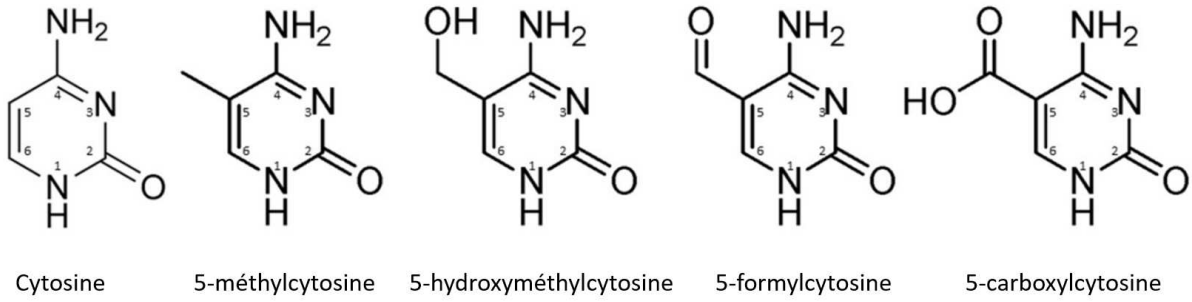


Figure 7. Structure atomique de la cytosine et de ces dérivés modifiés. Les chiffres indiquent le numéro du carbone au sein du cycle aromatique.

2. REGULATIONS EPIGENETIQUES DE L'EXPRESSION DES GENES

L'identité d'une cellule dépend d'un profil d'expression génique spécifique, et l'acquisition de ce patron d'expression dépend lui-même de l'état de la chromatine. Ainsi, des modifications de la chromatine intervenant de manière cellule-spécifique expliquent en partie comment à partir d'un seul et même génome sont obtenues différentes identités cellulaires. En effet, la chromatine peut recevoir des modifications biochimiques qui vont survenir directement sur l'ADN ou sur les facteurs protéiques qui la composent comme les histones. Ces modifications n'altèrent pas la séquence de l'ADN et sont dites épigénétiques.

2.1. Méthylation des cytosines sur l'ADN

2.1.1. Caractéristiques de la 5mC

Parmi les différentes modifications épigénétiques portées par l'ADN, la méthylation des cytosines demeure la plus étudiée. Elle correspond à l'ajout de manière covalente d'un groupement méthyle sur le 5^{ème} carbone de la base pyrimidine, formant une 5-méthylCytosine (5mC) (Fig.7). Chez les mammifères, la marque 5mC est principalement observée en contexte dinucléotidique CpG (cytosine-guanine reliées par un pont phosphate), mais elle peut aussi être présente à une faible fréquence dans les contextes CHG et CHH (ou H correspond à n'importe quelle base sauf G) (S. Feng et al. 2010).

L'identification de la 5mC chez les mammifères remonte à 1948, quand cette marque a été détectée par chromatographie sur de l'ADN de thymus de veau (Hotchkiss 1948). Depuis, la quantification de cette base modifiée à l'échelle du génome entier a montré que son abondance est relativement importante puisqu'elle représente jusqu'à 8% des cytosines de l'ADN de foie de souris par exemple. Cependant sa distribution génomique varie entre différents types cellulaires suggérant une régulation tissu spécifique de cette marque (Varley et al. 2013). Depuis, la marque 5mC a été caractérisée au sein de toute une diversité d'organismes eucaryotes dont les champignons, les plantes, et les animaux (S. Feng et al. 2010).

2.1.2. Dépôt de la méthylation 5mC

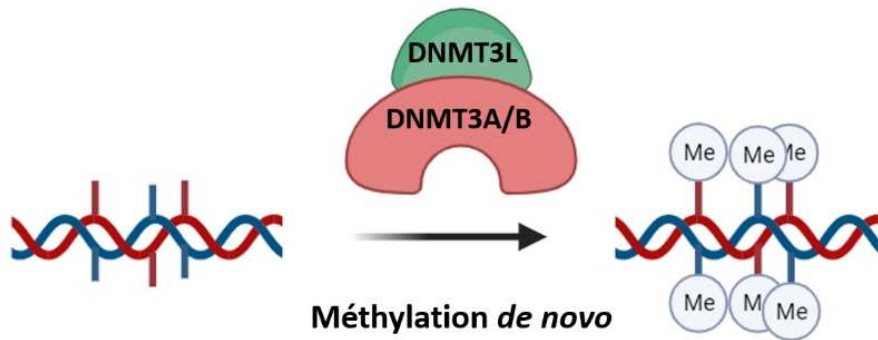
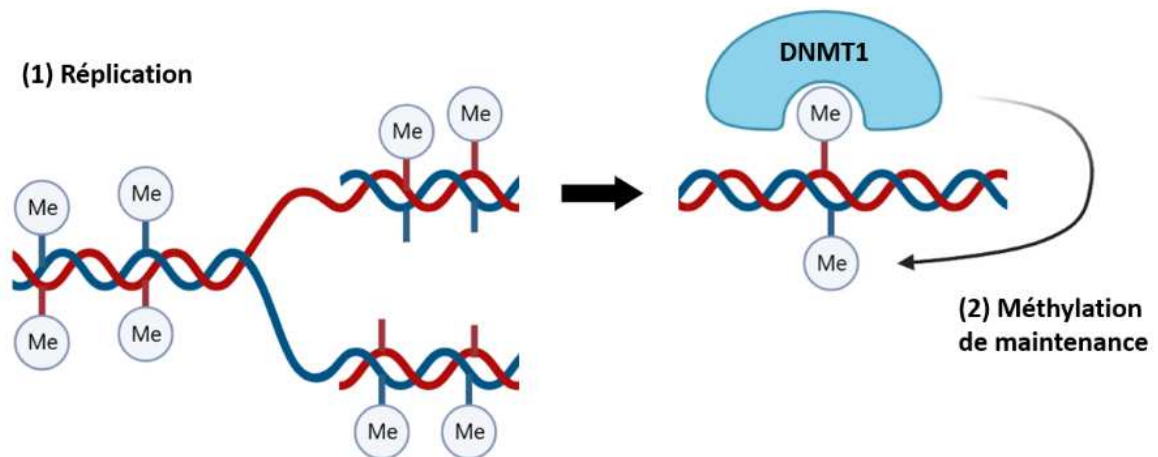
A**B**

Figure 8. Mécanismes de méthylation de l'ADN par les enzymes de la famille DNA méthyltransférase (DNMT). (A) Méthylation *de novo* des cytosines non modifiées par les enzymes DNMT3A/B et L. (B) Méthylation de maintenance par DNMT1. La réplication de l'ADN génère à partir d'ADN méthylé de manière symétrique de l'ADN hémi-méthylé. L'enzyme DNMT1 reconnaît ces sites hémi-méthylés et dépose la méthylation sur le brin néosynthétisé pour restaurer la méthylation de manière symétrique.

Les enzymes DNMT1 et DNMT3A/B sont responsables du dépôt de la marque 5mC chez les animaux (Gowher et Jeltsch 2018). Ces enzymes se lient aux sites CpG et catalysent le dépôt d'un groupement méthyle sur les cytosines vierges. La réaction implique de remplacer un hydrogène par un groupement méthyle provenant du donneur S-Adénosyl-méthionine (J. Li et al. 2021).

Chez les mammifères, la méthylation 5mC est acquise très tôt au cours du développement. C'est à partir du stade blastocyste que les gènes codant les enzymes DNMT3A et 3L sont exprimés, permettant la mise en place du patron de méthylation des cellules somatiques (Fig.8A) (A. Singh, Rappolee, et Ruden 2023). Ce patron de méthylation doit être maintenu tout au long du développement et des divisions cellulaires par des mécanismes de maintenance. A noter que DNMT3L est dépourvue de domaine catalytique, son rôle est d'interagir physiquement avec DNMT3A pour stimuler son activité (Gowher et Jeltsch 2018).

Au cours du cycle cellulaire, seules des cytosines non méthylées sont incorporées lors de la synthèse de l'ADN, aboutissant de ce fait à une dilution passive des cytosines méthylées. L'enzyme DNMT1 est responsable de la méthylation de maintenance en se fixant aux cytosines méthylées sur l'ADN hémiméthylé, c'est-à-dire l'ADN dont les cytosines ne sont méthylées que sur l'un des deux brins, pour déposer un groupement méthyle sur les cytosines non méthylées du brin complémentaire. Ainsi, le brin matrice conserve ses cytosines méthylées alors que le brin néosynthétisé est méthylé par DNMT1 (Fig.8B) (Petryk et al. 2020). A noter qu'il existe une enzyme DNMT2 qui ne présente que peu ou pas d'activité ADN méthyltransférase *in vitro* et qui n'est pas impliquée dans l'établissement ou le maintien de la méthylation de l'ADN *in vivo* (Okano, Xie, et Li 1998), mais qui participe à la méthylation des ARN de transfert (Goll et al. 2006).

2.1.3. Déméthylation de la marque 5mC

Si la réplication de l'ADN peut constituer un mécanisme de déméthylation passif de l'ADN, il existe aussi un mécanisme responsable de la déméthylation active impliquant la famille des protéines *Ten-Eleven Translocation* (TET), largement décrites pour leur activité d'oxydation des 5mC (K. D. Rasmussen et Helin 2016). Les détails concernant la réaction d'oxydation des 5mC ADN par les enzymes TET seront abordés plus en détails dans le chapitre suivant. Par exemple, un évènement de déméthylation majeur survient après la fécondation

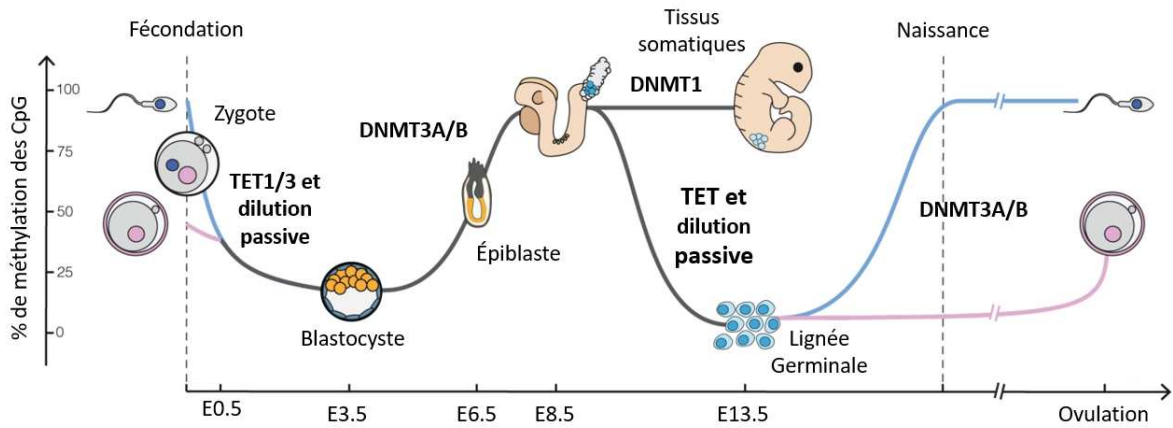
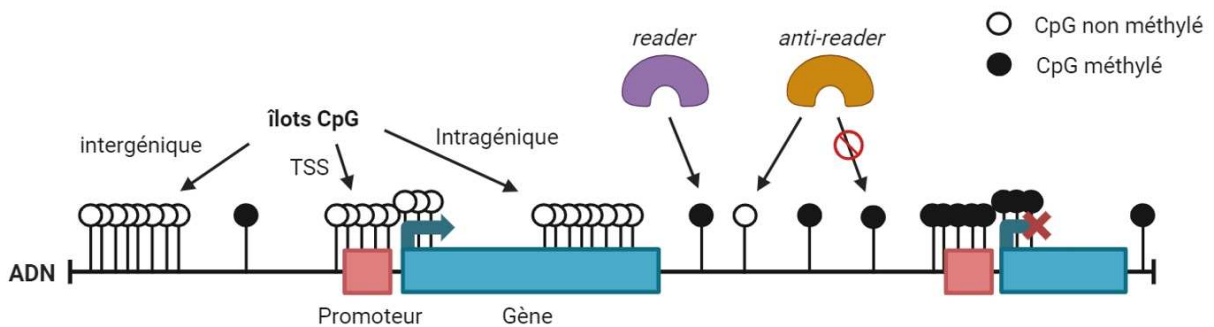


Figure 9. Réécriture du patron de méthylation ADN au cours du développement embryonnaire chez les mammifères. Pourcentage de méthylation des sites CpG au cours du développement embryonnaire chez la souris, et acteurs impliqués dans la méthylation/déméthylation du génome. La ligne grise représente un niveau de méthylation commun aux deux sexes alors que les lignes bleue et rose représentent respectivement le niveau de méthylation du génome chez le mâle et la femelle. E : jour embryonnaire.



Figures 10. Organisation génomique de la marque 5mC et impact sur la transcription. Schéma représentant différentes catégories d'îlots CpG, leur état de méthylation, et l'impact sur le recrutement de facteurs de transcription se liant à l'ADN et sur la transcription des gènes proches.

chez les mammifères (Fig.9). Les génomes maternel et paternel subissent un effacement total de la méthylation ADN dû non seulement aux réplifications successives de l'ADN, mais également à l'activité de TET3. De manière identique, les Cellules Germinales Primordiales (PGC) subissent une autre vague de déméthylation par TET3. La méthylation 5mC est ensuite rétablie au sein des gamètes de manière dépendante de DNMT3A/L respectivement pendant la mise en place des spermatogonies au cours du développement embryonnaire chez le mâle, et au cours de la maturation ovocytaire après la naissance chez la femelle (A. Singh, Rappolee, et Ruden 2023). La méthylation 5mC est donc une marque épigénétique dynamique au cours du développement dont la balance dépend d'une part des enzymes DNMT, et de l'autre de la réplification de l'ADN et des enzymes TET.

2.1.4. Fonctions de la 5mC

La modification 5mC est impliquée dans la régulation de la transcription et dans la stabilité du génome. Sa fonction a historiquement été associée à la répression de l'expression des gènes (Deaton et Bird 2011) et des éléments transposables (Jansz 2019), du fait de la capacité de cette marque à favoriser la liaison des complexes responsables de la répression de la transcription comme les Histones Déacétylases (HDAC) (Sarkar et al. 2011). Au niveau moléculaire, en fonction du contexte, la présence de 5mC sur l'ADN va modifier l'expression des gènes et la structure de la chromatine en régulant la liaison de facteurs de transcription qui vont eux-mêmes recruter des co-répresseurs ou des co-activateurs transcriptionnels. En effet, il existe des protéines qui lient spécifiquement les CpG méthylés (les « *readers* » de la marque) (Fig.10), telles que les protéines qui contiennent un domaine *Methyl-CpG Binding Domain* (MBD) ou les protéines à doigt de zinc de type Cys2His2 de la famille Kaiso/ZBTB (Hodges, Hudson, et Buck-Koehntop 2020). La protéine MeCP2 de la famille MBD va recruter le complexe co-répresseur SIN3A et réprimer la transcription grâce à la sous-unité histone déacétylase de ce complexe (P. L. Jones et al. 1998). De plus, de nombreux facteurs de transcription se lient préférentiellement à des séquences méthylées. Dans le cas des facteurs KAISO et OCT4 par exemple, des expériences de CHIP-seq et d'EMSA montrent une diminution de leur liaison à l'ADN en absence de méthylation ADN (Yin et al. 2017). A l'inverse, certains facteurs de transcription ne sont plus capables de lier les CpG une fois méthylés (les « *anti-readers* » de la marque) (Fig10). C'est notamment le cas de CCCTC-binding factor (CTCF), qui

est impliqué dans l'organisation tridimensionnelle du génome et dont la fixation dépend de la position de la cytosine méthylée sur le motif de liaison à l'ADN (Hashimoto et al. 2017). De même, le facteur de transcription GATA-1 est incapable de se fixer au motif CGATA dont la cytosine est méthylée (L. Yang et al. 2020).

Les îlots CpG correspondent à des séquences fortement enrichies en dinucléotides CpG (Fig.10). Environ 70% des promoteurs des gènes humains se situent à proximité d'îlots CpG, et bien que peu fréquente, leur méthylation est généralement associée à la répression de la transcription des gènes cibles (Fig.10) (E. Li et Zhang 2014). D'autre part, les 5mC participent à la stabilité du génome en réprimant la transcription des éléments transposables, dont la réactivation peut entraîner des mutations suite à leur insertion aléatoire dans le génome, et des éléments péri-centromériques qui, lorsqu'ils sont actifs, favorisent les réarrangements chromosomiques. Cette marque est également impliquée dans la régulation des gènes soumis à l'empreinte parentale et dans l'inactivation du chromosome X (Messerschmidt, Knowles, et Solter 2014). Cependant aucune généralité ne peut en être tirée puisque certains facteurs de transcription sont capables d'activer la transcription de gènes en se liant uniquement à des séquences présentant des cytosines méthylées. Le facteur KLF4 par exemple, est capable d'activer l'activité luciférase d'un transgène exogène en cellules ES uniquement lorsque son motif de liaison à l'ADN est méthylé (Yin et al. 2017). De plus, la présence des 5mC dans le corps des gènes est corrélée à une transcription active et pourrait réguler l'épissage des transcrits et/ou le choix de promoteurs alternatifs (Maunakea et al. 2010).

Des altérations du patron de méthylation ont été recensées dans divers cas pathologiques comme le développement tumoral. Une hypométhylation générale du génome est souvent observée au sein des cellules cancéreuses, accompagnée à l'inverse d'une hyperméthylation des îlots CpG sur les promoteurs (Skvortsova, Stirzaker, et Taberlay 2019). L'hypométhylation de l'ADN dans les cellules cancéreuses est associée à une expression aberrante des éléments transposables et des éléments répétés, conduisant *de facto* à des instabilités génétiques (Gopalakrishnan et al. 2009; Jansz 2019). Concernant l'hyperméthylation des promoteurs, lorsqu'elle se produit sur les promoteurs de gènes suppresseurs de tumeurs, elle favorise le processus oncogénique en inhibant l'expression de ces gènes (Skvortsova, Stirzaker, et Taberlay 2019). A noter que les gènes régulant la méthylation de l'ADN, comme les familles des enzymes DNMT et TET, ou des gènes modulant

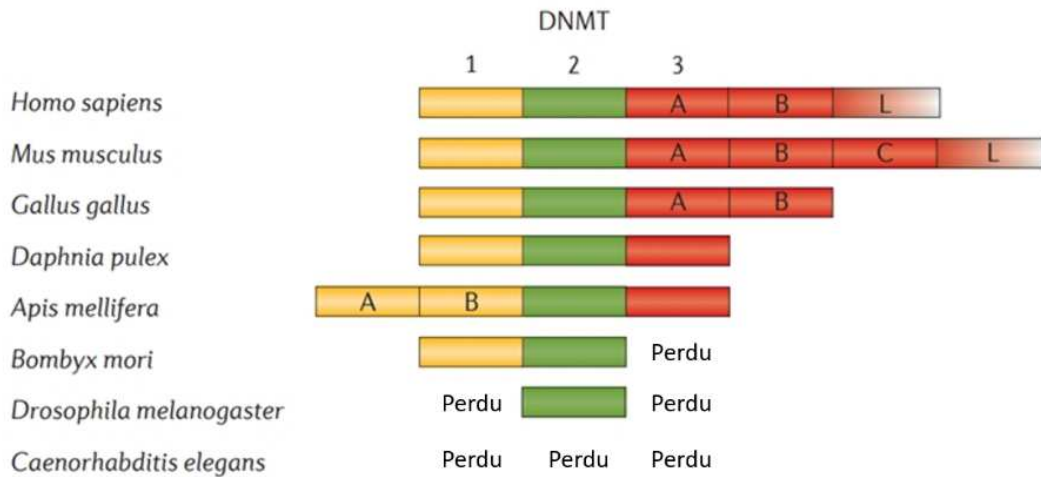


Figure 11. Evolution et conservation des gènes codant pour les enzymes de la famille DNA Méthyltransférase (DNMT). Schéma représentant la présence ou absence des différents gènes DNMT chez une diversité d'espèces. Les paralogues sont représentés d'une même couleur. D'après (Lyko 2018).

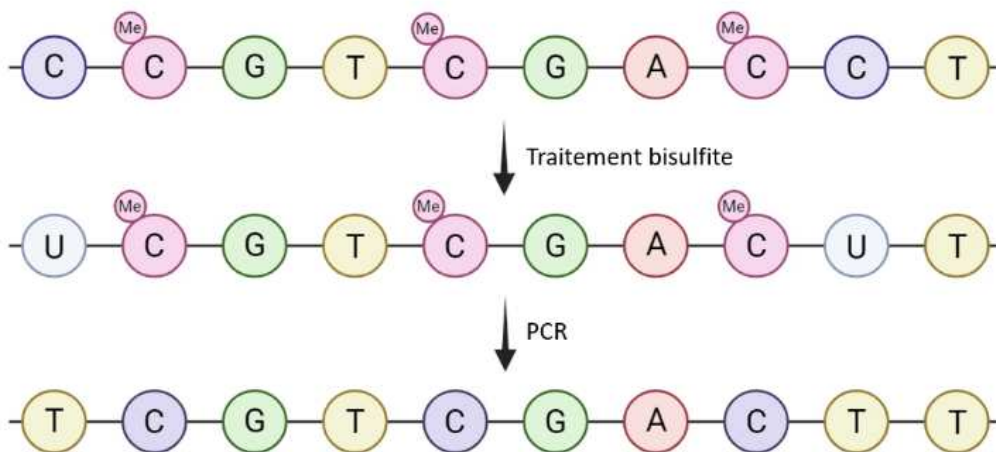


Figure 12. Principe de la technique de traitement de l'ADN au bisulfite. Un traitement bisulfite converti les cytosines en uraciles sans altérer les autres bases ou les cytosines modifiées. L'amplification par *Polymérase Chain Reaction* (PCR) de l'ADN traité convertie ensuite les uraciles en thymine, permettant de différencier les cytosines non méthylées des cytosines méthylées après séquençage.

l'activité des enzymes de ces familles, sont très fréquemment mutés dans les cancers (K. D. Rasmussen et Helin 2016).

Enfin, l'absence de 5mC sur le génome de la levure et d'invertébrés tel que *Drosophila melanogaster* ou *Caenorhabditis elegans*, suggère que les fonctions de la 5mC ne sont pas universelles. Chez la Drosophile plus particulièrement, les enzymes DNMT1 et 3 ont été perdues au cours de l'évolution (Fig.11) (Engelhardt et al. 2022). En accord avec cela, différentes études montrent que les niveaux de 5mC sont faibles (avec un pic à 0.5% dans les phases précoces du développement) (Deshmukh et al. 2018), ou de l'ordre du bruit de fond chez cet invertébré (Bewick et al. 2017; Capuano et al. 2014; E. M. K. Rasmussen et al. 2016; G. Zhang et al. 2015).

2.1.5. Détection de la 5mC

Différentes méthodes ont été développées pour détecter la 5mC (S. Li et Tollefsbol 2021). Premièrement, la spectrométrie de masse permet de quantifier précisément les niveaux de 5mC dans un échantillon d'ADN, néanmoins elle ne donne pas d'indication quant à la position génomique des bases modifiées (Le et al. 2011). Ensuite, les techniques dépendantes d'anticorps permettent d'une part de quantifier les niveaux de 5mC par dot-blot ou par des tests ELISA, mais également de déterminer la position de la marque en combinant des expériences d'immunoprécipitations suivies de Next Generation Sequencing (NGS), bien que l'information positionnelle reste peu résolutive. La position des 5mC peut être déterminée avec plus de précision en combinant traitement bisulfite et NGS (Sasaki et al. 2003). Cette technique consiste à traiter de l'ADN génomique au bisulfite de sodium ce qui a pour effet de convertir les cytosines (C) non méthylées en uraciles (U). Après amplification par Polymerase Chain Reaction (PCR), les uraciles sont convertis en thymines (T), dont les positions peuvent être comparées avec celles d'un génome de référence après séquençage (Fig.12). Il est ainsi possible de déterminer la position des cytosines méthylées (non converties), par rapport aux cytosines non-méthylées (converties en T). Le principal biais de cette technique réside dans la conversion incomplète des cytosines lors du traitement qui peut être à l'origine de faux positifs. Enfin, si les séquençages de 3^{ème} génération, Oxford Nanopore (Simpson et al. 2017) et le Single-Molecule Real-Time sequencing (SMRT-seq) Pacbio (Flusberg et al. 2010) permettent la détection de certaines bases modifiées telles que

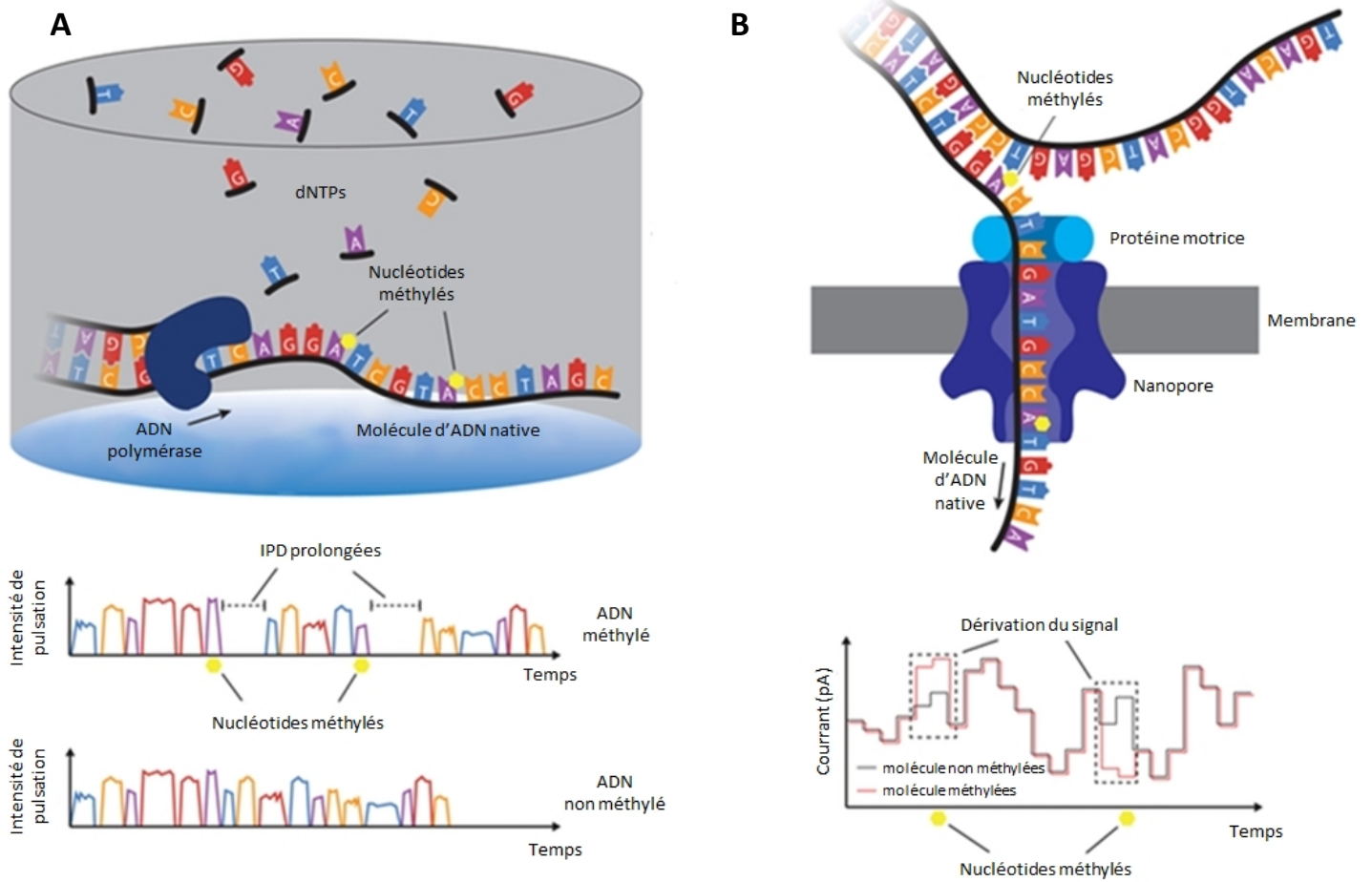


Figure 13. Principe des technologies de séquençage de 3^{ème} génération et détection de bases modifiées. (A) Le *Single Molecule Realtime-sequencing* (SMRT-seq) détecte les nucléotides modifiés sur la base d'une augmentation de l'*interpulse duration*, c'est-à-dire le délai requis à la polymérase pour incorporer un nouveau nucléotide à la molécule d'ADN en cours de synthèse. (B) La technologie de séquençage Oxford Nanopore permet de détecter des nucléotides modifiés sur la base d'une modification de l'intensité du signal électrique produit lors du passage d'une base modifiée dans le nanopore par comparaison au signal produit par une base non modifiée. D'après (Beaulaurier et al. 2019).

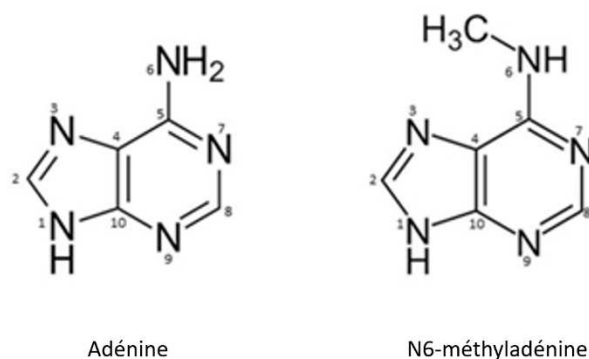


Figure 14. La marque N6-méthyladénosine (6mA). Structure atomique de l'adénine et de son homologue modifié, la marque 6mA. Les chiffres indiquent le numéro de l'atome au sein de la molécule.

les 5mC au nucléotide près (Fig.13), ces techniques ne sont pas encore bien adaptées pour étudier celles-ci quand elles sont présentes à de faibles niveaux.

2.2. Méthylation 6mA sur l'ADN

L'ajout d'un groupement méthyle sur l'azote 6 du cycle purique d'une adénine génère une 6-méthylAdénine (6mA) (Fig.14). Abondante au sein des génomes bactériens, cette marque a également été détectée chez les métazoaires, mais à des niveaux bien plus faibles et sa fonction biologique ainsi que son rôle potentiel de marque épigénétique restent encore très débattus.

2.2.1. La marque 6mA chez les procaryotes

La méthylation des adénines est bien caractérisée chez les procaryotes chez lesquels elle a été découverte (Dunn et Smith 1958). Très abondante, elle représente entre 1 et 3% des adénines totales du génome d'*Escherichia coli* (O'Brown et al. 2019). Elle est décrite pour son rôle dans les systèmes de *Restriction-Modification* (R-M) de défense contre les ADN étrangers (Loenen et al. 2014; Roberts 1980). Brièvement, ce système repose sur des méthyltransférases capables de méthyler le génome hôte de la bactérie, mais pas l'ADN étranger comme celui provenant de bactériophages. La méthylation protège ainsi le génome bactérien des enzymes de restriction responsables de la défense de la bactérie en clivant l'ADN étranger non méthylé. Cette marque est déposée par l'enzyme DNA Adenine Methyltransferase (DAM) ou les enzymes de la famille MT-A70 qui, à l'image des DNMT pour la 5mC, transfèrent un groupement méthyle du donneur S-Adénosyl-méthionine sur l'azote en position 6 d'une adénine. A noter que cette réaction se produit préférentiellement au niveau des sites GATC pour les méthylases DAM (Wion et Casadesús 2006).

La réaction inverse de déméthylation est catalysée par les enzymes de la famille *Alkylation Repair Homolog Protein* (AlkB). Ces dioxygénases dépendantes du fer et du 2-oxoglutarate ont été décrites pour leur rôle dans la réparation de lésions alkylées sur l'ADN et l'ARN (Van Deuren, Plessers, et Robben 2020). La spécificité de ces enzymes est relativement faible puisque AlkB, membre fondateur de cette famille, est également capable de déméthyliser les marques 1mA, 3mC, et 3mT (Trewick et al. 2002). La déméthylation de la 6mA par AlkB

génère un intermédiaire d'oxydation, la N6-hydroxyméthyladénine (6hmA). D'un point de vue structural, ces enzymes sont caractérisées par la présence d'un domaine catalytique contenant un domaine *Double Stranded β Helix* (DSBH) et plusieurs motifs HXD (Histidine-X-Aspartate) assurant la liaison au fer. Ces motifs sont retrouvés chez les enzymes *Jumonji C* (JmjC) qui déméthylent les lysines notamment sur l'histone H3, ainsi que chez les enzymes de la famille TET/JBP qui participent à l'oxydation et la déméthylation des 5mC sur l'ADN (B. Jia et al. 2017).

2.2.2. La marque 6mA chez les eucaryotes unicellulaires et les plantes

Chez certains eucaryotes unicellulaires et champignons, la marque 6mA est retrouvée à des niveaux relativement abondants puisqu'elle peut représenter 2,8% des adénines (Mondo et al. 2017). Chez d'autres protistes, dont les ciliés ou algues vertes unicellulaires, les niveaux de 6mA détectés sont un peu plus faibles (de l'ordre de 0,1 à 0,5% des adénines) (Beh et al. 2019; Y. Fu et al. 2015). Ces taux restent néanmoins relativement élevés, et sont dépendants de l'enzyme MTA1 chez les ciliés. Chez ces organismes, la marque 6mA est enrichie de manière symétrique sur les dinucléotides ApT à proximité des TSS des gènes exprimés. Ainsi, contrairement à la marque 5mC, la méthylation des adénines semble corrélée positivement avec la transcription (Beh et al. 2019).

Chez les plantes dont le riz (*Oryza sativa*) et l'arabette des dames (*Arabidopsis thaliana*), les niveaux de 6mA sont estimés à environ 0,2% (Liang et al. 2018; Zhou et al. 2018). L'enzyme OsALKBH1 de la famille des AlkB présente chez *Oryza sativa* est capable de déméthyliser *in vitro* la marque 6mA, et sa mutation s'accompagne d'une augmentation des taux de 6mA chez cette espèce. Néanmoins aucun phénotype évident n'est observé chez les plantes mutantes. Chez les plantes, la marque 6mA est retrouvée préférentiellement sur des motifs AGG, et tout comme chez les organismes unicellulaires, elle corrèle avec l'activation transcriptionnelle (Q. Zhang et al. 2018).

2.2.3. La marque 6mA chez les métazoaires

2.2.3.1. Chez les invertébrés

Chez les métazoaires, la présence de 6mA a tout d'abord été décrite chez des invertébrés comme *C. elegans* et la Drosophile. La présence de 6mA chez le nématode a été montrée enrichie sur des motifs AGAA et GAGG, très similaires à ceux observés chez les plantes, et à des taux allant de 0,01 à 0,4% (Greer et al. 2015). De plus, les enzymes DNA N6 Adenine Methyltransferase 1 (DAMT-1) et N6-Methyl Adenine Demethylase 1 (NMAD-1), respectivement membre de la famille des MT-A70 et AlkB, ont été assignées au dépôt et à l'effacement de la marque (Greer et al. 2015). Ces résultats ont néanmoins été remis en cause et semblent s'expliquer entre autre par la présence de contaminations bactériennes augmentant drastiquement les niveaux de 6mA détectés par spectrométrie de masse (O'Brown et al. 2019). Il est maintenant admis que la marque 6mA est quasiment indétectable chez *C. elegans*.

Chez la Drosophile, des niveaux très faibles de 6mA ont également été rapportés par différentes études. Ces taux varient au cours du développement, étant de l'ordre de 0,07% dans les toutes premières étapes du développement embryonnaire (avant l'activation du génome zygotique) pour descendre à 0,001% en fin d'embryogénèse et dans les tissus adultes comme le cerveau (Yao et al. 2018; G. Zhang et al. 2015). Ainsi, il a été montré que la fonction de la 6mA chez cet organisme était associée à la répression des éléments transposables dans l'ovaire (Yao et al. 2018), la régulation de l'activation du génome zygotique (S. He et al. 2019), et l'activation transcriptionnelle des gènes neuronaux dans le cerveau adulte (Yao et al. 2018). Pour se faire, la marque 6mA favoriserait la liaison de facteurs de transcription dont Jumeau (Jumu), ou le recrutement de complexes épigénétiques comme le Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) *via* sa sous-unité Polycomb (Pc). Si aucune enzyme responsable du dépôt de cette marque n'a encore été clairement identifiée chez la Drosophile, l'enzyme TET (également appelée DMAD chez la Drosophile pour *DNA 6mA demethylase*) a été assignée à la déméthylation active des 6mA. Ainsi, plusieurs études montrent que la perte de *Tet* s'accompagne d'une augmentation des taux de 6mA (Ismail et al. 2019; Yao et al. 2018; G. Zhang et al. 2015).

2.2.3.2. Chez les mammifères

La présence de 6mA a récemment été mise en évidence dans des tissus et des lignées cellulaires d'origine murine (Boulias et Greer 2022). Les premières études menées chez la

souris ont estimé un pourcentage de 6mA de l'ordre de 0,0001 à 0,001% des adénines totales dans les cellules ES et le cerveau (T. P. Wu et al. 2016; Yao et al. 2017; Kweon et al. 2019). Des taux similaires ont également été mesurés dans différentes lignées cellulaires humaines comme les cellules HEK293T ou Jurkat, ainsi que dans différents tissus chez le rat (Huang et al. 2015). Des taux bien plus élevés ont aussi été décrits comme par exemple dans des cellules sanguines humaines où les taux de 6mA seraient d'environ 0.05% (C.-L. Xiao et al. 2018). Néanmoins ces estimations ont été revues à la baisse au regard de contaminations bactériennes qui biaiseraient les taux de 6mA détectés par LC-MS/MS. Ainsi, plusieurs études n'ont pas détecté la présence de 6mA au sein de divers cellules et tissus dont les cellules souches embryonnaires (ESC) de souris, les cellules HeLa, ou le foie de souris (O'Brown et al. 2019; Schiffers et al. 2017). Ces données suggèrent que si cette marque est présente, elle n'est détectable que dans certains tissus ou lors de stades développementaux particuliers, ou que son taux est inférieur au seuil de détection des technologies actuelles.

L'identité des méthyltransférases et déméthylases éventuellement impliquées dans le métabolisme des 6mA chez les mammifères reste peu claire. Il a notamment été proposé que l'enzyme à domaine MT-A70 methyltransferase like (METTL) 4 pourrait déposer cette marque et les enzymes de la famille AlkB Alkbh1, Alkbh4 et Fat mass and Obesity-associated Protein (FTO) pourraient l'enlever, mais ces résultats restent controversés (Boulias et Greer 2022). D'autres études suggèrent que la présence de 6mA dans l'ADN serait due à l'incorporation « passive » lors de la réplication de l'ADN de ribo-N6-méthyladénosine dérivés de la dégradation des ARN où cette modification est abondante (Musheev et al. 2020). Quelques études se sont concentrées sur l'identification de potentiels *readers* pour la marque. En ce sens, les protéines Additional Sex Combs 1 (ASXL1) et MPN-Domain containing protein (MPND) appartenant au complexe PR-DUB se lieraient préférentiellement à l'ADN méthylé (Kweon et al. 2019). A l'inverse, la présence de 6mA perturberait la liaison de Special AT-Rich Sequence Binding Protein 1 (STAB1) sur la chromatine (Z. Li et al. 2020), et celle du Transcription Factor A Mitochondrial (TFAM) sur l'ADN mitochondrial (Hao et al. 2020).

Enfin, la marque 6mA semble enrichie au niveau de sites GAA, AGG, GAGG, ou GATA, comme montré par des données de DIP-seq ou de SMRT-seq. Cependant, aucune corrélation n'a été établie avec la transcription puisque la marque semble enrichie sur des régions fortement réprimées comme les éléments transposables ou l'hétérochromatine péri-centromérique, mais également sur des régions actives comme les exons de gènes transcrits

(Kweon et al. 2019; C.-L. Xiao et al. 2018). Ainsi, la fonction biologique de cette modification reste très largement à déterminer (Boulias et Greer 2022).

2.2.4. Remise en cause du 6mA ADN chez les métazoaires

La présence et le rôle de la marque 6mA sur l'ADN chez les métazoaires restent aujourd'hui fortement controversés en raison des nombreux biais associés aux techniques utilisées pour étudier cette marque épigénétique (Boulias et Greer 2022). À ce jour, différentes pratiques expérimentales similaires à celles utilisées pour la méthylation 5mC sont conventionnellement utilisées pour détecter cette marque.

La première, l'immunoprécipitation d'ADN, repose sur l'utilisation d'un anticorps reconnaissant la méthylation 6mA pour immunoprécipiter les fragments d'ADN présentant cette modification. L'objectif est ensuite soit d'amplifier des régions génomiques spécifiques par PCR quantitative (DIP-qPCR), soit de séquencer l'ADN obtenu par séquençage à haut débit (DIP-seq) pour obtenir le profil génomique global de la présence de la marque 6mA. Cependant, la plupart du temps, la spécificité des anticorps anti-6mA ADN est très insuffisante en raison de leur affinité non négligeable pour les adénines non modifiées qui ne permet pas de les utiliser avec confiance pour des taux de 6mA/A très faibles comme ceux mesurés dans les génomes des métazoaires (Bochtler et Fernandes 2021). Par ailleurs, le profil génomique de 6mA obtenu par DIP-seq a été corrélé à différentes séquences répétées dont des séquences satellites, des *Short et Long Tandem Repeat* (STR/LTR), certains éléments transposables tels que les *Long Interspersed Nuclear Elements* (LINE), ou encore les centromères et télomères (G. Zhang et al. 2015). Ces séquences sont difficiles à aligner sur le génome en raison d'un important niveau de répétition et ont été détectées en abondance dans des échantillons contrôles d'ADN génomique non méthylé, ou immunoprécipités par un anticorps contrôle (souvent un anti-IgG). Elles représentent de ce fait des artefacts classiquement retrouvés lors de ce type d'expérience et nécessitent d'être analysées avec prudence (Douvlataniotis et al. 2020).

Une autre approche permettant de s'affranchir de l'utilisation d'anticorps est le SMRT-seq. Cette technique de séquençage permet non seulement de déterminer la séquence d'ADN par la mesure de la fluorescence générée suite à l'incorporation d'une base au cours de la réaction de réplication, mais également la nature des bases modifiées par la mesure de

l'intervalle de temps entre l'incorporation de deux nucléotides (IPD pour *Inter-Pulse Duration*) (Flusberg et al. 2010). En effet, les valeurs d'IPD varient quand la polymérase qui recopie (« séquence ») l'ADN rencontre une base modifiée. Cette technique permet de localiser les 6mA à la base près. Cependant, le niveau extrêmement bas de méthylation 6mA dans les génomes conduit à des taux de faux positifs (FDR pour *False Discovery Rate*) élevés (O'Brown et al. 2019).

De plus, des techniques de conversion chimique des adénines non modifiées similaires au traitement bisulfite ont été mises au point très récemment. Le traitement de l'ADN au nitrite combiné au séquençage (NT-seq) permet de convertir les adénines non méthylées en inosines par déamination. Cette base peut se lier à une cytosine par complémentarité et être lue comme guanosine lors du séquençage à haut débit (Xuwen Li et al. 2022). A l'image du séquençage après traitement au bisulfite pour les 5mC, cette technique souffre de la présence de faux positifs dus à la conversion incomplète des adénines non modifiées qui rend son utilisation encore hasardeuse pour des génomes avec peu de 6mA comme ceux des métazoaires.

D'autres procédés expérimentaux permettant cette fois-ci de quantifier le niveau global de 6mA dans un échantillon sont le Dot-Blot et la spectrométrie de masse. Le Dot-Blot consiste à détecter la présence de 6mA dans un échantillon d'ADN déposé sur une membrane *via* un anticorps spécifique de la marque d'intérêt. De ce fait, comme évoqué ci-dessus, cette technique dépendante d'anticorps souffre également d'un biais de spécificité. Elle est aussi assez peu sensible. En revanche, la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (UHPL-MS/MS pour « *ultra high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry* ») permet de détecter de manière sûre et quantitative les adénines méthylées et de les différencier des adénines non méthylées, même dans des échantillons contenant des taux très faibles de 6mA (~0.00001%). Cependant la moindre trace d'ADN bactérien, riche en 6mA, peut contaminer la préparation des échantillons et fausser les résultats (Kong et al. 2022). Ces contaminations sont fréquentes et retrouvées dans les cultures cellulaires, chez des animaux entretenus dans un environnement non stérile, ou dues à des traitements effectués avec des produits synthétisés en système bactérien tels que les enzymes couramment utilisées pour la digestion de l'ADN en nucléoside lors des expériences de UHPL-MS/MS. Ainsi, l'étude de la méthylation des adénines reste

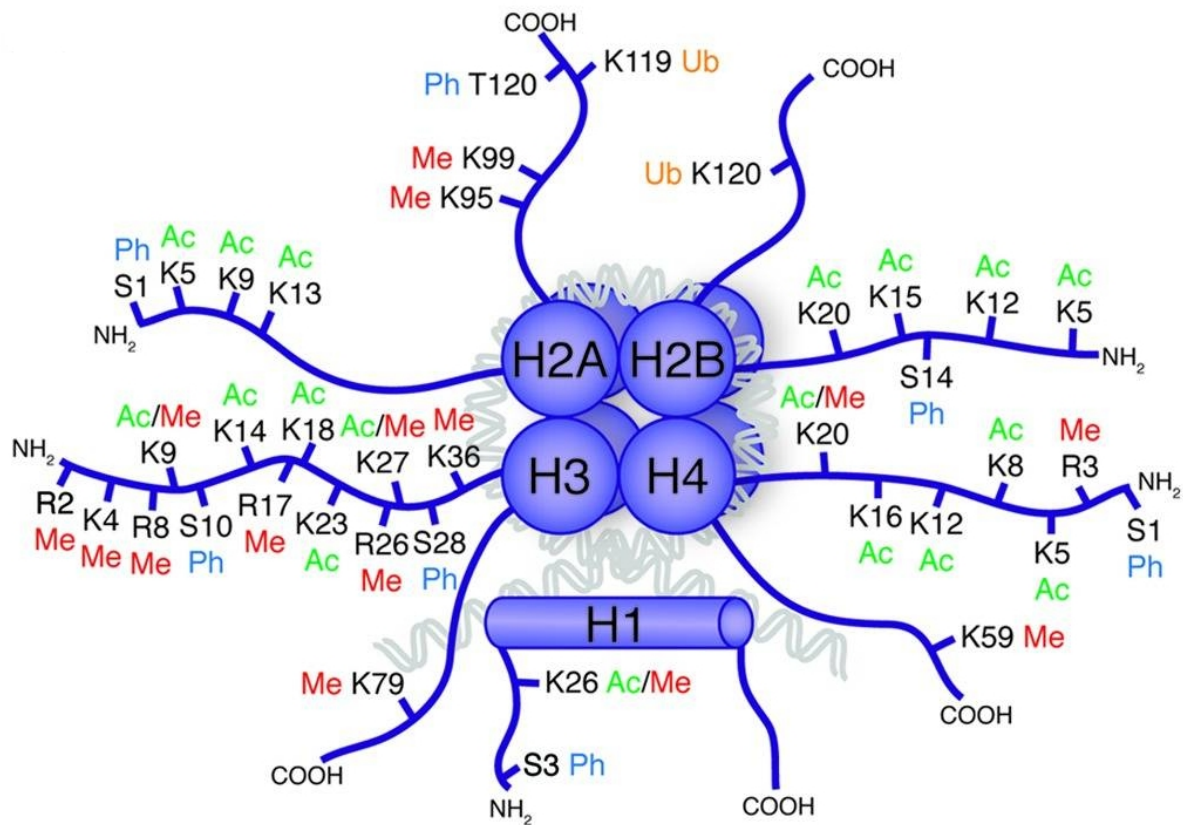


Figure 15. Diversité des modifications post-traductionnelles des histones. Schéma représentant les principales modifications chimiques se produisant sur les parties N et C-terminale des histones. Me : méthylation ; Ac : acétylation ; Ph : phosphorylation ; Ub : ubiquitination ; K : lysine ; R : arginine ; S : sérine ; T : thréonine. D'après (Tollervey et Lunyak 2012).

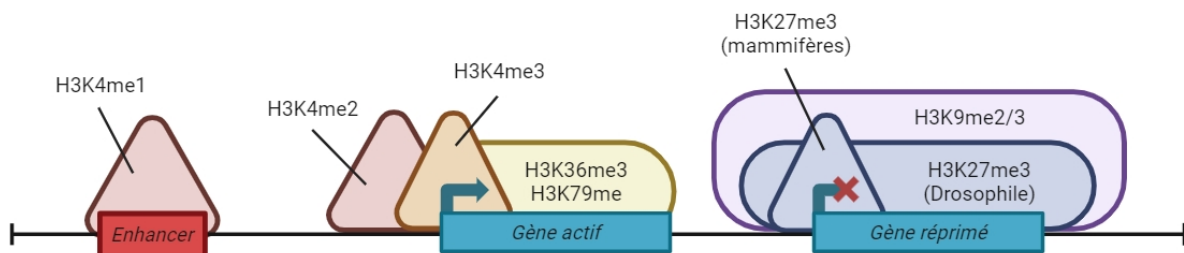


Figure 16. Localisation génomique des principaux résidus lysines pouvant être méthylés sur l'histone H3. La méthylation des lysines de l'histone H3 est associée à des annotations génomiques ou des états de transcription particuliers.

difficile car elle nécessite des contrôles adaptés à l'approche expérimentale employée et souvent inhabituels (Douvlataniotis et al. 2020).

2.3. Modifications post-traductionnelles des histones

Les modifications post-traductionnelles se produisant majoritairement sur la queue N-terminale des histones influencent la compaction de la chromatine et le recrutement de protéines dont certains facteurs de transcription et enzymes épigénétiques. Ces modifications sont réversibles et donc dynamiques. Leur rôle est crucial pour le contrôle de l'expression des gènes, mais également dans d'autres processus biologiques comme la réplication de l'ADN, la réparation des dommages à l'ADN, ou la mitose. Les modifications les plus fréquentes et les plus étudiées sont la méthylation, l'acétylation, l'ubiquitination, et la phosphorylation (Fig.15), mais une grande variété d'autres modifications a été également décrite incluant la sumoylation, la glycosylation ou la crotonylation pour n'en citer que quelques-unes (Millán-Zambrano et al. 2022).

2.3.1. Méthylation des histones

La méthylation des histones se produit sur les lysines (K) et sur les arginines (R). Les enzymes responsables du dépôt de cette marque sont les Histones méthyl transférases (HMT) qui transfèrent un groupement méthyle depuis la S-Adénosyl-méthionine. Les lysines méthyltransférase possèdent généralement un domaine catalytique de type SET (*Su(var)3-9, Enhancer of zeste and Tritorax*) (B. Xiao, Wilson, et Gamblin 2003). De manière intéressante, les lysines peuvent accepter un ou plusieurs groupements méthyles et être mono-, di-, ou triméthylées. En fonction des lysines ciblées et de leur niveau de méthylation, elles sont associées à différents états de la chromatine. Sur l'histone H3, les sites de méthylation positivement corrélés à la transcription sont les lysines 4, 36 et 79, alors que la méthylation des lysines 9 et 27 corrèle négativement avec la transcription (Morgan et Shilatifard 2020). Des analyses d'immunoprécipitation de chromatine couplée au séquençage à haut débit (ChIP-seq) ont permis de cartographier la présence des différentes marques sur l'ensemble du génome (Fig.16). Ainsi, concernant les marques permissives, la marque H3K4me1 a été décrite comme généralement enrichie sur les *enhancers*, H3K4me2 s'étend autour des promoteurs

actifs et forme des pics autour des promoteurs réprimés, alors que H3K4me3 est retrouvée au niveau des promoteurs et colocalise avec l'ARN Pol II activée (phosphorylée sur sa sérine 5) (Heintzman et al. 2007). H3K36me3 est présente sur les corps des gènes actifs et marque l'élongation de la transcription (Bannister et al. 2005). Enfin, H3K79me est déposée par DOT1, dépourvue de domaine SET, sur le corps des gènes (Ng et al. 2002). Concernant les marques répressives, H3K9me2/3 est déposée par SUV39H1 chez les mammifères, et est enrichie sur les gènes réprimés dans l'hétérochromatine (Grewal 2023). La marque H3K27me3 est associée à l'activité de PRC2 puisqu'elle est déposée par l'enzyme Enhancer of zeste (E(z)) et assure la répression transcriptionnelle des gènes (Trojer et Reinberg 2007). Cette marque est retrouvée généralement au niveau des promoteurs des gènes réprimés chez les mammifères, et forme chez la drosophile de larges domaines (ou *loci*) recouvrant et réprimant plusieurs gènes (Schuettengruber et al. 2009).

Les protéines contenant des domaines tudor, chromator ou PHD (*plant homeodomain*) peuvent se lier de manière spécifique aux lysines méthylées (Cosgrove 2012). C'est le cas du complexe de remodelages de la chromatine Nucleosome Remodeling Factor (NURF) dont la sous-unité Bromodomain PHD finger Transcription Factor (BPTF) reconnaît H3K4me3, ou de complexes impliqués dans la répression des gènes telle que la protéine Pc du complexe PRC1 qui se lie à H3K27me3 ou encore de Heterochromatin Protein 1 (HP1) qui se fixe sur H3K9me2/3. Enfin, la méthylation des lysines peut être reconnue par des déméthylases comme les enzymes de la famille Lysine Demethylase 1 (KDM1). C'est la cas de JARID1 qui enlève la méthylation de H3K4me2/3, ou les enzymes de la famille *Jumonji C* (JmjC) dont UTX qui déméthyle H3K27me3 (Pedersen et Helin 2010).

Enfin, les enzymes de la famille des Protein Arginine Methyltransferases (PRMT) assurent la méthylation des arginines sur une grande variété de protéines incluant les histones. A ce jour, neuf membres sont clairement identifiés et divisés en 3 catégories en fonction de leur activité catalytique (Blanc et Richard 2017). Les enzymes de type I, dont le membre fondateur est PRMT1, déposent la diméthylation asymétrique (me2a) alors que les enzymes de type II dont PRMT5 est le principal représentant assurent le dépôt de la diméthylation symétrique (me2s). PRMT7 est à ce jour la seule enzyme de type III et n'est que capable de monométyler ses cibles. Brièvement, les effets de la méthylation des arginines sur les histones sur la transcription sont variables, puisqu'il a été montré par exemple que la méthylation H4R3me2a par PRMT1 corrèle avec le recrutement du complexe p300/CREB-

binding protein (CBP) (An, Kim, et Roeder 2004). A l'inverse, la méthylation H3R3/8me2s par PRMT5 et H3R2me2a par PRMT6 empêche la fixation de Mixed Lineage Leukemia (MLL), antagonisant le dépôt de H3K4me3 (Guccione et al. 2007). A ce jour, les enzymes responsables de l'effacement de cette marque ne sont pas encore identifiées.

2.3.2. Acétylation des histones

L'acétylation des histones ne se produit que sur des lysines et est dynamiquement régulées par deux classes d'enzymes. Les Histone Acetyl Transferases (HAT) qui assurent le dépôt de la marque par opposition aux Histone Deacetylases (HDAC) qui sont responsables de son effacement. L'acétylation est associée à la décondensation des nucléosomes et est donc généralement corrélée à l'activation transcriptionnelle. Cette marque est enrichie au niveau des promoteurs des gènes transcrits et des *enhancers* actifs. Trois grandes familles de HAT sont décrites à ce jour : Gnc5-related Acetyl Transferases (GNAT), MYST (pour MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2, Tip60), et p300/CBP. Les protéines pouvant reconnaître cette marque sont caractérisées par la présence d'un bromodomaine. De nombreuses HDAC ont été identifiées, 18 chez l'Homme dont 5 également retrouvées chez la Drosophile. Elles font souvent partie de complexes multiprotéiques comme Sin3, Nucleosome Remodeling and Deacetylase (NuRD) et CoREST. Le résidu acétylé le plus étudié pour son implication dans la régulation de la transcription correspond à la marque H3K27ac (Zentner et Henikoff 2013), bien que d'autres marques aient également été décrites comme H3K9ac qui antagonise la marque H3K9me3 (Gates et al. 2017) ou H4K16ac qui est notamment impliquée dans la compensation de dose du chromosome X chez la Drosophile (Kind et al. 2008).

2.3.3. Ubiquitination des histones

L'ubiquitine est un peptide de 76 acides aminés (environ 8kDa) dont la fixation peut être catalysée sur des protéines par l'action concertée de 3 groupes d'enzyme. Une enzyme d'activation E1, une enzyme de conjugaison E2, et une enzyme de liaison E3 sont nécessaires à cette réaction (Pickart et Eddins 2004). Dans le cas des histones, la mono-ubiquitination se produit sur la lysine 119 (118 chez la Drosophile) de H2A et sur la lysine 120 de H2B. A noter que ces marques sont associées non pas à la dégradation des protéines par le protéasome

(comme c'est le cas suite à la polyubiquitination de nombreuses protéines), mais à la régulation de la transcription.

En règle générale, la marque H2AK118/119ub est associée à la répression transcriptionnelle (H. Wang et al. 2004) alors que la marque H2BK120ub corrèle avec son activation (Nickel, Allis, et Davie 1989). H2AK118/119ub est déposée par la protéine Really Interesting New Gene 1A/B (RING1A/B) chez les mammifères (dRING chez la Drosophile), une sous-unité fondamentale du complexe PRC1, et est donc retrouvée dans les domaines réprimés, mais également sur des *enhancers*. Elle est effacée par le complexe Polycomb Repressive-Deubiquitinase (PR-DUB) et plus précisément par l'enzyme BRCA1 associated protein-1 (BAP1) chez les mammifères (Calypso chez la Drosophile) (Scheuermann, Gutiérrez, et Müller 2012). Concernant H2BK120ub, elle est catalysée par les ubiquitines ligases Radiation sensitive 6/Brefeldin A sensitivity 1 (Rad6/Bre1) chez la levure (UBE2A/B et RNF20/40 chez l'homme) (Kao et al. 2004; Wood et al. 2003), et peut être éliminée par Scrawny (Scny/dUSP36) chez la Drosophile (Buszczak, Paterno, et Spradling 2009).

2.3.4. Phosphorylation des histones

La phosphorylation des histones, par l'apport d'une charge négative, est supposée réduire la liaison entre l'ADN et les histones et donc déstabiliser le nucléosome. De ce fait, cette marque est prédisposée à favoriser la décondensation de la chromatine et l'activation transcriptionnelle (Millán-Zambrano et al. 2022). Elle est déposée sur des résidus sérine, thréonine ou tyrosine par des kinases et retirée par des phosphatases. En plus de son effet transcriptionnel, la phosphorylation des histones a été décrite dans d'autres phénomènes. La phosphorylation du variant d'histone H2A.X sur sa sérine 139 par la kinase ATM/ATR survient à proximité des cassures double brin de l'ADN pour favoriser le recrutement de la machinerie de réparation et induire une réponse adaptée (Paull et al. 2000). Un autre phénomène documenté est la phosphorylation de l'histone H3 sur sa sérine 10 qui est requise, d'une part pour l'entrée de la cellule en mitose en participant à la condensation des chromosomes, et d'une autre pour l'activation transcriptionnelle pendant l'interphase (Nowak et Corces 2004). Enfin, la phosphorylation des histones affecte le recrutement d'autres facteurs protéiques à la chromatine. Par exemple, la liaison de HP1 sur H3K9me3 (Hirota et al. 2005) ainsi que celle

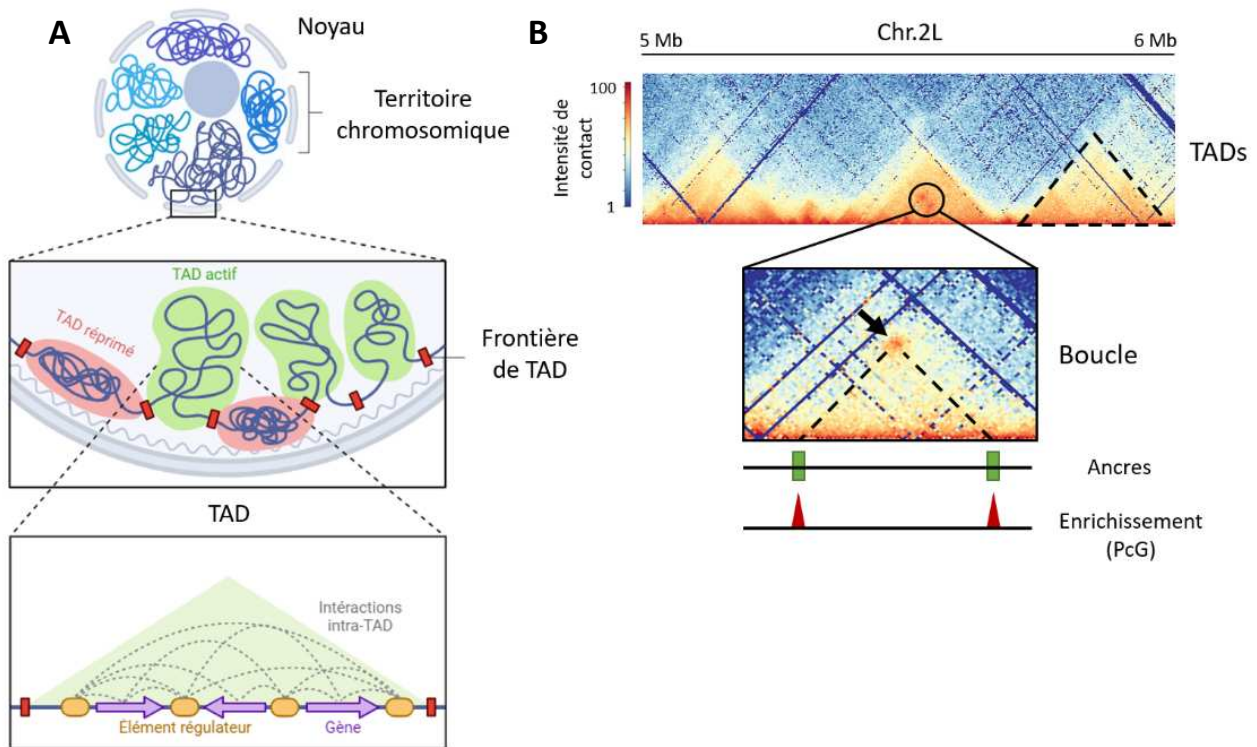


Figure 17. Architecture tri-dimensionnelle du génome. (A) Schématisation des différents niveaux d'organisation 3D du génome. Au sein du noyau, les chromosomes sont organisés en territoires distincts, les territoires chromosomiques. Ces territoires se composent de *Topology Associated Domains* (TADs), séparés par des frontières enrichies en éléments *insulators*. Au sein d'un TAD, l'activité transcriptionnelle est majoritairement réprimée (TAD réprimé) ou active (TAD actif). Chaque TAD est caractérisé par d'intenses interactions physiques entre éléments régulateurs (arcs en pointillés gris). (B) Captures montrant la structure 3D du génome par HiC sur une portion du bras gauche du chromosome (Chr.2L) de la Drosophile. La capture du haut montre les TADs, l'un d'entre eux étant délimité par un triangle en pointillés noirs. La capture du bas montre un enrichissement ponctuel d'interactions ADN-ADN correspondant à une boucle Polycomb (flèche noire). Les ancrs de la boucle et l'enrichissement en protéines du groupe Polycomb sont représentés schématiquement.

de PRC1 sur H3K27me3 est réduite lorsque la marque H3S28P est présente (Gehani et al. 2010).

2.4. Topologie du génome

L'organisation tridimensionnelle de la chromatine a également été montrée comme importante pour la régulation de l'expression des gènes, notamment par le rapprochement physique de portions d'ADN entre-elles (Mohanta, Mishra, et Al-Harrasi 2021). Ainsi, différents domaines génomiques de grande taille (de l'ordre de la Mb) sont plus fréquemment associés entre eux plutôt qu'avec d'autres, il s'agit des Domaines Topologiques Associés (TAD) (Fig.17A-B) (Dixon et al. 2012). Les interactions ADN-ADN sont plus intenses et préférentielles au sein d'un même TAD. Chaque TAD est délimité par des *insulators* sur lesquelles se fixent des facteurs comme CTCF, Boundary element-associated factor of 32kD (BEAF-32) ou Centrosomal protein 190kD (CP190), et dont la fonction est de prévenir les interactions inter-TADS. Ces frontières inter-TAD sont également marquées par une activité transcriptionnelle abondante (da Costa-Nunes et Noordermeer 2023).

Un autre niveau de structuration tridimensionnelle du génome correspond aux boucles ADN, également appelées boucles Polycomb chez la Drosophile (Eagen, Aiden, et Kornberg 2017). Il s'agit d'interactions « longues distances » entre deux séquences ADN pouvant être séparées par plusieurs dizaines de kb (Fig.17B). La fonction de ses boucles, dont les ancrs sont notamment enrichies en marques permissives comme H3K27ac, en protéines du groupe Polycomb, ainsi qu'en divers facteurs de transcription, serait de rapprocher des éléments régulateurs et des promoteurs pour activer ou réprimer la transcription des gènes à proximité (Loubiere et al. 2020; Ogiyama et al. 2018).

2.5. Les modifications épitranscriptomiques

2.5.1. Diversité des marques

Suite à leur transcription, les ARN subissent sur leurs bases des modifications chimiques qui influencent leur structure, leurs interactions, leur localisation, ou leur stabilité. Plus de 150 modifications différentes ont été identifiées au sein des différentes classes d'ARN et

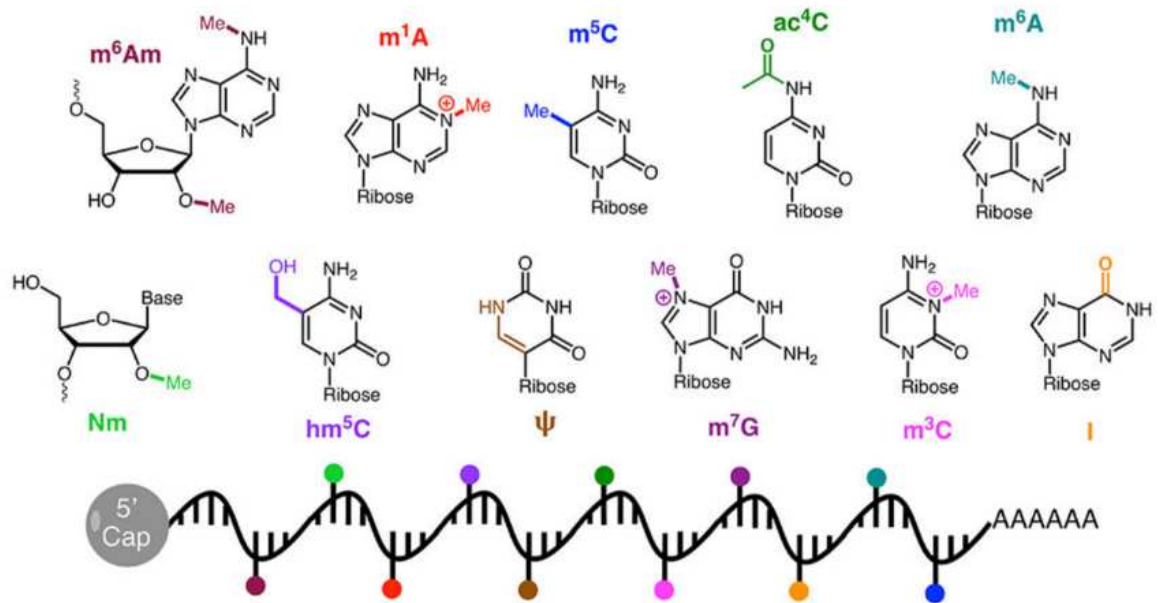


Figure 18. Diversité des modifications épitranscriptomiques. Structure atomique de différentes bases modifiées de l'ARN avec en couleur les principales modifications chimiques identifiées. D'après (Seo et Kleiner 2021).

constituent un répertoire épitranscriptomique apportant de la complexité à la régulation des ARN, même si la fonction ou l'impact de la plupart de ces modifications sur le métabolisme des ARN reste inconnu (Seo et Kleiner 2021). Les modifications épitranscriptomiques les mieux étudiées correspondent à celles des ARNt et des ARNr, due à la grande quantité de ces transcrits dans la cellule ainsi qu'à la forte abondance des modifications sur ces ARN (Suzuki 2021; Sharma et Entian 2022). A l'inverse, les modifications sur les ARNm et leur impact fonctionnel sont à ce jour largement moins décrites, mais elles font l'objet d'un intérêt croissant (Gilbert et Nachtergaele 2023). Les avancées technologiques en matière de séquençage de dernière génération des ARN ont en particulier permis de détecter et localiser différentes modifications sur les messagers (Jinghui Song et Yi 2020). Parmi elles sont recensées entre autres : les marques N6-méthyladénosine (m6A), pseudouridine (Ψ), N1-méthyladénosine (m1A), 5-méthylcytidine (m5C), 5-hydroxyméthylcytidine (hm5C), N4-acétylcytidine (ac4C), N7-méthylguanosine (m7G) et inosine (I) (Fig.18). Nous aborderons ci-dessous la modification m6A, très abondante et la plus étudiée, ainsi que m5C, qui a été associée aux enzymes TET.

2.5.2. La marque m6A

La marque m6A a été la première à être cartographiée à l'échelle du transcriptome. Elle est également la modification la plus importante sur les ARNm, représentant environ 0,1% à 0,4% des adénosines totales en cellules HeLa, et est déposée par un complexe contenant les enzymes METTL3 et 14 (Jianzhao Liu et al. 2014). La m6A est une marque réversible et dynamique puisqu'elle peut également être éliminée par l'oxydation induite par les dioxygénases FTO (G. Jia et al. 2011) et ALKBH5 (Zheng et al. 2013), chacune dépendante du 2-oxoglutarate et du fer. Différentes études montrent l'impact de la m6A sur la maturation, la stabilité, l'épissage, l'export nucléaire et l'efficacité de traduction des ARNm. La plupart de ces rôles semblent médiés par l'influence que cette modification a sur la liaison entre les ARNm et des protéines capables de s'y lier (Akhtar, Lugoboni, et Junion 2021). Les protéines contenant un domaine de type *YTH521-B homology* (YTH) comme YTHDF2 et YTHDF3 ont été les premières à être identifiées comme *readers* de la m6A, c'est-à-dire capable de reconnaître et se lier spécifiquement à ce substrat (Dominissini et al. 2012). A l'inverse, la protéine de

granule de stress G3BP1 a été identifiée comme *anti-reader* de la m6A puisque sa liaison à l'ARN est fortement diminuée en présence de la marque (Edupuganti et al. 2017).

2.5.3. Les marques m5C et hm5C

Bien moins abondante que la m6A, la marque m5C est tout de même présente sur les ARNm, notamment au niveau des sites de maturation des transcrits (Squires et al. 2012) et sur les sites d'initiation de la traduction (Schumann et al. 2020). Les enzymes *NOP2-Sun domain family, member 2* (NSUN2) (Frye et Watt 2006) et DNMT2 (Schaefer et al. 2010), les méthyltransférases responsables de la méthylation m5C des ARNt, sont également impliquées dans la déposition de cette marque sur les ARNm. Les facteurs capables de reconnaître la m5C restent à ce jour peu connus. Des expériences de *pull down* ont permis de montrer que le facteur *Aly/REF export factor* (ALYREF) était capable de se lier avec une bien meilleure affinité aux ARN méthylés (Xin Yang et al. 2017). De même, la protéine *Y-box binding protein 1* (YBX1) et ses homologues ont une préférence de liaison pour les sites méthylés chez l'homme, la Drosophile et le poisson zèbre (X. Chen et al. 2019). Enfin, la marque m5C peut être oxydée en 5-hydroxyméthylcytidine puis en 5-formylcytidine bien que la prévalence de ces modifications n'ait pas encore été fermement établie. Les enzymes ALKBH1 et TET ont été associées à la déposition de ces marques oxydées sur les ARN à la fois *in vitro* et *in vivo* en cellules HEK293T (L. Fu et al. 2014; Arguello et al. 2022).

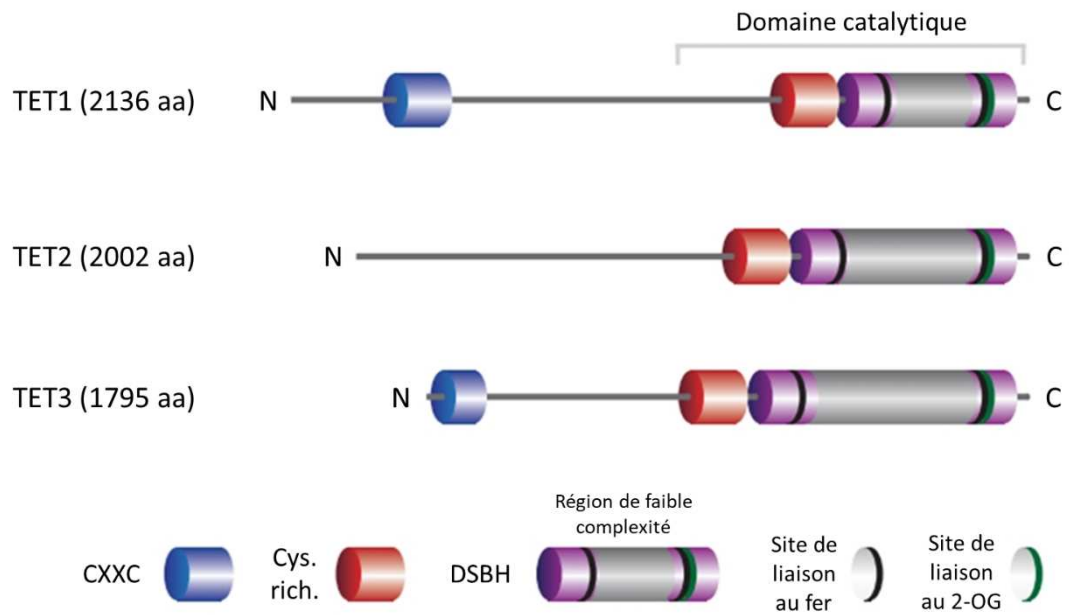


Figure 19. Structure des enzymes de la famille Ten-Eleven Translocation (TET). Schéma représentant la structure et les domaines des enzymes TET chez la souris (isoformes les plus longues). CXXC : Cystéine-X-X-Cystéine ; Cys.rich. : riche en cystéines ; DSBH : double-stranded β -helix ; 2-OG : 2-oxoglutarate. D'après (Rasmussen et Helin 2016).

3. LES ENZYMES DE LA FAMILLE TET

Comme abordé précédemment, chaque cellule établit un programme transcriptionnel qui lui est propre. Ce programme peut être maintenu ou non au fil du développement grâce à des mécanismes reposant sur l'action d'enzymes épigénétiques. Depuis 2009, de nombreux travaux ont montré que les gènes codant les enzymes de la famille TET contribuent à ces mécanismes de régulation épigénétique. Chez les mammifères, la famille TET se compose de 3 membres : Tet1, Tet2 et Tet3. Chacun est codé par un gène distinct et est connu pour catalyser l'hydroxylation des 5mC. Le gène *Tet1* a été le premier mis en évidence chez des patients atteints de leucémie myéloïde aigüe dont les cellules cancéreuses présentaient une anomalie chromosomique récurrente, la translocation t(10 ;11)(q22 ;q23) qui est à l'origine de son nom. Ce remaniement fusionne le gène *Tet1* à celui codant pour la HMT MLL (Lorsbach et al. 2003). Par la suite, les gènes *Tet2* et *Tet3* ont été découverts par homologie de séquence.

3.1. Structure des protéines TET

Les protéines TET sont des enzymes multi-domaines d'environ 180 à 230 kDa. Elles sont caractérisées par un domaine catalytique C-terminal responsable de l'hydroxylation des 5mC, ainsi que d'un domaine CXXC (Cystéine-X-X-Cystéine) dans sa partie N-terminal capable de lier l'ADN (Fig.19).

3.1.1. Le domaine CXXC de liaison à l'ADN

La région N-terminale des protéines TET contient généralement un domaine CXXC zinc-finger d'environ 60 acides aminés. Ce domaine est également retrouvé dans une variété de protéines liées à la chromatine dont des protéines responsables de la déméthylation comme les histones déméthylases de la famille des KDM ou au contraire chez la méthyltransférase DMNT1 ou l'histone méthyltransférase MLL1 (K. Liu et Min 2020). Ce domaine permet la fixation de ces protéines sur des sites CpG avec une préférence pour les sites non méthylés. Il est caractérisé par la présence de 8 cystéines hautement conservées qui permettent la liaison du zinc sous forme d'ion divalent Zn^{2+} (Jikui Song et al. 2011).

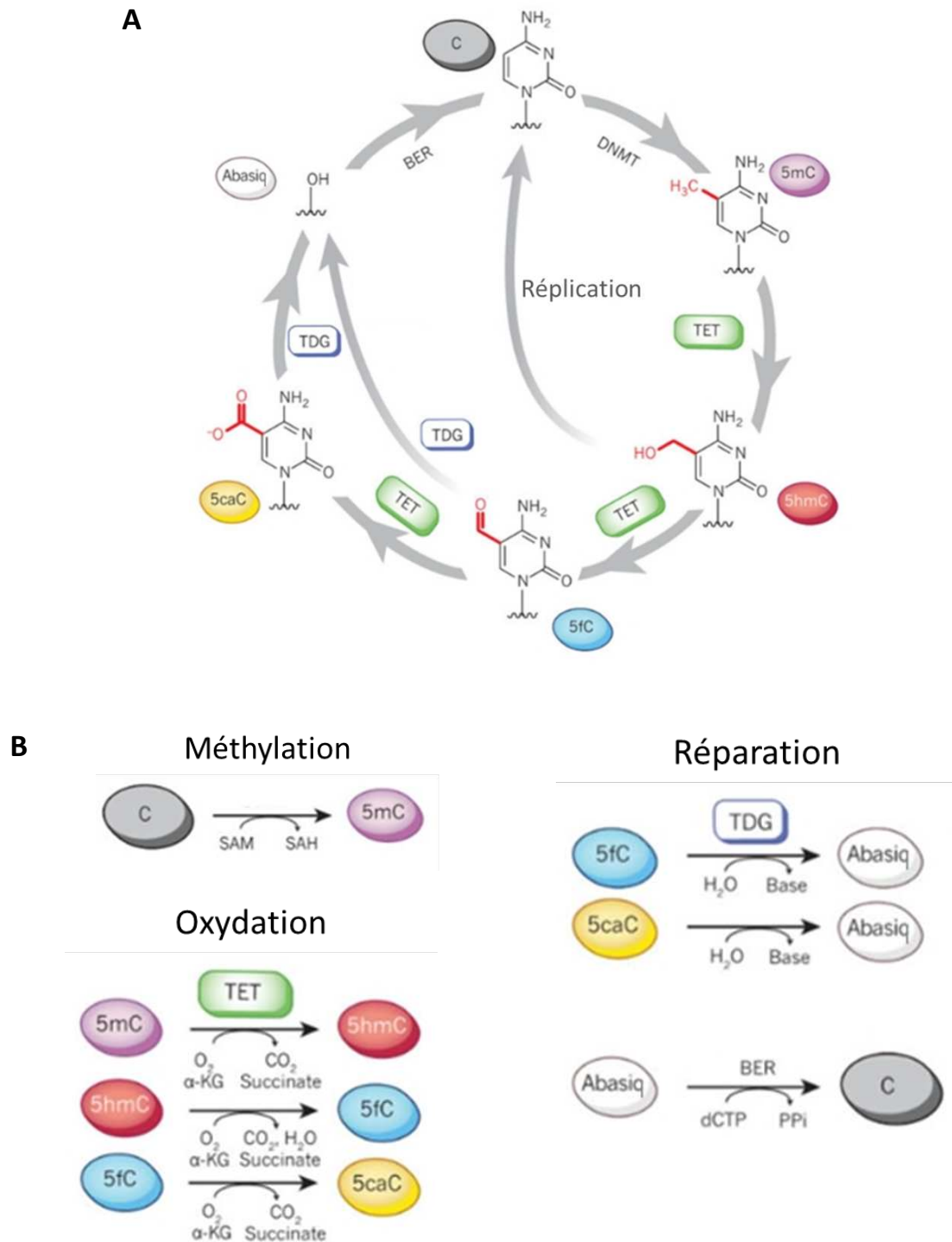


Figure 20. Voie de méthylation et déméthylation des cytosines. (A) Cycle de méthylation et déméthylation des cytosines. Les bases sont indiquées dans des ovales et les enzymes dans des rectangles. (B) Détails des réactions chimiques de méthylation des cytosines, d'oxydation des cytosines modifiées, et de réparation de l'ADN. 5mC : 5-méthylcytosine ; 5hmC : 5-hydroxyméthylcytosine ; 5fC : 5-formylcytosine ; 5caC : 5-carboxylcytosine ; Abasiq. : abasique ; BER : Base Excision Repair ; DNMT : DNA Méthyltransférase ; TET : Ten-Eleven Translocation ; TDG : Thymine DNA Glycosylase ; SAM : S-adenosylméthionine ; α -KG : α -cétoglutarate (= 2-oxoglutarate). D'après (Kohli et Zhang 2013).

3.1.2. Le domaine catalytique

L'ensemble des protéines TET est caractérisé par un domaine catalytique localisé en C-terminale qui a une activité dioxygénase (Tahiliani et al. 2009). Cette activité dépend de deux cofacteurs qui sont le fer et le 2-oxoglutarate. Le domaine catalytique est subdivisé en un segment riche en cystéines et un domaine DSHB divisé en deux par une large insertion dite de faible complexité (NCLC pour *non conserved low-complexity*). Un motif HXD est également présent et assure la liaison au fer. La mutation spécifique de ce motif abolie totalement l'activité catalytique de la protéine (K. Ito et al. 2019). Le domaine catalytique montre une structure compacte et globulaire avec en son centre le domaine DSHB, entouré par le domaine riche en cystéine décrit pour stabiliser l'ADN au centre du DSHB (Hu et al. 2013). Le domaine catalytique de TET2 s'associe à l'ADN par des liaisons hydrogènes et des interactions hydrophobes ciblant les phosphates des acides nucléiques.

3.2. Activité enzymatique des enzymes TET

3.2.1. Réaction d'oxydation des 5mC

La réaction d'oxydation des 5mC génère en premier lieu des 5-hydroxyméthylcytosines (5hmC) (Tahiliani et al. 2009), qui peuvent également être oxydées, toujours par les enzymes TET, pour former des 5-formylcytosines (5fC) puis des 5-carboxycytosines (5caC) (Fig.20A) (S. Ito et al. 2011; Y.-F. He et al. 2011). Au cours du processus de déméthylation actif de l'ADN, les marques 5fC et 5caC sont toutes deux reconnues par la Thymine DNA Glycosylase (TDG). Cette enzyme génère à partir de ces nucléosides des sites abasiques, eux même rapidement pris en charge par le système de réparation de l'ADN *Base Excision Repair* (BER) afin d'être remplacés par de nouvelles cytosines non méthylées (K. D. Rasmussen et Helin 2016).

La réaction catalytique de conversion du 5mC vers 5hmC nécessite comme substrat les deux cofacteurs de TET, une molécule de 2-oxoglutarate (autrement appelé α -cétoglutarate) ainsi que du fer sous forme d'ion ferreux divalent Fe^{2+} , mais aussi du dioxygène (Fig.20B). Il en résulte une molécule de succinate et une molécule de dioxyde de carbone (CO_2). Les réactions de conversion suivantes, impliquant la conversion de 5hmC en 5fC puis 5caC, nécessitent en plus une molécule d'ATP chacune. La production de 2-oxoglutarate est le principal facteur

limitant de la réaction, un métabolite du cycle de Krebs produit par les enzymes Isocitrate déshydrogénase (IDH) 1 et 2.

3.2.2. La marque 5hmC

Découverte à l'origine par chromatographie sur le génome de bactériophage, la marque 5hmC a ensuite été détectée sur le génome des mammifères (Wyatt et Cohen 1953). Cette marque correspond à l'ajout d'un groupement hydroxyle (OH) sur le méthyl de la 5mC par substitution d'un hydrogène sans déstabiliser la structure de l'ADN. Initialement considérée comme un simple intermédiaire d'oxydation, de récentes études ont démontré un rôle fonctionnel pour cette marque.

Premièrement, la présence de 5hmC favorise la déméthylation « passive » de l'ADN, puisque DNMT1 ne reconnaît que les sites hémiméthylés par la marque 5mC et non pas par la marque 5hmC (Valinluck et Sowers 2007). La 5hmC est en fait une marque « stable » qui peut représenter environ 0,5% des cytosines et 40% des cytosines modifiées dans des cellules neuronales de mammifère (Kriaucionis et Heintz 2009; Münzel et al. 2010). Elle est retrouvée enrichie au niveau des sites ayant une densité en CpG faible à modérée, et est généralement absente des îlots CpG (Sérandour et al. 2012). Plus précisément, cette marque est abondante dans le corps des gènes fortement exprimées ainsi qu'au niveau des *enhancers*, suggérant une corrélation positive avec la transcription (Tsagaratou et al. 2014). Cette accumulation est associée à un état de pré-activation, ou *priming* des gènes (marqué par la présence de H3K4me1 et l'absence de H3K27ac) (Mahé et al. 2017). De plus, la localisation génomique de la 5hmC dans les régions régulatrices corrèle avec des sites de fixation pour des facteurs de transcription suggérant d'une part que certains pourraient permettre l'installation de cette marque, ou au contraire que celle-ci pourrait être reconnue par des *readers* (Spruijt et al. 2013). C'est le cas de la protéine MeCP2 qui reconnaît indifféremment les marques 5mC et 5hmC, alors que Uhrf2 ne reconnaît que la 5hmC. Enfin, l'hydroxylation des 5mC peut au contraire prévenir la liaison de facteurs qui ne reconnaissent que la 5mC comme le facteur Rfx1.

3.2.3. La marque 5fC

Second produit d'oxydation de la 5mC, la marque 5fC contient un groupement formyle sur le 5^{ème} carbone de la cytosine. Cette marque est rapidement éliminée par les systèmes de réparation de l'ADN (Y.-F. He et al. 2011). En accord avec cela, la 5fC est reconnue par des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN telles que les glycosylases TDG et NEIL3 (Spruijt et al. 2013). Cependant, cette marque peut également servir comme signal épigénétique, puisqu'elle peut être reconnue par des facteurs de transcription dont ceux de la famille Forkhead box P dont FOXP1 et FOXP4, ainsi que par le complexe de remodelage de la chromatine NuRD, suggérant une fonction dans la régulation de la transcription (Iurlaro et al. 2013).

3.2.4. La marque 5caC

Constituée d'un groupement carboxyle en position 5 des cytosines, cette modification représente le dernier état d'oxydation de la 5mC. A l'image de la 5fC, cette marque est rare et rapidement éliminée du génome par les systèmes de réparation de l'ADN. Néanmoins, certaines études suggèrent un rôle de la 5caC dans la régulation de la transcription puisqu'elle peut être reconnue par différentes protéines telles que DNMT1, le complexe de remodelage de la chromatine *Switch/sucrose non-fermentable* (SWI/SNF), ou encore CTCF (Nanan et al. 2019). Enfin, la 5caC serait capable de ralentir l'élongation de la transcription en établissant des liaisons hydrogènes avec la poche de reconnaissance de l'ADN de l'ARN Pol II (L. Wang et al. 2015).

3.2.5. Régulation de l'activité catalytique de TET

Comme évoqué ci-dessus, l'activité des enzymes TET dépend de la disponibilité de cofacteurs et métabolites. Ainsi, des accumulations aberrantes de 2-hydroxyglutarate, succinate, ou fumarate, des métabolites intervenant notamment dans le cycle de Krebs, peuvent inhiber l'activité de nombreuses enzymes dont TET (Oermann et al. 2012). Ces augmentations sont parfois liées à la mutation d'enzymes produisant ou utilisant ces métabolites comme IDH1 et 2, la fumarate hydratase, ou encore la succinate dehydrogenase (Chan et Majeti 2013). De manière intéressante, ces mutations sont fréquentes dans divers cas de cancers et peuvent être associées à une hypo ou une hyperméthylation du génome en

fonction des cas, notamment chez des patients atteints de leucémie myéloïde aigüe ou de gliomes (Woods et Levine 2015). A l'inverse, l'acide ascorbique (plus communément appelé vitamine C) stimule l'activité catalytique des enzymes TET *in vitro* mais aussi dans différentes lignées cellulaires et *in vivo* chez le modèle murin, puisqu'une augmentation des taux de vitamine C corrèle avec une augmentation des niveaux de 5hmC/5fC/5caC sans modifier l'expression des gènes *Tet* (Blaschke et al. 2013).

L'activité enzymatique des enzymes TET peut également être régulée par des modifications post-traductionnelles, puisque différentes modifications covalentes ont été décrites sur ces enzymes dont l'ubiquitination, l'acétylation, la phosphorylation, la GlcNAcylation et la PARylation (X. Wu et Zhang 2017). A titre d'exemple, la mono-ubiquitination d'un résidu lysine conservé entre les différents membres de la famille TET facilite leur liaison à la chromatine (Nakagawa et al. 2015). Aussi, l'acétylation de la partie N-terminale de TET2 stimule son activité catalytique en contexte de stress oxydatif (Y. W. Zhang et al. 2017).

3.3. Recrutement des enzymes TET sur la chromatine

Le recrutement des enzymes TET est régulé à différents niveaux. TET1 et TET3 semblent pouvoir être recrutées à la chromatine par leur domaine de liaison à l'ADN de type CXXC. En effet, des études *in vitro* montrent que ce domaine permet la fixation sur des oligonucléotides riches en CpG, avec une préférence pour les sites non méthylés (Xu et al. 2011). De plus, les expériences de CHIP-seq dirigées contre TET1 montrent un enrichissement aux promoteurs de gènes enrichis en îlots CpG (Williams et al. 2011; H. Wu et al. 2011), qui est diminué lorsque ce domaine est muté (Xu et al. 2011). Aussi, des études *in vitro* plus approfondies montrent que le domaine CXXC d'autres protéines comme celui des MLL peut se lier à un seul CpG en cohérence avec un enrichissement de TET1 et TET3 également observé sur des éléments de régulation distaux ayant des niveaux plus faibles en CpG (Cierpicki et al. 2010). La fonction canonique des protéines TET étant la déméthylation active des 5mC ADN, il peut sembler paradoxal que ces enzymes possèdent un domaine de fixation aux sites CpG non méthylés. L'hypothèse proposée est que le recrutement de TET sur ces régions servirait à les protéger d'une méthylation excessive par DNMT3A et B (Xu et al. 2011).

Cependant, le domaine CXXC n'est pas nécessaire pour toutes les fonctions des protéines TET. En effet les enzymes TET1 et TET3 contiennent un domaine de type CXXC alors que TET2 en est dépourvue. Cette absence est due à une inversion chromosomique ayant abouti à la production de deux gènes : le premier codant pour un domaine CXXC seul appelé *inhibition of the Dvl and axin complex protein* (IDAX), et le deuxième codant pour une enzyme TET plus courte que les autres membres de cette famille de protéines. De plus, le domaine CXXC est aussi absent de certains variants de Tet1 et Tet3 (Melamed et al. 2018). A noter que toutes ces isoformes dépourvues de domaine CXXC semblent toujours se lier à l'ADN, sans doute de manière indirecte par l'intermédiaire d'autres facteurs. De plus, les enzymes TET1 et 3 sont présentes sur le génome dans des régions très faiblement enrichies en CpG, argumentant en faveur d'un mécanisme de recrutement indépendant de ce dinucléotide. En fait, le recrutement des enzymes TET peut souvent s'expliquer par leur capacité à interagir *in vivo* avec des facteurs de transcription ou d'autres régulateurs épigénétiques (Joshi et al. 2022). En ce sens, TET2 est capable d'interagir *in vivo* avec les facteurs early B-cell factor 1 (EBF1) (Guilhamon et al. 2013) et Wilms tumor 1 (WT1) (Rampal et al. 2014). L'expression de ces facteurs qui est tissu spécifique permettrait de contrôler l'activité de TET2 entre différents tissus. Enfin, la liaison de TET à d'autres facteurs peut aussi conduire à sa dégradation comme observé avec IDAX/CXXC4 (Ko et al. 2013). L'interaction entre TET2 et ce facteur codant pour son domaine CXXC ancestral permet en premier lieu la fixation aux îlots CpG non méthylés. Ce recrutement corrèle avec la dégradation caspase dépendante de TET2 seulement lorsque celui-ci est lié à l'ADN. Bien que ces résultats doivent être confirmés *in vivo*, ils montrent que IDAX/CXXC4 aurait évolué de manière à réguler négativement l'activité de TET2 spécifiquement aux îlots CpG. De manière générale, le recrutement de TET participe donc à la régulation de son activité. La fixation de partenaires de TET et de cofacteurs de manière stable ou transitoire peut influencer son activité et ses sites de liaison génomique.

3.4. Fonctions biologiques des enzymes TET

Les gènes *Tet* sont exprimés au cours du développement embryonnaire ainsi que dans une grande variété de tissus chez l'adulte (J. Yang et al. 2020). En effet, l'expression de *Tet3* est forte dans l'ovocyte ainsi que lors des premières étapes du développement embryonnaire et décroît progressivement au stade blastocyte. A l'inverse, *Tet1* et *Tet2* sont fortement

exprimés à ce stade, ainsi qu'en cellules ES. Ensuite, l'expression des 3 gènes *Tet* varie en fonction de la différenciation des cellules. Chacun des gènes *Tet* est exprimé dans différents tissus chez l'adulte dont le système hématopoïétique et le système nerveux (X. Zhang et al. 2023). Malgré une redondance fonctionnelle entre les enzymes TET qui partagent une même activité catalytique, le patron d'expression spécifique de chacun des gènes *Tet* suggère qu'une part des fonctions de ces gènes n'est pas redondante. A noter également que les enzymes TET ne possèdent que 18 à 24% d'homologie de séquence chez l'homme, argumentant en faveur d'une spécificité de fonction pour chacune d'entre elles (Fasolino et Zhou 2017).

3.4.1. Fonctions au cours du développement embryonnaire

Du fait de l'implication des enzymes TET dans la déméthylation de l'ADN et de l'importante reprogrammation épigénétique qui s'effectue dans l'embryon précoce, différentes études ayant recours à des souris invalidées (*KO* pour *knock-out*) pour les différents gènes *Tet* abordent le rôle de ces gènes lors du développement embryonnaire. Premièrement, la délétion constitutive de *Tet3* conduit à une léthalité néo-natale qui n'est pas observée chez les simples mutants *Tet1/2*, suggérant un rôle spécifique pour ce gène (Gu et al. 2011). TET3 participe aussi à la déméthylation des pronucléus mâle et femelle avec une préférence pour le pronucléus mâle. Enfin, la délétion conditionnelle de *Tet3* dans les PGCs réduit la fécondité des femelles lorsque celles-ci sont croisées à des mâles sauvages. A l'inverse, les simples mutants *Tet1/2* ne présentent pas de phénotype évident au cours de leur développement embryonnaire. Néanmoins, le double mutant *Tet1/2* montre une létalité embryonnaire partielle, ainsi que divers phénotypes dont un retard de croissance, une exencéphalie, ainsi que des défauts d'expression des gènes soumis à l'empreinte parentale (Dawlaty et al. 2013). A noter que chez ce double mutant, les niveaux de 5hmC sont réduits mais cette perte semble en partie compensée par une redondance avec *Tet3*. Enfin, ces résultats obtenus *in vivo* concordent avec ceux obtenus en cellules ES puisque la délétion de *Tet1* n'a que peu d'effet sur les niveaux de 5hmC et l'activité transcriptionnelle des cellules. En revanche, des cellules triples *KO Tet1/2/3* montrent une absence totale de 5hmC en lien avec des défauts majeurs dans l'expression des gènes du développement et une hyperméthylation de leurs promoteurs, supportant un rôle des gènes *Tet* dans le maintien de la pluripotence (Dawlaty et al. 2014). Le triple *KO* chez la souris est quant à lui létal au cours de

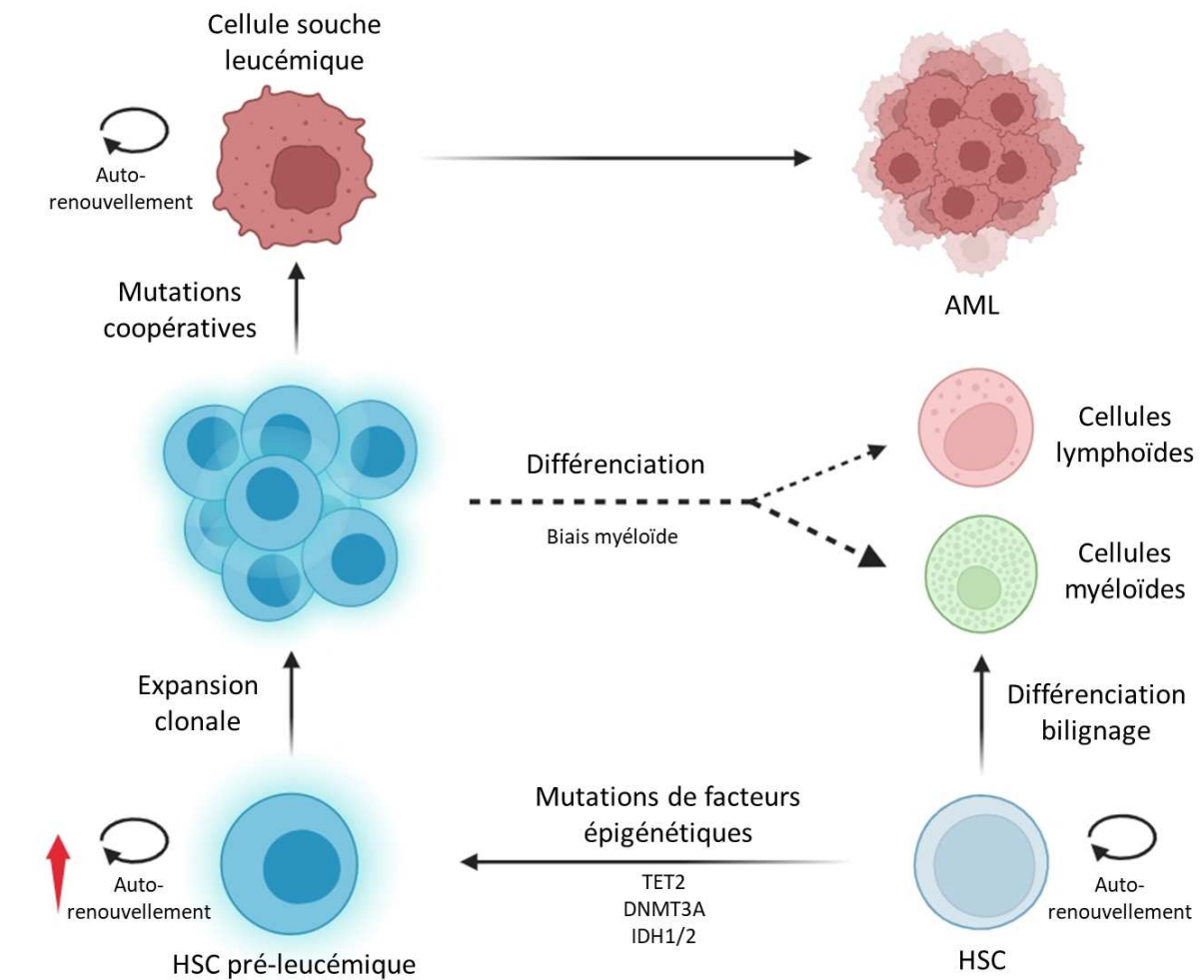


Figure 21. Modèle de leucémogenèse suite à l'acquisition de mutations épigénétiques. L'acquisition de mutations affectant des gènes impliqués dans la méthylation de l'ADN au sein de HSC promeut l'auto-renouvellement et l'expansion clonale de cellules pré-leucémiques. Ces cellules pré-leucémiques gardent leur potentiel de différenciation en cellules lymphoïdes ou myéloïdes avec un biais vers le destin myéloïde. L'accumulation de mutations coopératives additionnelles conduit au développement de cellules souches leucémiques ayant un potentiel d'auto-renouvellement accru, et au développement de leucémies. HSC : cellule souche hématopoïétique ; AML : leucémie myéloïde aiguë ; DNMT : DNA Méthyltransférase ; IDH : Isocitrate déshydrogénase ; TET : Ten-Eleven Translocation. D'après (Chan et Majeti 2013).

la gastrulation (Dai et al. 2016). Malgré une importante redondance fonctionnelle entre les gènes *Tet*, leur fonction est vitale lors du développement embryonnaire.

3.4.2. Fonctions dans l'hématopoïèse

Si la découverte des gènes *Tet* est due à la caractérisation d'anomalies chromosomiques impliquant *Tet1* dans le développement de leucémies myéloïdes aiguës, ces translocations restent rares. C'est l'identification de mutations fréquentes dans le gène *Tet2* dans diverses hémopathies malignes qui a principalement suscité l'intérêt quant aux fonctions des gènes *Tet* dans l'hématopoïèse (Y. Feng et al. 2019). Chez la souris, la délétion de n'importe quel gène *Tet* conduit à une augmentation de la compétitivité des cellules souches hématopoïétiques (HSC), comme montré par des expériences de transplantation de HSC KO pour l'un des gènes *Tet* dans des souris sauvages (Cimmino et al. 2015; Ko et al. 2011). La perte de *Tet2* induit une expansion de monocytes et de granulocytes dans la rate chez la souris KO (Moran-Crusio et al. 2011) alors qu'une déficience pour *Tet1* induit un biais vers la différenciation en lymphocytes B (Cimmino et al. 2015). Ainsi, la différenciation de la lignée hématopoïétique est différenciellement affectée par *Tet1* et *Tet2*, impliquant des fonctions spécifiques et non redondantes pour ces deux gènes. Néanmoins, malgré l'expansion clonale des HSC, l'apparition d'hémopathies malignes chez les souris KO pour *Tet2* reste un événement rare et tardif, suggérant que ce phénomène nécessite des mutations supplémentaires.

Chez l'homme, les mutations de *Tet2* corrèlent avec une diminution de la marque 5hmC à la fois à l'état homozygote et hétérozygote, et ne se limitent pas à un type de pathologie précis puisqu'elles sont très communes dans des cas de syndromes myélodysplasiques, néoplasmes myéloprolifératifs, leucémies myéloïdes aiguës, leucémies myélomonocytaires chroniques, et dans des lymphomes T et B (Scourzic, Mouly, et Bernard 2015). Ces aberrations génétiques pourraient être la première étape vers le développement de cancers. En effet, elles sont parfois détectées dans des HSC pré-malignes et retrouvées ensuite dans les tumeurs conjointement avec de nouvelles mutations (Fig.21) (Chan et Majeti 2013; Jan et al. 2012). En accord avec les données présentées en modèle murin, la perte de fonction de TET2 serait alors un événement initiateur conduisant à une expansion des HSC. Ces HSC potentialiseraient la formation de tumeurs suite à l'acquisition de mutations secondaires.

3.4.3. Fonctions dans le système nerveux central

Bien que *Tet3* soit le gène *Tet* le plus abondamment exprimé au sein du SNC, tous les gènes *Tet* sont présents et montrent une coexpression majeure avec le marqueur neuronal NeuN (Kaas et al. 2013). C'est aussi dans ces cellules qu'est retrouvé un niveau élevé de 5hmC. *Tet1* est également exprimé au sein des cellules gliales dont les astrocytes et les oligodendrocytes (Zhao et al. 2014). La présence des enzymes TET au sein de différents types cellulaires du système nerveux central (SNC) argumente en faveur d'une certaine diversité de fonctions pour ces enzymes dont la caractérisation implique l'utilisation de KO constitutifs ou conditionnels. Différentes études montrent maintenant l'implication des gènes *Tet* dans une grande variété de processus cognitifs comme l'apprentissage spatial, la mémorisation à court et long terme, le contrôle de la peur, de l'addiction, du stress, et la prise d'alimentation (Antunes et al. 2019).

D'autres études soulignent le rôle de *Tet* dans les étapes précoces du développement du SNC et notamment la spécification du lignage neural. En effet, des ESC et embryons de souris triple KO pour *Tet1/2/3* ne parviennent pas à se différencier vers la lignée neurale (Dawlaty et al. 2014) et montrent des défauts d'activation de gènes de l'identité du neurectoderme au profit de gènes du mésoderme (Xiang Li et al. 2016). Ce phénotype serait attribué à une absence de déméthylation du promoteur du gène *PAX6* dans les ESC humaines, un facteur de transcription requis pour le développement des cellules nerveuses (Verma et al. 2018). Les enzymes TET, et plus particulièrement TET2, sont requises pour la différenciation des ESC en cellules progénitrices neurales (NPC). Des ESC déficientes pour *Tet2* montrent un ralentissement dans l'induction de gènes neuronaux lors de leur différenciation, corrélé à une hyper-méthylation globale des *enhancers*, ainsi qu'à une diminution de la marque H3K27ac (Hon et al. 2014). Ces résultats concordent avec ceux observés chez la souris, puisqu'une hyper-méthylation du génome est également décrite dans le cortex cérébral embryonnaire chez la souris KO pour *Tet2* (Lister et al. 2013). TET3 est également impliquée dans ce processus de différenciation des ESC vers l'identité NPC puisque des expériences de *knock-down* de *Tet3* montrent que l'enzyme correspondante est requise pour l'expression de *Kdm6b*, un régulateur épigénétique critique pour la neurogénèse (Montibus et al. 2021). L'absence de TET3 conduit à la dérégulation des gènes de la pluripotence *Oct4* et *Nanog*, ainsi qu'à l'apoptose des NPC (T. Li et al. 2015; Santiago et al. 2020). Chez l'adulte également, la

perte de TET1 ou TET2 augmente la prolifération des NPCs, et dans le cas de la perte de TET2, réduit leur capacité à se différencier en neurones ou astrocytes *in vivo* (Xuekun Li et al. 2017). A l'inverse, la perte de TET3 diminue la prolifération des NPCs au profit de la différenciation en astrocyte (Montalbán-Loro et al. 2019). Individuellement, la perte des gènes *Tet* altère les processus épigénétiques et le programme transcriptionnel des précurseurs de cellules nerveuses, suggérant à nouveau des fonctions non redondantes pour ces trois gènes, mais n'empêche pas la neurogénèse et le développement du SNC. Comme évoqué précédemment, seuls les doubles mutants *Tet1/Tet2* et *Tet1/Tet3* montrent des défauts importants de développement du SNC comme l'exencéphalie ou l'holoprosencéphalie, suggérant tout de même un certain niveau de redondance (Dawlaty et al. 2013; J. Kang et al. 2015).

Enfin, la mutation d'*IDH1*, fréquente dans les gliomes, conduit à l'accumulation de 2-hydroxyglutarate et à l'extinction par compétition de l'activité des enzymes TET (J.-W. Park et Turcan 2019). En parallèle, une diminution des niveaux de 5hmC est observée dans certains gliomes au profit d'une augmentation du 5mC (Carella et al. 2020), suggérant que les enzymes TET joueraient un rôle suppresseur de tumeur dans le SNC.

3.5. Modes d'action non-canoniques

Si la plupart des études attribuent les fonctions de TET à son activité catalytique et ne s'intéressent qu'à sa capacité à oxyder les 5mC ADN, une hyper-méthylation de l'ADN ou une réduction des niveaux de 5hmC ne permettent pas toujours d'expliquer les phénotypes observés chez les souris KO pour les gènes *Tet*. De plus, l'analyse de mutants abolissant l'activité catalytique de TET a permis de révéler des fonctions catalytiques-indépendantes pour ces enzymes, puisque certains phénotypes de cellules ou de souris KO pour *Tet* ne sont pas récapitulés dans ces mutants « catalytic dead ». Ces mutations correspondent à des substitutions modifiant les acides aminés du motif HXD. Il en résulte une perte de la liaison au fer et une abolition totale de l'activité catalytique de TET (K. Ito et al. 2019).

3.5.1. Catalytiques-dépendants

Plusieurs études montrent que les enzymes TET ont la capacité d'oxyder également la marque m5C sur l'ARN en hm5C (L. Fu et al. 2014; Basanta-Sanchez et al. 2017; DeNizio et al.

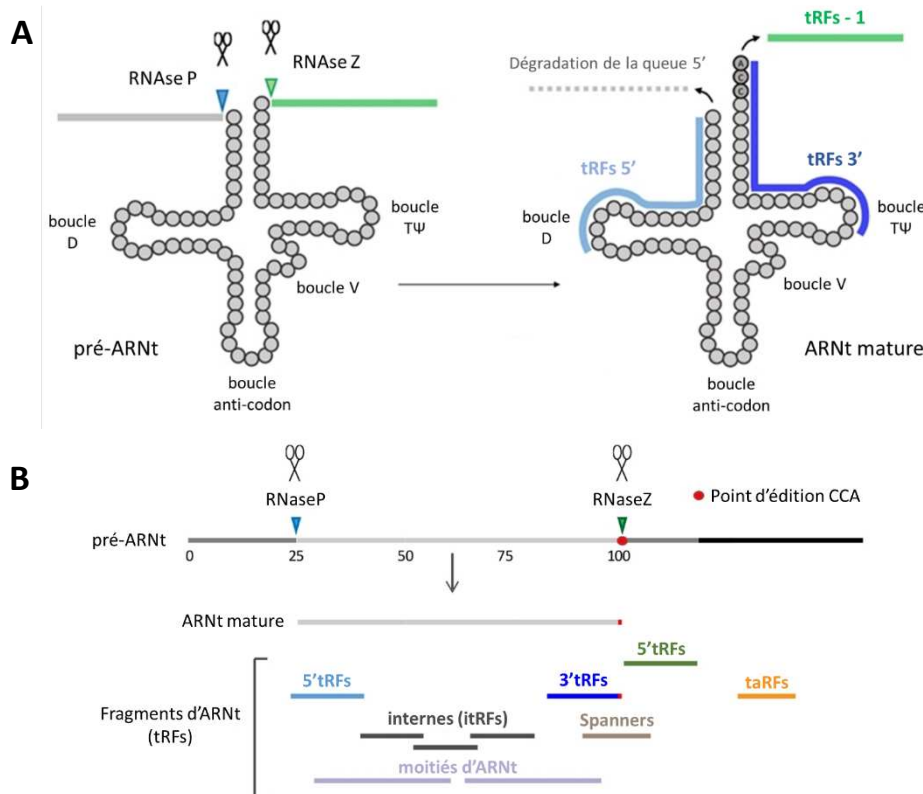


Figure 22. Biogenèse et diversité des fragments d'ARN de transfert (tRFs). (A) Schéma de la maturation d'un pré-ARNt en ARNt mature. La maturation d'un ARNt fait intervenir des RNase P et Z qui vont cliver les queues 5' et 3' du précurseur. Un tri-nucléotide CCA est ensuite ajouté à l'extrémité 3' de l'ARNt. (B) Le clivage d'un pré-ARNt et d'un ARNt mature peut conduire à la production de différents tRFs classifiés en fonction de la position à partir de laquelle ils sont issus. D'après (Molla-Herman et al. 2020).

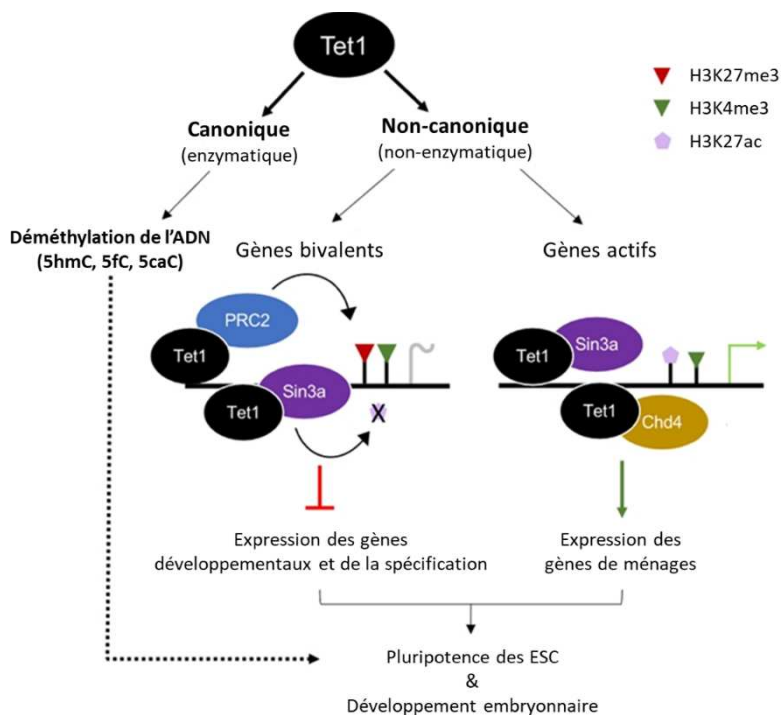


Figure 23. Modèle des modes d'action enzymatiques et non-enzymatiques de Tet1 dans la régulation des ESC et de l'embryogenèse. Tet1 participe à la régulation des gènes développementaux à promoteur bivalent par le recrutement des complexes PRC2 et Sin3A. ESC : cellule souche embryonnaire. D'après (Chrysanthou et al. 2022).

2019), suggérant une fonction de régulation épitranscriptomique pour ces enzymes. En effet, les enzymes TET peuvent se fixer aux ARN par un domaine protéique proche du site catalytique et sont capables de réaliser la réaction d'hydroxylation *in vitro* (C. He et al. 2021). Une diminution des niveaux de 5hmC est observée sur les ARNm messagers en contexte *Tet* KO chez les mammifères et la Drosophile (Delatte et al. 2016; Lan et al. 2020). Cette diminution corrèle à une augmentation de la stabilité des transcrits concernés ou à une réduction de leur traduction. Néanmoins ces résultats sont sujets à débat. En effet, plusieurs études n'ont pas réussi à détecter de différence de niveaux de 5hmC dans les ESC triple KO *Tet1/2/3* (Huber et al. 2015; C. He et al. 2021; Shen et al. 2021). Lorsqu'une diminution est observée, celle-ci n'est que légère, suggérant que d'autres enzymes seraient aussi impliquées dans la déposition de la marque hm5C. Enfin, les niveaux de hm5C sur les messagers est extrêmement faible, et sa présence est majoritairement attribuée aux ARNt (Legrand et al. 2017; Huber et al. 2015). En ce sens, il a été proposé dans les ESC murines que TET2 se lie aux pré-ARNt afin de réguler la production de fragments d'ARNt (tRFs) en contrôlant la maturation et le clivage des précurseurs ARNt (C. He et al. 2021; Shen et al. 2021). En effet, en plus d'être impliqués dans la traduction, les ARNt peuvent être clivés en tRFs (Fig.22), des petits ARN agissant par exemple comme ARN interférant, et pouvant être impliqués dans divers processus biologiques (Su et al. 2020).

3.5.2. Catalytiques-indépendants

Des fonctions non-enzymatiques ont également été proposées pour les enzymes TET, majoritairement liées à des interactions protéiques et au recrutement d'autres facteurs impliqués dans la régulation de la transcription (Williams et al. 2011). Par exemple, TET1 est capable de recruter les complexes SIN3A et PRC2 à la chromatine pour réprimer ses gènes cibles indépendamment de la présence de 5mC ou de son activité catalytique (Fig.23). L'absence de TET1 conduit à une diminution du recrutement de EZH2 corrélée à une diminution des taux de H3K27me3 sur les gènes bivalents au sein des ESC de souris (Chrysanthou et al. 2022). A l'inverse, TET2 est capable de recruter l'enzyme *O-linked β-N-acetylglucosamine transferase* (OGT) sur ses gènes cibles, favorisant cette fois-ci leur activation transcriptionnelle par la déposition de la marque de glycosylation O-linked β-N-acetylglucosamine (OGlcNAc) sur l'histone H2B (Q. Chen et al. 2013). L'expression d'une forme

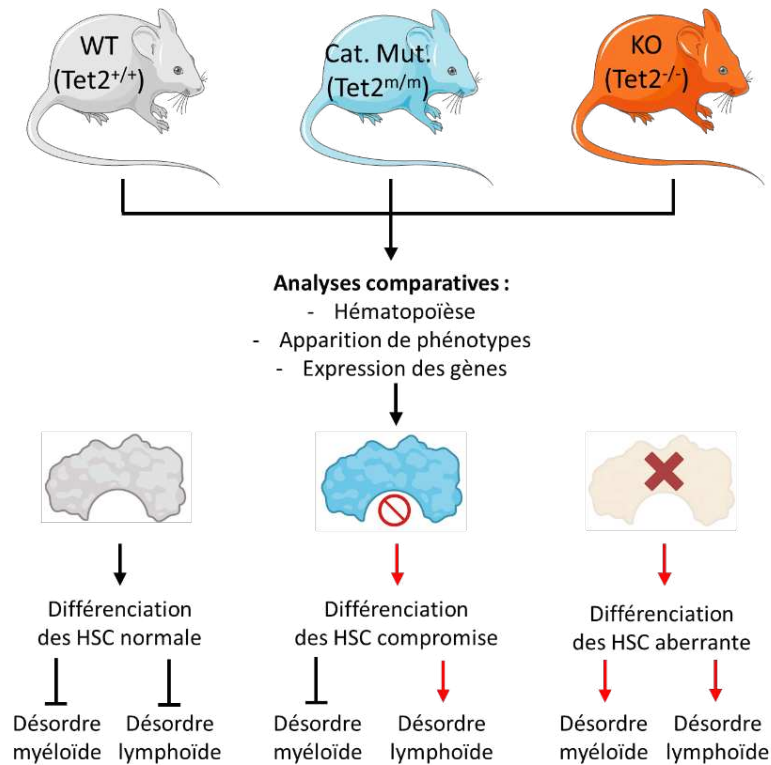
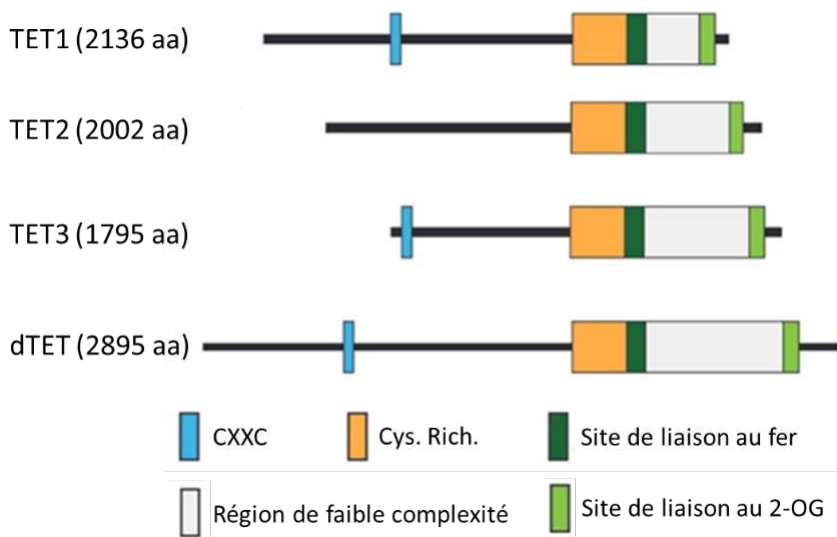


Figure 24. Comparaison des fonctions enzymatiques et non-enzymatiques de Tet2 au cours de l'hématopoïèse. La perte de *Tet2* est associée à des désordres hématopoïétiques dont une différenciation aberrante des HSC vers les lignées myéloïde et lymphoïde, alors que la perte de son activité catalytique n'est associée unique-ment qu'à un désordre myéloïde. WT : souche sauvage ; Cat. Mut. : Mutant catalytique ; KO : knock-out. D'après (Ito et al. 2019).



Figures 25. Conservation des enzymes TET chez la Drosophile. Comparaison de la structure et des domaines caractéristiques des enzymes TET entre les mammifères (TET1/2/3) et la Drosophile (dTET). Aa : acide aminé ; CXXC : Cystéine-X-X-Cystéine ; Cys.rich. : riche en cystéines ; 2-OG : 2-oxoglutarate. D'après (Dunwell et al. 2013).

catalytique inactive de TET2 dans des ESC de souris KO pour *Tet2* restaure le dépôt de la marque OGlCNAc ainsi que les niveaux d'expression des gènes cibles, démontrant que ce mode d'action est indépendant de l'activité catalytique de TET.

Enfin, l'analyse comparative des phénotypes entre des souris KO pour *Tet2* ou exprimant une forme de TET2 catalytiquement inactive a permis de discriminer différentes fonctions de TET2 dans les cellules sanguines et la moelle épinière (Fig.24). Ces expériences indiquent que les fonctions catalytiques de TET2 régulent plutôt le lignage myéloïde tandis que les fonctions non catalytiques de TET2 sont impliquées dans la régulation du lignage lymphoïde (K. Ito et al. 2019; Flores et al. 2023). Ainsi, les fonctions moléculaires des enzymes TET apparaissent plus complexes que précédemment décrites. L'utilisation d'allèles mutants abolissant l'activité catalytique de TET permet d'atteindre un nouveau niveau dans la compréhension du mode de fonctionnement de ces enzymes en faisant la part entre fonctions dépendantes et indépendantes de leur activité catalytique.

3.6. Les protéines TET chez la drosophile

3.6.1. Structure et expression du gène *Tet* chez la drosophile

Le génome de la drosophile ne contient qu'un seul gène *Tet* qui code pour des enzymes TET bien conservées (Fig.25). 6 transcrits différents peuvent être produits suite à l'expression de *Tet*, quatre codent pour l'enzyme pleine taille (TET-L pour TET-long) qui contient le domaine CXXC de liaison à l'ADN en N-terminal ainsi que le domaine catalytique en C-terminal, et les deux autres codent pour une enzyme plus courte (TET-S pour TET-short) qui ne contient pas la partie N terminale (Dunwell et al. 2013). Cependant, l'absence de 5mC sur le génome de la drosophile soulève l'interrogation quant au rôle de TET chez cet organisme. Cela suggère que ces enzymes agissent par des voies non-canoniques, et fait de la drosophile un modèle unique pour l'étude des fonctions des protéines TET au-delà de la méthylation des 5mC sur l'ADN.

L'expression de *Tet* augmente durant les premières heures de l'embryogenèse et est particulièrement élevée dans le SNC du stade embryonnaire à l'adulte (Delatte et al. 2016; Ismail et al. 2019; G. Zhang et al. 2015). Son expression est aussi détectée dans des cellules nerveuses sur les disques imaginaux d'œil-antenne et le disque d'aile ainsi que dans les

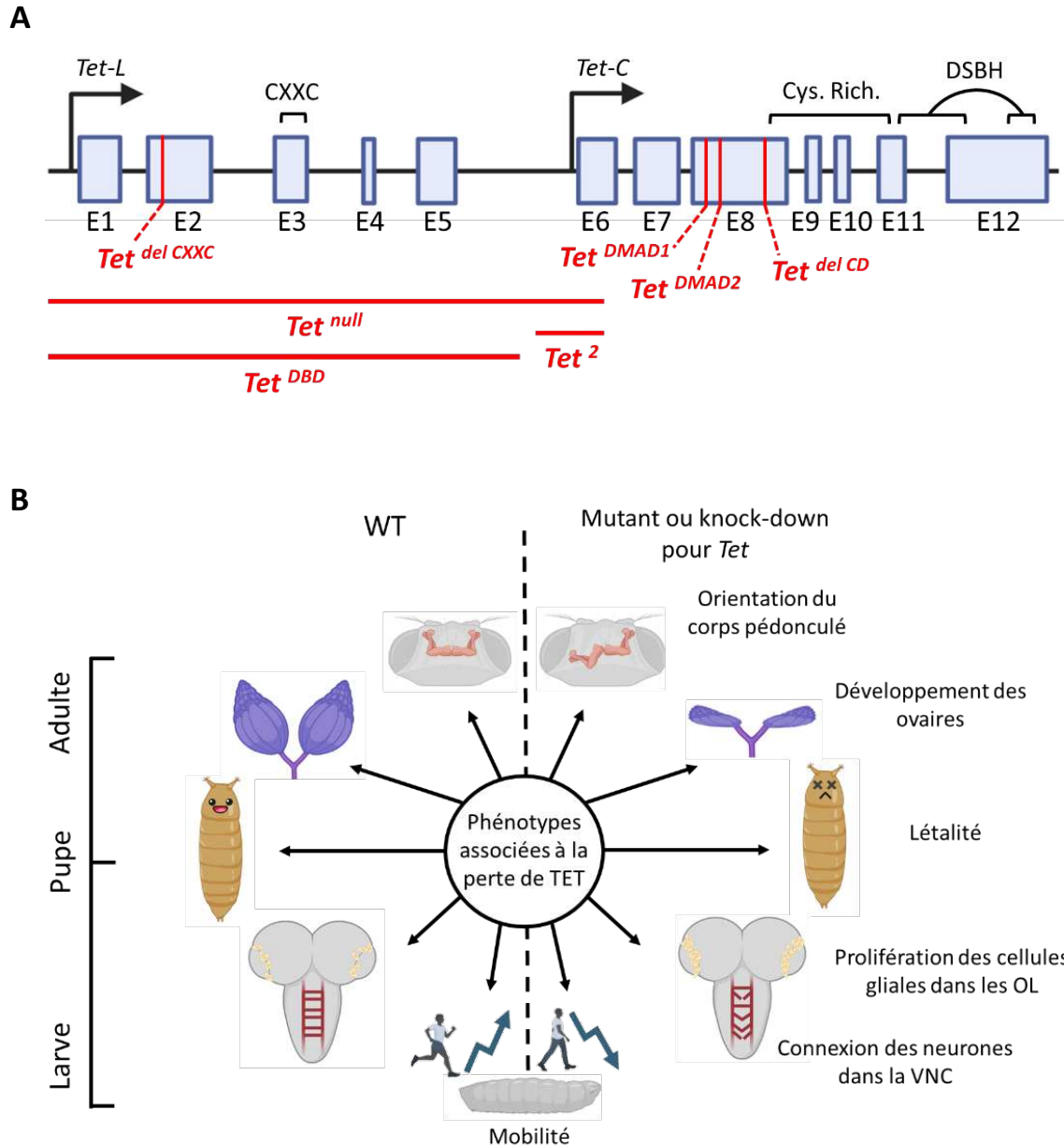


Figure 26. Mutations du gène *Tet* et phénotypes associés à la perte de TET chez *Drosophila melanogaster*. (A) Schéma représentant la structure du gène *Tet* chez la Drosophile. Les promoteurs sont représentés par des flèches, les exons (E) par des rectangles. Les domaines codés par certains exons sont indiqués. Les différentes mutations sont représentées en rouge directement sur le gène lorsqu'il s'agit de mutations ponctuelles (frameshift) ou sous le gène par une barre horizontale lorsqu'il s'agit d'une délétion. (B) Schéma résumant les phénotypes publiés associés à la perte de *Tet* chez la Drosophile. CXXC : Cystéine-X-X-Cystéine ; Cys. Rich. : cystéine riche ; DSBH : double stranded β helix ; SNC : système nerveux central ; OL : lobes optiques ; VNC : chaîne nerveuse ventrale ; KO : knock-out ; KD : knock-down

précurseurs musculaires (ou myoblastes) (F. Wang et al. 2018). Son expression dans la lignée germinale est controversée (F. Wang et al. 2018; G. Zhang et al. 2015).

3.6.2. Fonctions biologiques de *Tet* chez la *Drosophile*

Différentes études ont été entreprises pour caractériser les fonctions des enzymes TET chez la *Drosophile* en utilisant différentes lignées mutantes et transgéniques qui abolissent ou diminuent l'expression de *Tet* (Fig.26A). Premièrement, la délétion du gène *Tet* conduit à une létalité au stade pharate, juste avant l'éclosion de la puppe en adulte (G. Zhang et al. 2015). A noter que cette létalité est observée suite à la délétion des isoformes longues ou courtes de TET, suggérant que ces isoformes sont chacune requises pour la viabilité des mouches (F. Wang et al. 2018). De plus, certaines combinaisons alléliques obtenues après croisement de différents mutants *Tet* permettent d'obtenir quelques adultes transhétérozygotes qui sont capables d'éclore de la puppe, mais dont la survie ne dépasse pas 3 jours (F. Wang et al. 2018; G. Zhang et al. 2015).

La perte de *Tet* entraîne aussi des défauts de locomotion au stade larvaire et conduit au développement d'ovaires atrophiés (F. Wang et al. 2018). Cependant le tissu au sein duquel les fonctions de *Tet* ont sans doute été le plus étudiées est le SNC (Ismail et al. 2020). Dans ce tissu, *Tet* est requis au stade larvaire pour permettre l'expression de *slit* (*sli*), un gène impliqué dans la guidance axonale. La diminution de *sli* est associée à des défauts de fasciculation dans la ligne médiane de la chaîne nerveuse ventrale (VNC) (Ismail et al. 2019). Une diminution du nombre et de la prolifération d'une population particulière de cellules gliales associée au chiasma optique a également été décrite récemment (Frey et al. 2022). De même, chez l'adulte l'inhibition de l'expression de *Tet* dans les neurones est associée à des défauts structuraux du corps pédonculé (ou *mushroom body*) dans le cerveau adulte (Yao et al. 2018), suggérant un rôle de *Tet* dans la guidance axonale tout au long du développement du SNC de la *Drosophile*. L'ensemble de ces phénotypes est résumé (Fig.26B).

3.6.3. Modes d'action non-canoniques proposés chez la *Drosophile*

La méthylation 5mC est très faible chez la *Drosophile* (et ses dérivés oxydés sont indétectables) à la fois en contexte sauvage et mutant pour *Tet* dans différents tissus (Delatte

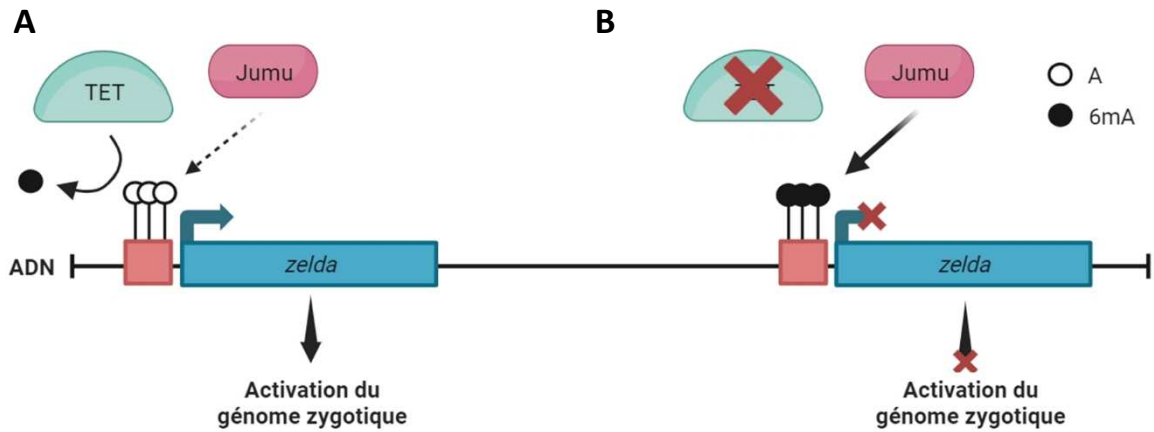


Figure 27. Modèle de la fonction de TET dans l'activation du génome zygotique chez la Drosophile. (A) La présence de TET permet la déméthylation de la marque 6mA présente sur le promoteur de *zelda*, défavorisant la liaison de Jumeau (Jumu) sur le promoteur de ce gène. L'expression du facteur de transcription pionnier Zelda permet l'activation du génome zygotique. (B) En absence de TET, la méthylation aberrante du promoteur de *zelda* favorise la liaison de Jumu, aboutissant à une répression abusive de ce gène et à un défaut d'activation du génome maternel.

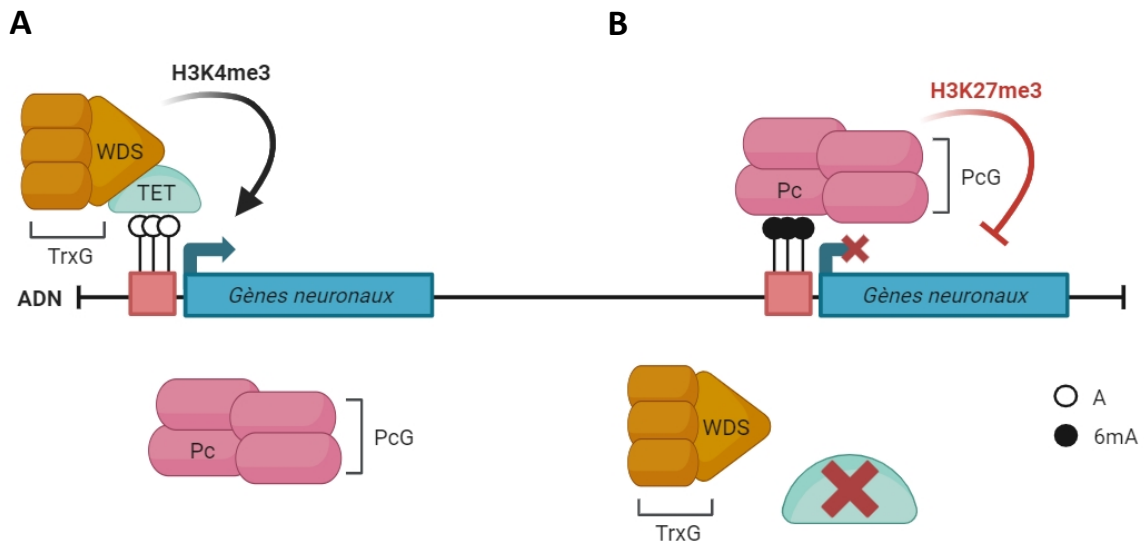


Figure 28. Modèle d'activation des gènes neuronaux par TET chez la Drosophile. (A) TET déméthyle les 6mA sur les promoteurs des gènes neuronaux et recrute le complexe Trithorax en interagissant avec Will Die Slowly (WDS), conduisant à l'activation transcriptionnelle de ces gènes. (B) En absence de TET, Polycomb (Pc) se fixe aux promoteurs des gènes neuronaux grâce à une affinité de liaison pour la marque 6mA, normalement éliminée par TET. Le recrutement du complexe Polycomb induit le dépôt de la marque H3K27me3 sur ces gènes et leur répression. PcG : Protéines du groupe Polycomb ; TrxG : Protéines du groupe Trithorax

5mC en 5hmC, les observations précédentes ont poussé la communauté à rechercher d'autres mécanismes d'action pour ces enzymes chez cet organisme, et notamment un rôle dans l'établissement ou l'élimination d'autres modifications.

En raison de la proximité de séquence entre les dioxygénases des familles *Tet* et *AlkB*, il a été proposé que TET soit capable d'oxyder les 6mA et participe à l'effacement de cette marque épigénétique chez la *Drosophile* (Yao et al. 2018; G. Zhang et al. 2015). En effet, il a été rapporté que le niveau de 6mA mesuré par spectrométrie de masse ou par dot-blot est augmenté dans différents tissus en absence de *Tet* dont l'embryon, les ovaires, le SNC, et les cellules S2et BG3C2 (Ismail et al. 2019; Yao et al. 2018; G. Zhang et al. 2015).

Une activité de déméthylation des 6mA a ainsi été associée aux enzymes TET, et ce mode d'action influence la transcription à différents niveaux comme le suggère des expériences de RNA-seq et de MeDIP-seq avec des anticorps contre les 6mA. Premièrement, la perte de *Tet* et l'augmentation des niveaux de 6mA dans l'ovaire conduit à la dérégulation des éléments transposables (F. Wang et al. 2018). Dans l'embryon précoce, une régulation fine des niveaux de 6mA est requise pour l'activation du génome zygotique (S. He et al. 2019). En effet, l'absence de *Tet* est corrélée à une augmentation des niveaux de 6mA sur le promoteur du gène *zelda* (*zld*) qui code pour un facteur de transcription pionnier, ainsi qu'à une répression aberrante de ce gène par Jummu (Jumeau), puisque ce facteur de transcription semble se lier préférentiellement sur des sites méthylés (Fig.27). Enfin, la déméthylation des 6mA dans des cellules nerveuses BG3C2 corrèle également avec une activation transcriptionnelle (Yao et al. 2018). Dans ces cellules et dans le SNC adulte, il a été proposé que TET élimine la marque 6mA sur ses gènes cibles pour permettre le recrutement du complexe Trithorax au détriment de Polycomb, induisant ainsi l'activation de gènes neuronaux (Fig.28).

En parallèle, une fonction épitranscriptomique a aussi été mise en évidence pour *Tet* chez la *Drosophile* (Delatte et al. 2016). Comme évoqué précédemment, cette étude montre que la marque hm5C est enrichie sur les ARN totaux dans le SNC et les cellules S2 et que la perte de *Tet* réduit drastiquement ces niveaux sur les ARNm (Delatte et al. 2016). De plus, les messagers porteurs de hm5C sont enrichis dans les polysomes, et la conversion de la marque m5C vers hm5C augmenterait leur traduction. Néanmoins, cette étude était principalement basée sur l'utilisation d'anticorps anti-5hmC pour mesurer les niveaux de cette modification par dot-blot et caractériser leur présence sur les ARN par hMeRIP. Deux études ont ensuite montré que les niveaux de hm5C mesurés par spectrométrie de masse sont extrêmement

faibles sur les ARNm (de l'ordre de 0,005%), et que la perte de *Tet* n'a pas d'impact sur ces niveaux à la fois en cellule S2 et dans le SNC (Legrand et al. 2017; Yao et al. 2018). Les études portant sur la marque hm5C souffrent en fait des mêmes biais que celles portant sur la marque 6mA dûs à une faible représentation de la marque et à l'utilisation d'anticorps peu spécifiques. Ainsi, le rôle de TET dans la conversion de m5C en hm5C sur les ARNm reste incertain. En outre, il est possible que TET agisse sur d'autres classes d'ARN comme les ARNt.

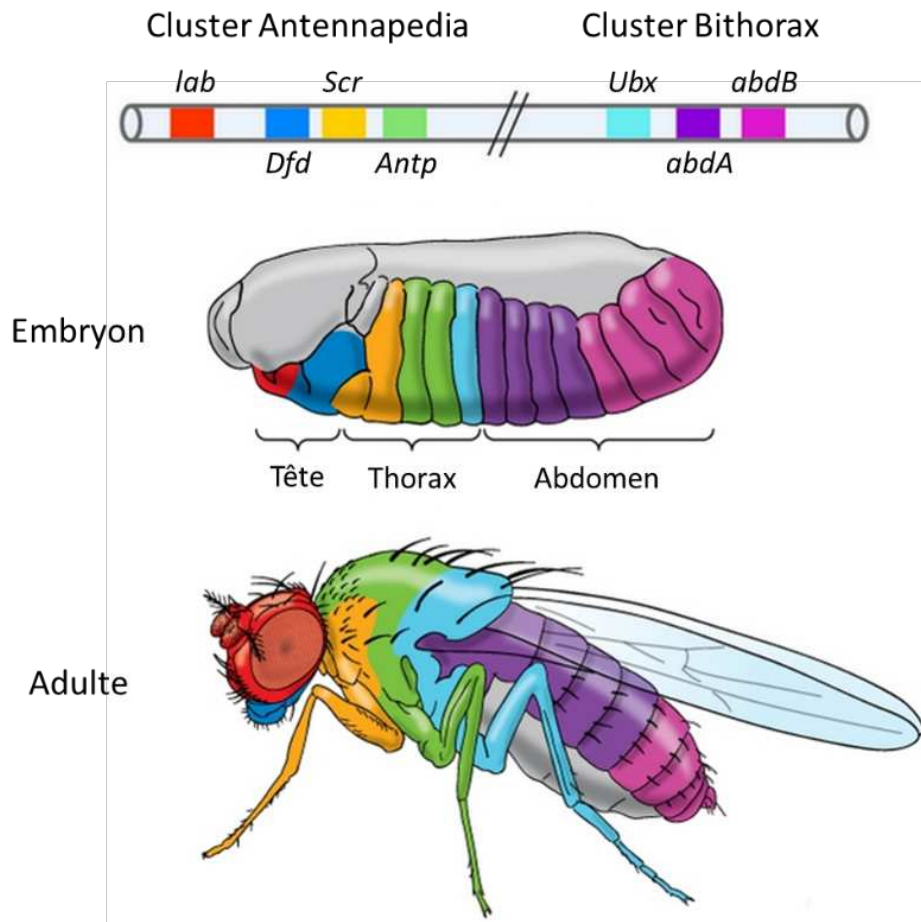


Figure 29. Les gènes homéotiques (*Hox*) définissent l'identité segmentaire. L'expression des gènes *Hox* dans l'embryon de *Drosophile* détermine l'identité des segments et définit la position des structures de la mouche adulte le long de l'axe antéro-postérieur.

4. LE COMPLEXE POLYCOMB

Si la présence des marques épigénétiques comme la méthylation de l'ADN ou les modifications post-traductionnelles des histones est dynamique au cours du développement, ces modifications covalentes peuvent être maintenues au fil des divisions cellulaires. Deux familles de protéines jouent un rôle essentiel dans la mémoire du programme transcriptionnel des cellules : les protéines codées par les gènes du groupe Polycomb (PcG) qui maintiennent un état répressif, ainsi que celles codées par les gènes du groupe Trithorax (TrxG) qui maintiennent un état actif.

4.1. Identification du complexe Polycomb

Initialement, les protéines PcG et TrxG ont été caractérisées chez la Drosophile (Grimaud, Nègre, et Cavalli 2006), puis ont été retrouvées hautement conservées chez tous les métazoaires. Leur fonction à tout d'abord été associée à la régulation des gènes homéotiques (ou gènes *Hox*). Les gènes *Hox* régulent l'identité des segments de l'organisme selon l'axe antéro-postérieur (Fig.29). Également découverts chez la Drosophile, ces gènes ségrègent en 2 clusters : *Antennapedia* (*Antp-C*) et *Bithorax* (*Bx-C*) (E. B. Lewis 1978; R. A. Lewis et al. 1980). Des mutations ou modifications de l'expression des gènes *Hox* conduisent à des changements homéotiques, c'est-à-dire des conversions de l'identité d'un segment de l'organisme en un autre (*e.g.* antennes en pattes pour certains allèles *Antp*, ou haltères en aile pour des allèles *bx*). Le cluster *Antp-C* régule les segments antérieurs de la mouche alors que le cluster *Bx-C* régule les segments postérieurs (Hajirnis et Mishra 2021). La formation de l'axe antéro-postérieur est initiée très précocement lors du développement embryonnaire *via* la traduction d'ARNm déposés maternellement. Les protéines générées vont initier une cascade de régulation des gènes de segmentations (dans l'ordre, les gènes *Gap*, puis les gènes *pair-rule*, et enfin les gènes de *segment-polarity*) dont l'expression séquentielle va conduire à l'établissement du profil d'expression spécifique des gènes *Hox*. Le produit d'expression des gènes de segmentation étant éphémère, ce sont les complexes TrxG et les PcG qui vont maintenir le contrôle du profil d'expression spécifique des gènes *Hox*.

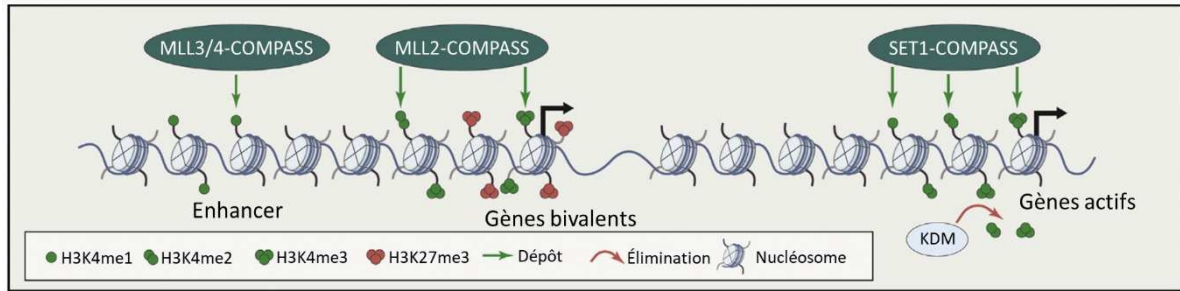


Figure 30. Les complexes de la famille COMPASS. Les complexes COMPASS sont responsables de la méthylation du résidu H3K4. MLL3/4-COMPASS assure la mono-méthylation de H3K4 sur les *enhancers*. MLL2-COMPASS est responsable de la di/tri-méthylation de H3K4 sur les promoteurs des gènes bivalents. SET1-COMPASS permet la mono/di et tri-méthylation de H3K4 sur les promoteurs des gènes actifs. D'après (Schuettengruber et al. 2017).

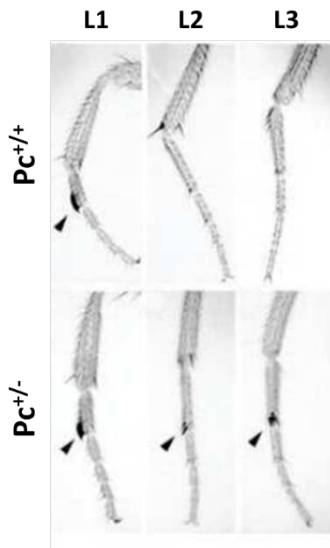


Figure 31. Les mutants PcG présentent des défauts homéotiques. La mutation hétérozygote du gène *Polycomb* (*Pc*) induit la formation de peignes sexuels ectopiques sur les paires de pattes centrale et postérieure. L1 : paire de pattes antérieure ; L2 : paire de pattes centrale ; L3 : paire de pattes postérieure. D'après (Hodgson et al, 2001).

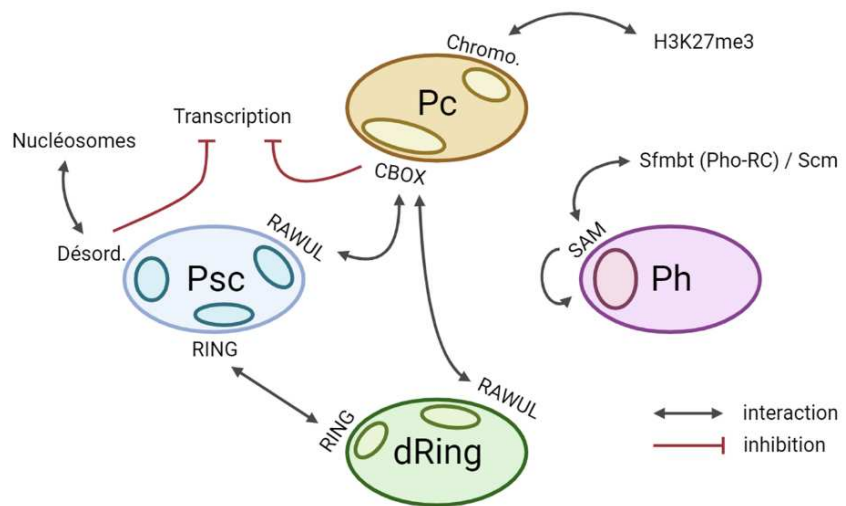


Figure 32. Les sous-unités du complexe PRC1 chez la Drosophile et leurs domaines fonctionnels. Schéma représentant les 4 sous-unités du complexe PRC1 chez la Drosophile et leurs domaines protéiques impliqués dans des interactions protéine-protéine et dans la répression transcriptionnelle. Chromo. : chromodomaine ; CBOX : Polycomb repressor box ; Désord. : domaine désordonné ; SAM : Sterile Alpha Motif ; RAWUL : Ring-finger and WD40-associated ubiquitin-like protein

L'identification des TrxG s'est faite sur la base de leurs mutations qui se traduisent par l'apparition de transformations homéotiques. Les protéines codées par ses gènes forment de larges complexes multimériques impliqués dans l'activation transcriptionnelle. Les mécanismes d'activation font intervenir le remodelage de la chromatine par les complexes SWI/SNF, la mono- di- et tri-méthylation sur H3K4 par les Complex Proteins Associated with Set1 (COMPASS) (Fig.30) et l'acétylation sur H3K27 par les HAT (Schuettengruber et al. 2017).

Les PcG ont également été identifiés sur la base de transformations homéotiques associés à leurs mutations. Par exemple, la mutation de PcG conduit fréquemment à l'état hétérozygote à l'apparition de peignes sexuels (*sexcombs*) ectopiques sur les 2^{ème} et 3^{ème} paires de pattes chez la Drosophile mâle, alors que ces structures n'apparaissent que sur la 1^{ère} paire de pattes chez le mâle à l'état sauvage (Fig.31) (Hodgson, Argiropoulos, et Brock 2001). A l'état homozygote, ces mutations sont létales précocement durant l'embryogénèse et sont également associées à des transformations homéotiques liées à la dérégulation de l'expression des gènes *Hox*. Ainsi, la fonction la mieux caractérisée des PcG est de réprimer la transcription en opposition avec les protéines TrxG. Deux principaux complexes PcG ont été caractérisés chez la Drosophile, puis retrouvés chez les métazoaires : PRC1 et PRC2 (Schuettengruber et al. 2017).

4.2. Diversité des complexes Polycomb

4.2.1. Le complexe PRC1

4.2.1.1. Le complexe PRC1 canonique

Initialement purifié à partir de l'embryon de Drosophile, le complexe PRC1 est constitué de quatre sous-unités : Polycomb (Pc), Polyhomeotic (Ph), Really interesting new gene (dRING, également appelé Sce pour Sexcombs extra), et Posterior sex combs (Psc, qui a un homologue Su(z)2 pour Suppressor of zeste 2) (Shao et al. 1999). Les domaines protéiques de ces différentes sous-unités et leurs fonctions sont décrits (Fig.32).

La sous-unité Pc est caractérisée par un chromodomaine localisé en partie N-terminale, permettant à la protéine de reconnaître la marque H3K27me3, ainsi que par un domaine C-terminal *Polycomb repressor box* (PcR box) requis pour la répression de la transcription des gènes cibles (J Müller 1995). Ph est codée par deux gènes paralogues, *ph-proximal* (*ph-p*) et *distal* (*ph-d*). Cette protéine contient un domaine SAM (*Sterile Alpha Motif*) dont la fonction

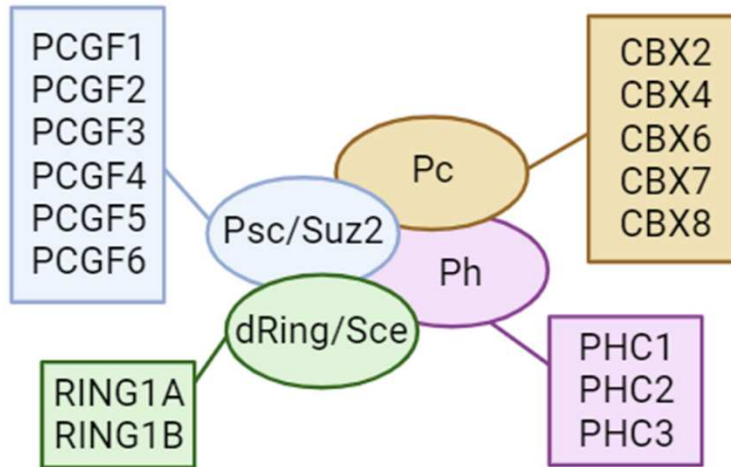


Figure 33. Les sous-unités du complexe PRC1 chez la Drosophile et leurs homologues chez les mammifères. Les cercles représentent les sous-unités chez la Drosophile alors que les rectangles représentent les homologues chez les mammifères.

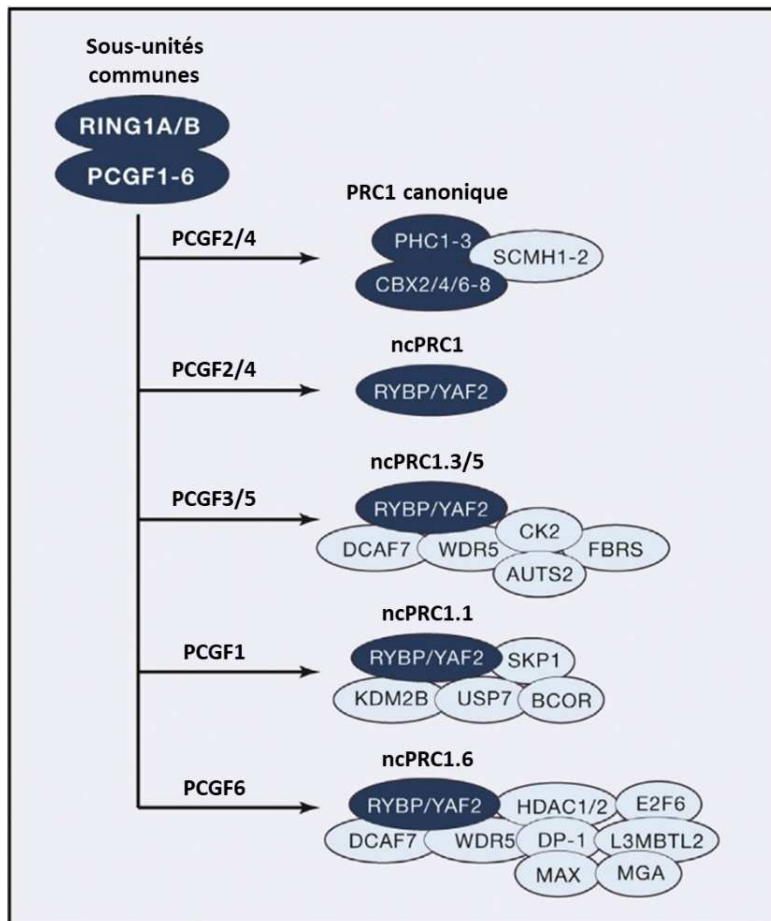


Figure 34. Les complexes canoniques et non-canoniques PRC1 chez les mammifères. Schéma représentant le complexe PRC1 canonique, les complexes PRC1 non-canoniques, ainsi que les sous-unités qui les composent. D'après (Schuettengruber et al. 2017).

est de permettre l'assemblage d'homodimères Ph-Ph favorisant la répression des gènes cibles, et la formation d'hétérodimères avec d'autres protéines également munies d'un domaine SAM (Peterson et al. 1997). C'est notamment le cas de la protéine Sexcomb on midleg (Scm) qui interagit *in vitro* avec Ph, et de Sfmbt (*Scm with four MBT (Malignant Brain Tumor)*) appartenant au complexe répresseur Pho (Pho-RC). L'enzyme dRING est une ubiquitine-ligase E3 responsable de la mono-ubiquitination de l'histone H2A (Fritsch, Beuchle, et Müller 2003). De plus, elle possède un domaine RING permettant une interaction avec Psc et un domaine RAWUL (*ring-finger and WD40-associated ubiquitin-like protein*) impliqué dans son hétérodimérisation avec Pc. Enfin, la sous-unité Psc est capable d'interagir avec dRING comme mentionné ci-dessus, afin de favoriser la réaction de mono-ubiquitination de l'histone H2A. La partie C-terminale de Psc est classifiée comme domaine désordonné. Ce domaine permet d'inhiber la transcription *in vitro* et de compacter les nucléosomes (Brunk, Martin, et Adler 1991). Enfin, Psc possède également un domaine RAWUL qui permet son interaction avec Pc.

Chez les mammifères, les gènes codant les différentes sous-unités du complexe PRC1 sont bien plus diversifiés que chez la drosophile (Fig.33) (Schuettengruber et al. 2017). La protéine Pc, appelée Chromobox (CBX) chez les mammifères, ne possède pas moins de 5 paralogues (CBX2, 4, 6, 7 et 8) ayant chacun un profil d'expression qui lui est propre ainsi qu'une localisation génomique particulière, suggérant des fonctions différentes et non redondantes pour chacune de ces protéines. De même, Ph s'est diversifié en 3 paralogues appelés Polyhomeotic Homolog (PHC) 1, 2 et 3. dRING a deux homologues : RINGA et B. Enfin, Psc possède 6 homologues chez les vertébrés appelés *Polycomb group finger* (PCGF) 1 à 6. Des analyses génomiques et protéomiques portant sur la nature du complexe PRC1 chez les mammifères montrent qu'il existe plusieurs complexes PRC1 classés en deux groupes (Gao et al. 2012). Premièrement, les complexes canoniques contiennent la protéine RINGA ou B associée à une sous-unité CBX, PHC, et PCGF2 ou 4. Les complexes canoniques cPRC1.2 et cPRC1.4 se distinguent en fonction de la sous-unité PCGF recrutée (PCGF2 ou PCGF4 respectivement) (Fig.34). De manière générale ces complexes seraient plutôt impliqués dans la régulation de la différenciation cellulaire (Morey et al. 2013; Kim et Kingston 2022).

Les complexes non-canoniques sont quant à eux plus diversifiés et peuvent contenir des facteurs de transcription se liant aux modifications post-traductionnelles des histones, ou à des enzymes capables de les déposer/effacer (Fig.34).

4.2.1.2. Les complexes PRC1 non-canoniques

Chez la Drosophile, d'autres études biochimiques ont montré que les sous-unités dRING et Psc pouvaient également être associées à la déméthylase dKDM2 indépendamment de Pc et Ph (Lagarou et al. 2008). Ce complexe appelé dRING Associated Factors (dRAF) est capable d'assurer la mono-ubiquitination d'H2A couplée à la déméthylation de H3K36me2. Par ailleurs, la dimérisation de dRING avec dKDM2 décuple son activité enzymatique, suggérant que le dépôt de H2Aub est plus important par ce complexe que par PRC1. De manière intéressante, ce complexe PRC1 non-canonique est retrouvé chez les mammifères, il s'agit du complexe BCoR (Gearhart et al. 2006). Il se compose de RING1A/B, PCGF1, KDM2B, ainsi que des facteurs BCOR, BCORL1, SKP1 et USP7.

D'autres complexes PRC1 non-canoniques ont été identifiés chez les mammifères (Fig.34) (Gao et al. 2012; Kim et Kingston 2022). A l'instar de BCoR, ils contiennent tous une sous-unité RING1 et PCGF, et sont dépourvus des sous-unités CBX et PHC. A la place, ces complexes sont caractérisés par la présence des facteurs RING1 And YY1 Binding Protein (RYBP) ou YY1 Associated factor 2 (YAF2), qui grâce à leur domaine RAWUL, sont capables d'interagir avec RINGA/B. Les interactions RINGA/B-CBX et RINGA/B-RYBP/YAF2 ciblent le même site d'interaction, elles sont donc mutuellement exclusives et ne peuvent pas coexister (Junco et al. 2013). Le complexe PRC1 non-canonique contenant PCGF6 (ncPRC1.6) est composé de différentes sous-unités capables de se lier à l'ADN, ainsi que de facteurs épigénétiques comme HDAC1 ou 2. Les complexes ncPCR1.3 et ncPRC1.5 possèdent des sous-unités communes dont AUTS2, une protéine codée par un gène fréquemment muté dans des cas de troubles autistiques. Enfin, les protéines PCGF2 et 4 semblent également capables d'interagir avec RYBP et YAF2 suggérant que les complexes non-canoniques PRC1 correspondants peuvent exister, mais leur composition reste à être identifiée (Tavares et al. 2012). En règle générale, les complexes PRC1 non-canoniques semblent plutôt impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et du métabolisme (Morey et al. 2013; Kim et Kingston 2022).

4.2.2. Le complexe PRC2

Le complexe PRC2 a été purifié et caractérisé au même moment chez la Drosophile (Jürg Müller et al. 2002) et les mammifères (Cao et al. 2002). Néanmoins, l'activité du membre

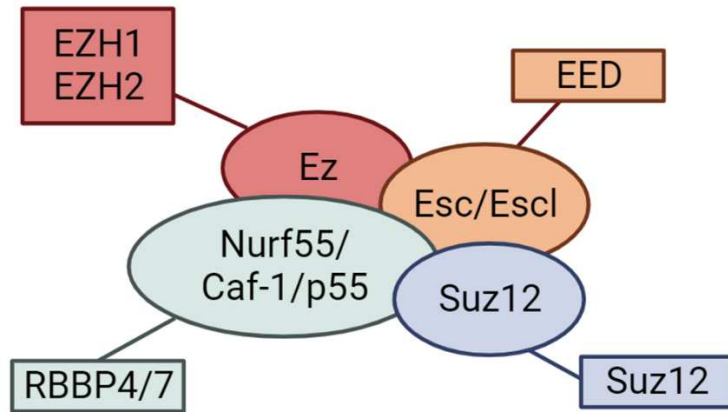


Figure 35. Les sous-unités du complexe PRC2 chez la Drosophile et leurs homologues chez les mammifères. Les cercles représentent les sous-unités chez la Drosophile alors que les rectangles représentent les homologues chez les mammifères.

fondateur de ce complexe, Enhancer of zeste (*E(z)*), a été décrite bien avant, puisque la perte du gène *E(z)* a été corrélée à la dérégulation des gènes homéotiques chez la Drosophile (R. S. Jones et Gelbart 1990).

4.2.2.1. Le complexe PRC2 canonique

A l'instar du complexe PRC1, le complexe PRC2 se compose de quatre sous-unités (Fig.35). *E(z)* est une HMT et elle est responsable du dépôt de la modification H3K27me3 via son domaine SET. La perte d'*E(z)* chez la Drosophile conduit à une dérégulation des gènes homéotiques ainsi qu'à des transformations homéotiques (R. S. Jones et Gelbart 1990). Deux homologues sont présents chez les mammifères : EZH1 qui n'est exprimée que dans les cellules en prolifération, et EZH2 qui n'est présente que dans les cellules quiescentes (Margueron et al. 2008). Aussi, l'activité HMT de *E(z)* seule est très faible ; c'est son interaction avec les autres sous-unités qui va stimuler son activité enzymatique (Nekrasov, Wild, et Müller 2005). Une autre sous-unité du complexe PRC2 chez la Drosophile est Extra Sex combs (*Esc*) qui possède un paralogue *Esc-like* (*EscI*). Ces deux protéines ne sont pas produites aux mêmes stades de développement, mais leur mutation conduit à l'apparition de transformations homéotiques (Kurzhaus et al. 2008). L'homologue chez les mammifères est Embryonic Ectoderm Development (*EED*). Ces protéines contiennent un domaine WD40 permettant la reconnaissance de la marque H3K27me3 (Margueron et al. 2009). La fonction proposée pour ce domaine est de stabiliser le complexe PRC2 à la chromatine, et de favoriser le dépôt et l'amplification de la marque H3K27me3. La troisième sous-unité du complexe PRC2 est Suppressor of zeste 12 (*Su(z)12*) qui possède un homologue *SUZ12* chez les mammifères. Tout comme pour les autres gènes codant des sous-unités de PRC2, la mutation de *Su(z)12* est associée à des transformations homéotiques (Birve et al. 2001). Enfin, la quatrième sous-unité est Nucleosome Remodeling Factor-55 (*Nurf55*, également appelée CAF-1 ou p55) (Anderson et al. 2011). Cette protéine est conservée chez les mammifères et est appelée RbAp4/7.

4.2.2.2. Protéines accessoires et complexes PRC2 non-canoniques

D'autres facteurs peuvent être associées aux sous-unités de PRC2. Ces associations dépendent du contexte chromatinien et du type cellulaire, et participeraient à un niveau de

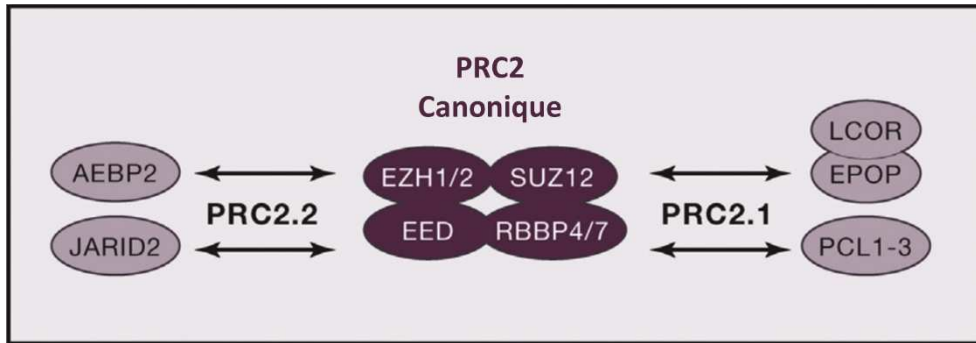


Figure 36. Le complexe PRC2 chez les mammifères. Schéma représentant le complexe PRC2 ainsi que les différentes protéines accessoires qui peuvent lui être associées. D'après (Schuettengruber et al. 2017).

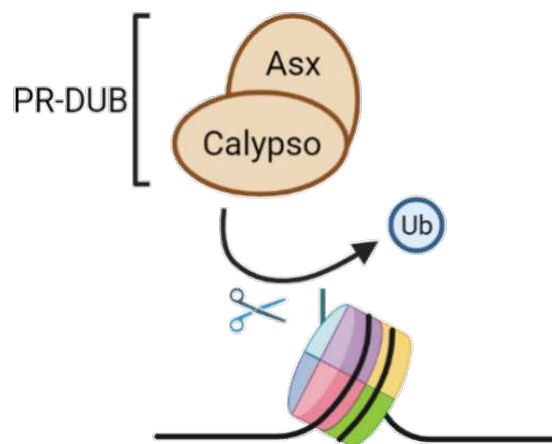


Figure 37. Le complexe PR-DUB chez la Drosophile. Le complexe PR-DUB se compose des protéines Asx et Calypso chez la Drosophile et est responsable d'éliminer la marque H2Aub.

régulation plus fin par PRC2 (Fig.36). Ainsi, Polycomb-like (Pcl) a été identifié chez la Drosophile comme participant à la répression par les PcG sur la base d'observations phénotypiques. La protéine Pcl s'associe avec E(z) grâce à deux domaines *PHD fingers* (O'Connell et al. 2001) pour d'une part stimuler son activité catalytique, et d'autre part favoriser son recrutement à la chromatine (Nekrasov et al. 2007). Le mécanisme de recrutement de E(z) par Pcl a été mieux caractérisé chez les mammifères qui possèdent 3 homologues de Pcl : PCL1, 2, et 3. En effet, ces homologues possèdent tous un domaine qui n'est pas retrouvé chez la Drosophile, il s'agit d'un domaine tudor qui permet entre autres, la reconnaissance de H3K36me3. Le recrutement de EZH2 sur les gènes transcriptionnellement actifs couplé à celui de déméthylases comme NO66 dans les cellules ES permet la répression *de novo* des gènes cibles (Brien et al. 2012). Ainsi, le complexe non-canonique PRC2.1 (Pcl-PRC2 chez la Drosophile) correspond à l'association entre PRC2 et PCL, auxquels j'ajoutent C10ORF12 et C17ORF96 chez les mammifères.

De même, un complexe PRC2.2 a été défini chez les mammifères. Il correspond à l'association de PRC2 avec deux protéines accessoires : Jumonji And AT-Rich Interaction Domain Containing 2 (JARID2) et AE Binding Protein 2 (AEBP2) (Hauri et al. 2016). JARID2 est une déméthylase de type Jumonji dont le site catalytique est inactif. Il est proposé que le site de fixation aux nucléosomes de JARID2 permettrait de stabiliser PRC2 à la chromatine par une interaction avec EZH1 (Son et al. 2013). De plus, l'interaction JARID2-EZH2 stimulerait l'activité HMT du complexe PRC2 (Sanulli et al. 2015). Concernant AEBP2, tout comme JARID2, ce facteur favoriserait l'activité catalytique de EZH1/2 tout en permettant son recrutement sur l'ADN par un domaine *zinc-finger* (Cao et Zhang 2004).

4.2.3. Les autres complexes

Si la marque H2Aub est déposée par le complexe PRC1, cette marque peut également être éliminée par un autre complexe relié aux PcG. Ainsi, l'identification du complexe PR-DUB composé de l'ubiquitine hydrolase Calypso et de la protéine Additional Sex Combs (Asx) a montré que ce complexe participait à la dé-ubiquitination de l'histone H2A (Fig.37) (Gaytán de Ayala Alonso et al. 2007). La suppression du domaine catalytique de Calypso ou la mutation de Asx conduit à une augmentation des niveaux d'H2Aub. De manière surprenante, cette augmentation est associée à une dérégulation des gènes *Hox*, suggérant que les niveaux

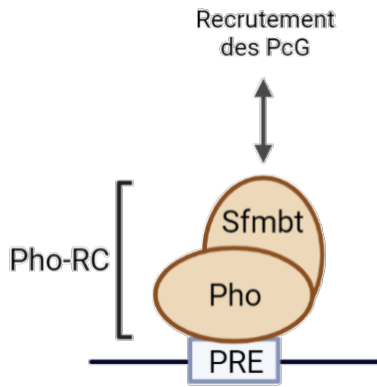


Figure 38. Le complexe Pho-RC chez la Drosophile. Le complexe Pho-RC se compose des protéines Pho et Sfmbt. Il est capable de se lier directement à l'ADN sur la séquence des Polycomb Response Element (PRE) pour y recruter d'autres protéines PcG.

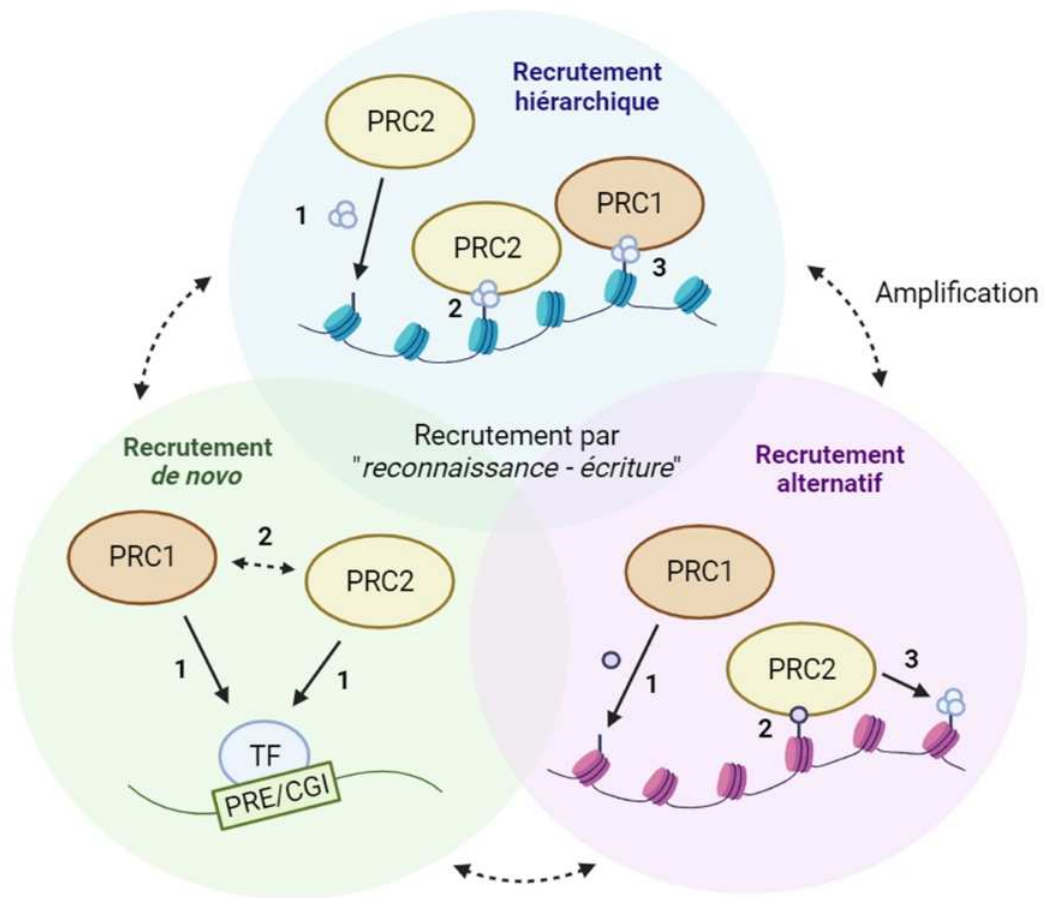


Figure 39. Modèles de recrutement du complexe Polycomb. Plusieurs scénarios ont été proposés pour le recrutement du complexe Polycomb. Le recrutement hiérarchique implique que PRC2 dépose en premier lieu la marque H3K27me3 pour ensuite permettre sa fixation à l'ADN et le recrutement de PRC1. Le recrutement alternatif est également un modèle hiérarchique non-canonique selon lequel PRC1 dépose en premier la marque H2Aub pour ensuite permettre le recrutement de PRC2 *via* cette modification. Le recrutement *de novo* fait intervenir des facteurs de transcription dont la liaison aux Polycomb Response Element (PRE) chez la Drosophile ou aux îlots CpG (CGI) chez les mammifères va permettre le recrutement de PRC1 seul, de PRC2 seul, ou des 2 complexes par des interactions protéine-protéine. Ces différents modèles sont compatibles entre eux et permettraient une amplification du recrutement de PRC1 et PRC2. Ils impliquent tous la reconnaissance d'un facteur de transcription ou d'une modification épigénétique, et aboutissent à l'écriture des marques associées à la répression par Polycomb.

d'H2Aub doivent être finement régulés pour assurer la répression par le système PcG (Scheuermann, Gutiérrez, et Müller 2012). Ce complexe PR-DUB est également retrouvé chez les mammifères.

Un autre élément participant à la répression par le complexe Polycomb est le complexe Pho-RC (Fig.38). La protéine Pho appartenant à ce complexe a tout d'abord été identifiée chez la drosophile comme facteur de transcription capable de se lier à l'ADN grâce à quatre motifs en doigt de zinc (Brown et al. 2003). L'analyse biochimique de ce facteur a permis de révéler que Pho interagit avec la protéine Sfmbt (Klymenko et al. 2006). Sfmbt possède un domaine contenant quatre MBT (*Malignant Brain Tumor*) permettant d'une part la reconnaissance des marques H3K9 et H4K20 di/triméthylées, et d'autre part l'interaction avec Pho. La mutation de ces motifs abolie l'interaction Pho-Sfmbt et conduit à la dérégulation de gènes cibles des PcG (Alfieri et al. 2013). Par ailleurs, comme évoqué plus haut, la protéine Sfmbt contient également un domaine SAM permettant une interaction avec la sous-unité Ph, suggérant que le complexe Pho-RC serait capable de recruter PRC1. A noter que Pho possède un homologue, Pho-like (Phol) qui peut également interagir avec Sfmbt. Chez les mammifères, un complexe constitué de SFMBT2 et de Castor Zinc Finger 1 (CASZ1), un facteur de transcription possédant un domaine de type doigt de zinc, a été identifié. Cela suggère que le complexe Pho-RC pourrait être conservé chez les mammifères.

4.3. Recrutement du complexe Polycomb

Les complexes PRC1 et PRC2 ne possèdent pas directement de domaine de liaison à l'ADN. Pour être recrutés au niveau de leurs gènes cibles, ces complexes requièrent d'autres éléments comme des modifications des histones, la présence de facteurs de transcription, ou celle de protéines accessoires (Fig.39). Le recrutement du complexe Polycomb se fait sur des éléments régulateurs particuliers appelés *Polycomb Response Element* (PRE) chez la Drosophile. Chez les mammifères en revanche, la fixation des PcG se fait plus particulièrement sur les îlots CpG (Kassis et Brown 2013).

4.3.1. Interdépendance des complexes PRC1 et PRC2

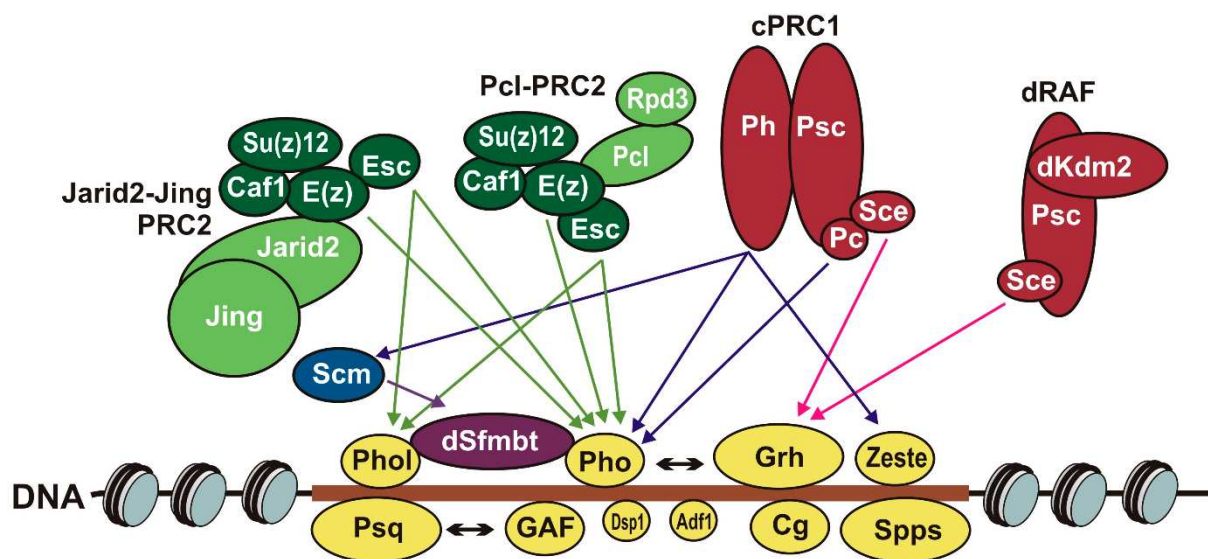


Figure 40. Les Polycomb Response Element (PRE) sont associés au recrutement de nombreux facteurs de transcription. Représentation schématique d'un PRE (marron clair) et des différents facteurs de transcription capables de s'y lier. Les flèches indiquent les interactions protéine-protéine déjà caractérisées entre les différents recruteurs et les protéines PcG. D'après (Erokhin, Georgiev, et Chetverina 2018).

Le modèle initial de recrutement du complexe Polycomb impliquait que PRC2 soit recruté le premier afin de déposer la marque H3K27me3, se stabiliser par la reconnaissance de la marque par Esc, et ensuite permettre le recrutement de PRC1 également par la reconnaissance de H3K27me3 *via* le chromodomaine de Pc (Fig.39) (Kuroda et al. 2020). Ce recrutement hiérarchique est aujourd'hui très discuté, puisque celui-ci implique une colocalisation parfaite entre PRC2 et PRC1. Or, des données de CHIP-seq pour les sous-unités de ces deux complexes montrent l'existence de sites génomiques liés uniquement par PRC1 ou PRC2 (Hauri et al. 2016). De plus, la caractérisation des sites de fixation de la grande variété de complexes PRC1 chez les mammifères indique que certains se fixent uniquement sur des sites enrichis en H3K27me3, alors que d'autres, dont les ncPRC1, en sont indépendants (Kim et Kingston 2022). Une relation de recrutement inverse a même été décrite, puisque la marque H2Aub déposée par le complexe ncPRC1 BCoR permettrait la stabilisation de PRC2 à la chromatine (Fig.39) (Blackledge et al. 2014).

4.3.2. PRE et recruteurs

Les PRE sont constitués de multiples sites de fixations associés à différents facteurs de transcription (Fig.40), et cette immense diversité de motifs rend les PRE difficiles à prédire. Néanmoins, un certain nombre de facteurs a été décrit comme requis pour l'activité des PRE dont Pho/PhoI, GAGA factor (GAF, également appelé Trl pour Trithorax like), Pipsqueak (Psq), Zeste (Z), Dorsal Switch protein 1 (Dsp1), Sp1-like factor for pairing sensitive-silencing (Spps), Combgap (Cg), ou encore Grainyhead (Grh) (Kassis et Brown 2013; Kuroda et al. 2020). L'analyse de la localisation génomique de ces facteurs a permis de mettre en évidence la complexité de leur fonctionnement, puisque la plupart d'entre eux ne se fixent pas à tous les PRE, et ne se fixent pas uniquement aux PRE. Aussi, de nombreuses interactions protéine-protéine ont été caractérisées entre les PcG et ces facteurs de transcription (Fig.40) (Erokhin, Georgiev, et Chetverina 2018). Il est admis qu'aucun de ces facteurs ne peut recruter seul le complexe Polycomb, mais c'est leur combinaison qui assure cette fonction. Aussi, il faut noter que les PRE peuvent également représenter des sites de fixation pour les TrxG. De ce fait, certains PRE peuvent aussi être considérés comme des *Trithorax Response Element* (TRE) en fonction des facteurs recrutés.

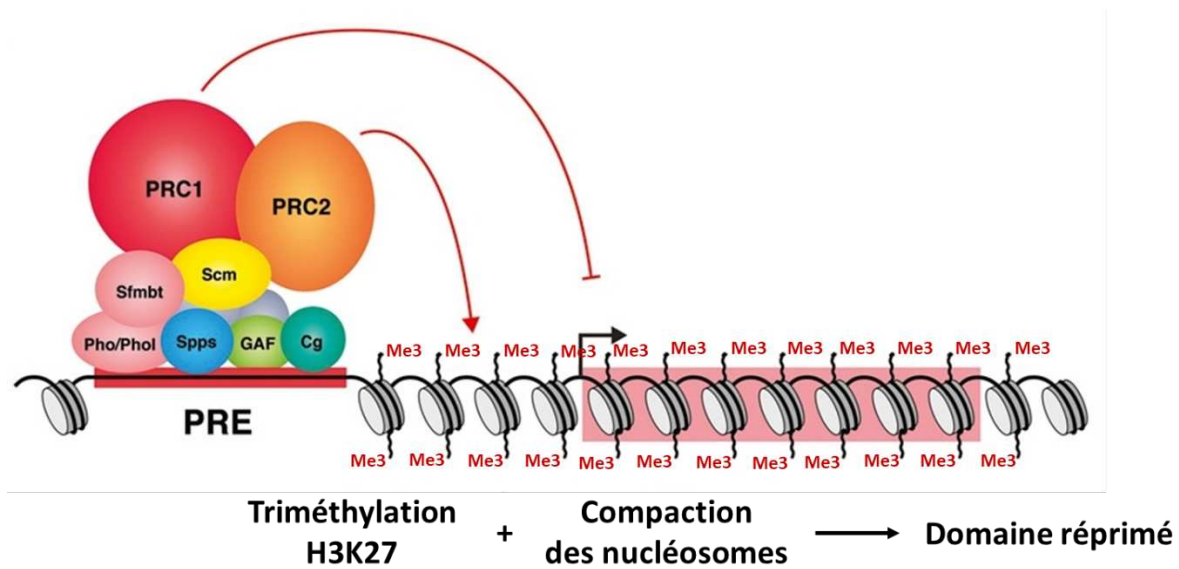


Figure 41. Mécanismes de répression de la transcription par les complexes PRC1 et PRC2. Le complexe PRC2 réprime la transcription par la déposition de la triméthylation H3K27 alors que le complexe PRC1 la réprime par compaction des nucléosomes. D'après (Kassis, Kennison, et Tamkun 2017).

Chez les mammifères, bien que certains facteurs de transcription soient capables de recruter les différents complexes Polycomb au niveau de leurs gènes cibles comme évoqué précédemment avec KDM2B, PCL, JARID2 et AEBP2, très peu de PRE ont été identifiés comme réellement capables de permettre le recrutement des PcG. A la place, les études pan-génomiques montrent que les îlots CpG hypo-méthylés présents au niveau de promoteurs sont associés au recrutement du complexe Polycomb (Fig.39) (Deaton et Bird 2011).

4.4. Régulation de la transcription par le complexe Polycomb

4.4.1. Mécanismes de répression transcriptionnelle

Bien avant que l'activité enzymatique de PRC1 ne soit décrite, son mode de fonctionnement dans la répression transcriptionnelle a été associé à la capacité de Psc à compacter les nucléosomes (Fig.41). En effet, chez la *Drosophile*, la protéine Psc seule peut compacter les nucléosomes *in vitro* (Francis et al. 2001). Chez les mammifères en revanche, cette activité est médiée par l'homologue de Pc CBX2. Le remplacement de CBX2 par RYBP n'empêche pas la compaction des nucléosomes. Ainsi, le complexe PRC1 canonique peut compacter les nucléosomes de lui-même, alors que les ncPRC1 peuvent médier cette activité probablement *via* des mécanismes indirects. De plus, la perte de dRING chez la *Drosophile* est associée à la dérégulation des gènes *Hox* et à la perte globale de H2Aub, suggérant l'implication de cette modification post-traductionnelle dans la répression (Gutiérrez et al. 2012). Néanmoins, des études portant sur un mutant portant un allèle codant pour une forme catalytique inactive de dRING indique que l'activité de mono-ubiquitination n'était pas requise pour la répression des gènes *Hox*, et qu'aucune transformation homéotique n'était observée malgré la perte totale de H2Aub (Pengelly et al. 2015). De plus, l'analyse de lignées mutantes au sein desquels les histones et variants de H2A ne peuvent plus être ubiquitinés montre que cette fonction n'est pas requise pour la répression par les PcG dans le disque imaginal d'aile (Pengelly et al. 2015). Cependant, il est à noter que la mutation de la lysine 118 de H2A en arginine est létale chez la *Drosophile*. Ainsi, ces résultats indiquent que la marque H2Aub n'est pas requise pour la répression transcriptionnelle médiée par PRC1. La fonction de cette marque épigénétique reste encore à être élucidée.

Concernant le complexe PRC2, son activité répressive chez la *Drosophile* est entièrement due à la triméthylation du résidu H3K27 par E(z) (Fig.41). En effet, l'expression

d'une forme catalytiquement inactive de E(z) ou la mutation ponctuelle de la lysine 27 de l'histone H3 suffit à rompre la répression des gènes *Hox* et à récapituler les phénotypes du mutant *E(z)* (Jürg Müller et al. 2002). De même, la mutation ponctuelle du résidu H3K27 récapitule également les phénotypes observés chez les mutants PRC2, démontrant le rôle central du dépôt de la marque H3K27me3 dans la répression médiée par PRC2 (Pengelly et al. 2013). Pour être optimale, l'activité catalytique de PRC2 requière *a minima* l'assemblage de E(z) avec Su(z)12 et Esc. Le dépôt de la marque H3K27me3 prévient le dépôt de son antagoniste H3K27ac et bloque également le recrutement de l'ARN Pol II. Chez les mammifères, la délétion de EZH2 suffit à réduire drastiquement les niveaux de H3K27me3 alors que celle de EZH1 n'a que très peu d'effet sur cette marque. EZH1 est effectivement capable d'induire la répression transcriptionnelle indépendamment de son activité catalytique en compactant les nucléosomes ce qui nécessite l'assemblage de EZH1 avec l'ensemble des sous-unités de PRC2 (Margueron et al. 2008). Caractérisé *in vitro*, ce mécanisme a également été observé *in vivo* par une diminution de l'accessibilité de la chromatine suite au recrutement artificiel du complexe PRC2 contenant EZH1 (Holoch et al. 2021).

4.4.2. Mécanismes d'activation transcriptionnelle

Si l'activité de régulation de la transcription par les complexes Polycomb a été principalement associée à la répression, de récentes études révèlent que les composants de PRC1 peuvent également lier des gènes activement transcrits, indépendamment de PRC2, et contribueraient à leur activation (Pemberton et al. 2014; Loubiere et al. 2020; Pherson et al. 2017; Schaaf et al. 2013; Morey et al. 2015; Cohen et al. 2018; 2019), pour revue voir (Giner-Laguarda et Vidal 2020). Ces études montrent que PRC1 se lie à des promoteurs et des *enhancers* actifs chez la Drosophile et les mammifères, bien que les mécanismes d'activation transcriptionnelle mis en jeu ne soient pas encore bien compris. En ce sens, les PRE peuvent agir *in vivo* comme *enhancer* dans certaines cellules, ou comme *silencer* dans d'autres. Ces éléments régulateurs ont donc le potentiel de réguler finement l'expression des gènes de manière spatio-temporelle (Erceg et al. 2017). A noter que chez la Drosophile, la fixation de PRC1 sur des gènes actifs n'est pas observée dans l'embryon, mais seulement au sein de tissus

larvaires comme les disques imaginaux, suggérant que cette fonction ne pourrait apparaître qu'à des moments précis du développement (Loubière et al. 2016).

Chez les mammifères, différents mécanismes ont été proposés pour expliquer l'activation des gènes cibles de PRC1. Premièrement, un changement de sous-unité au sein du complexe PRC1 est requis pour activer la transcription. Ce phénomène intervient notamment lors de la différenciation des ESC. Le remplacement de CBX7 par CBX8 initie l'activation de gènes développementaux conduisant vers une identité de cellules ectodermique (Creppe et al. 2014), alors que le remplacement de CBX7 par CBX2 conduit à l'activation de gènes impliqués dans le développement du système cardio-vasculaire (Morey et al. 2015). Ensuite, l'association de PRC1 avec d'autres cofacteurs peut influencer ses capacités à réguler la transcription. L'association du complexe ncPRC1.5 avec Activator of transcription and developmental regulator 2 (AUTS2) peut conduire au recrutement de l'activateur transcriptionnel CBP (Gao et al. 2014). La modification post-traductionnelle de sous-unités de PRC1 régulerait également l'activité du complexe. Ainsi, la phosphorylation de RING1B par la Casein kinase 2 (CK2) conduirait à l'activation de la transcription des gènes cibles (Gao et al. 2014). Enfin, PRC1 pourrait participer à l'activation transcriptionnelle par la modification de la topologie du génome. Ce mécanisme reposerait sur le rapprochement d'éléments régulateurs et de promoteurs. Par exemple, l'activation de *Meis2* lors du développement du cerveau nécessiterait un rapprochement entre un *enhancer* et le promoteur de ce gène de manière dépendante de RING1B (Kondo, Ito, et Koseki 2016). De façon similaire, les résultats obtenus chez la Drosophile suggèrent que PRC1 participerait à l'activation de gènes développementaux en favorisant des interactions promoteurs-*enhancers* (Loubière et al. 2020; Gutierrez-Perez et al. 2019)

4.5. Fonctions biologiques du complexe Polycomb

4.5.1. Pluripotence et différenciation

Les complexes PRC1 et PRC2 ont tout d'abord été décrits pour leur rôle dans la détermination de l'identité segmentaire au cours de l'embryogenèse à la fois chez la Drosophile et les mammifères (E. B. Lewis 1978). Ainsi, la plupart des premières études se sont concentrées sur le rôle des PcG dans la régulation de l'identité cellulaire. Des ESC déficientes pour PRC1 échouent à maintenir leur pluripotence et montrent une activation de gènes

développementaux (Endoh et al. 2008). De plus, un changement de la sous-unité CBX7 au profit de CBX2, 4 et 8 s'exerce au cours de la différenciation des ESC. En effet, si CBX7 réprime les gènes de la différenciation, CBX2/4/8 favorisent la différenciation en réprimant les gènes de la pluripotence (Klauke et al. 2013; O'Loghlen et al. 2012). Les différents gènes codant les sous-unités CBX s'expriment selon des patrons différents, conduisant à une spécialisation de l'identité cellulaire dépendante des gènes ciblés par chacune de ces protéines.

Tout comme PRC1, PRC2 est également décrit pour réguler l'identité cellulaire. La déplétion de EED dans des ESC conduit à la dérégulation de gènes développementaux, suggérant un rôle de PRC2 dans le maintien de la pluripotence (Boyer et al. 2006). Néanmoins, la perte de PRC2 peut induire également une dérégulation de gènes de la pluripotence. Il en résulte une absence de différenciation, indiquant que la dérégulation des gènes de la pluripotence prime sur celle des gènes développementaux (Margueron et Reinberg 2011).

4.5.2. Rôle dans la tumorigenèse

Conformément à leur rôle de maintien du programme transcriptionnel et de l'identité cellulaire, des perturbations dans la régulation de la transcription par les protéines PcG sont associées au développement d'un état tumoral (Parreno, Martinez, et Cavalli 2022). Chez la Drosophile, la délétion de PRC1 dans le disque imaginal d'œil, mais pas de PRC2, conduit à une prolifération massive des cellules mimant l'apparition de tumeurs (Loubière et al. 2016). Dans ce tissu, PRC1 agit donc comme suppresseur de tumeur. A l'inverse, chez les mammifères, CBX7 joue un rôle déterminant dans la régulation de la prolifération des cellules souches. Son expression est positivement corrélée à l'apparition de cancers dont des leucémies (Klauke et al. 2013). Cette activité oncogène est notamment due à la répression de INK4A/ARF par CBX7, un locus responsable de l'induction de la sénescence et de l'apoptose.

PRC2 a également été initialement décrit comme oncogénique puisque de hauts niveaux de EZH2 et H3K27me3 sont un marqueur de métastase dans le cas de cancers de la prostate (S. H. Park et al. 2021). De même, des mutations du domaine catalytique de EZH2 provoquant une augmentation de son activité sont associées au développement de leucémies et de lymphomes (Morin et al. 2010; Sneeringer et al. 2010). Le domaine catalytique de EZH1/2 représente de ce fait une cible d'intérêt pour le développement d'inhibiteurs pharmacologiques et le traitement de certains cancers (Morin et al. 2010; Xiaojuan Yang, Xu,

et Yang 2023). Au contraire, dans d'autres tissus dont le cerveau, la perte de PRC2 *via* la mutation des sous-unités EZH2, EED ou SUZ12 est corrélée au développement de tumeurs cérébrales très agressives et caractérisées par de faibles niveaux de H3K27me3 (Lee et al. 2014). PRC2 semble donc avoir des fonctions suppresseurs de tumeurs ou oncogéniques, selon les types de cancers.

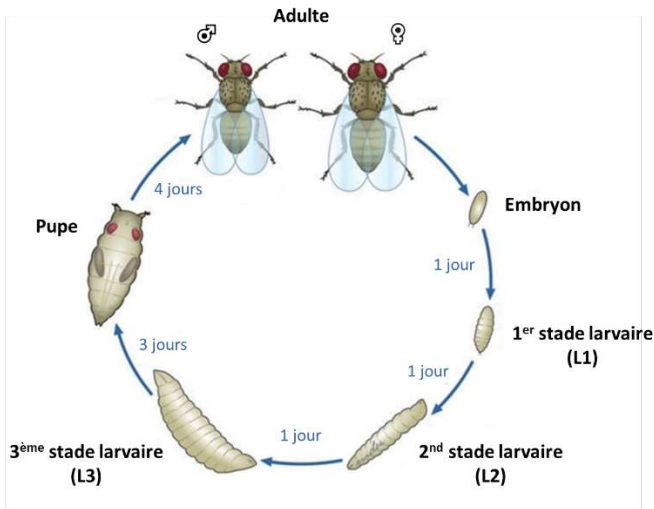


Figure 42. Cycle de développement de *Drosophila melanogaster*. Schéma représentant le développement de la Drosophile à 25°C. Les différents stades développementaux ainsi que la durée nécessaire pour passer de l'un à l'autre sont indiqués. D'après (Ong et al, 2014).

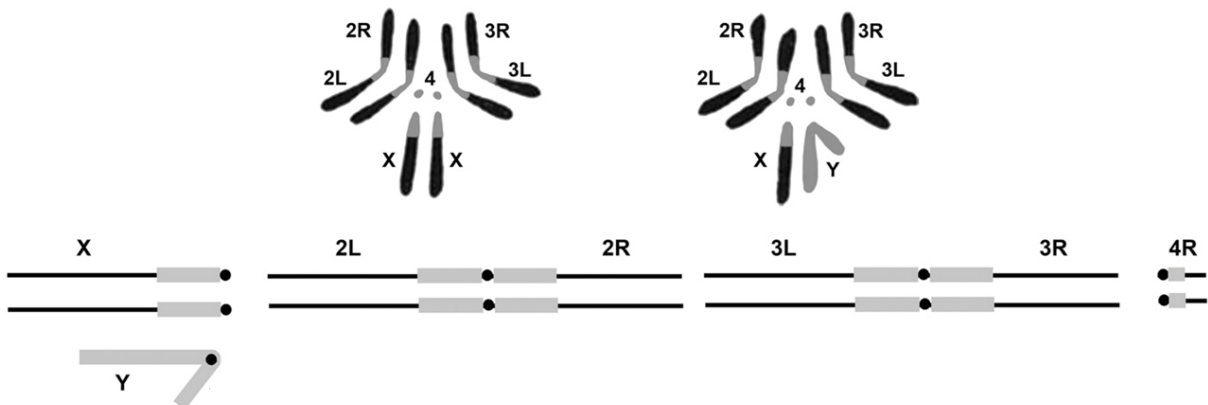


Figure 43. Les chromosomes de *Drosophila melanogaster*. Schéma représentant les 4 paires de chromosomes de la Drosophile. Pour chaque paire, les bras gauches et droits sont respectivement désignés par L (left) et R (right). Les portions euchromatiques sont représentées en noire, les portions hétérochromatiques par des portions grises, et les centromères par des ronds. D'après (Kaufman 2017).

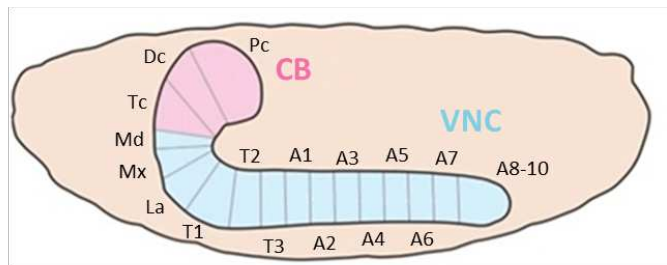
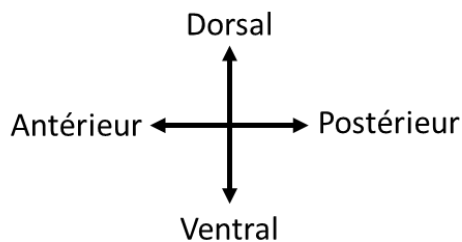


Figure 44. Organisation du système nerveux central (SNC) embryonnaire de la Drosophile. Schéma du SNC en fin d'embryogenèse. Il se compose du cerveau central (CB) et de la corde nerveuse ventrale (VNC). A elles-deux, ces structures se composent de 19 neuromères selon l'axe antéro-postérieur. D'après (Crews 2019).

5. LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL DE LA DROSOPHILE

5.1. Le modèle *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster, plus communément appelée mouche du vinaigre, est un organisme modèle très populaire chez les généticiens depuis le début du XX^{ème} siècle. En effet, cet insecte possède de nombreux avantages et est à l'origine d'avancées majeures notamment dans les domaines liés à la génétique ou au contrôle du développement. Son cycle de développement est très court puisqu'il faut compter environ 10 jours à 25°C pour passer de l'œuf au stade adulte. Il se divise en plusieurs stades, avec dans l'ordre : le développement embryonnaire, 3 stades larvaires, le stade pupal (durant lequel se déroule la métamorphose), puis le stade adulte (Fig.42). D'autre part, l'entretien des lignées s'effectue dans un espace réduit et à moindre coût. De nombreuses lignées génétiquement modifiées (mutantes ou transgéniques) ont été générées et sont partagées par la communauté. En effet, des centres de distribution assurent l'entretien et le partage de ces outils.

Le génome de la Drosophile a été entièrement séquencé au début des années 2000 (Adams et al. 2000). Cela a été grandement facilité par sa petite taille : quatre paires de chromosomes (3 paires d'autosomes et 2 chromosomes sexuels, X et Y) (Fig.43) pour une taille totale d'environ 150Mb et comprenant environ 17 000 gènes. A noter qu'environ 75% des gènes humains associés à des maladies possèdent un orthologue chez la Drosophile. De ce fait, cet organisme est un modèle de choix pour l'étude de maladies cardiovasculaires, musculaires, métaboliques, ou neurodégénératives ainsi que différents cancers (Bilen et Bonini 2005; Verheyen 2022)

5.2. Développement et organisation du système nerveux central

Chez la drosophile, le SNC est un organe segmenté chez l'embryon dont chaque segment est appelé neuromère (Fig.44) (Crews 2019). Le SNC est alors divisé en deux parties : le cerveau central (CB pour *central brain*) composé de 3 neuromères, et la corde nerveuse ventrale (VNC pour *ventral nerve cord*) qui en compte 16. Une 3^{ème} structure se différencie pendant le premier et le second stades larvaires, il s'agit des lobes optiques (OL pour *optic*

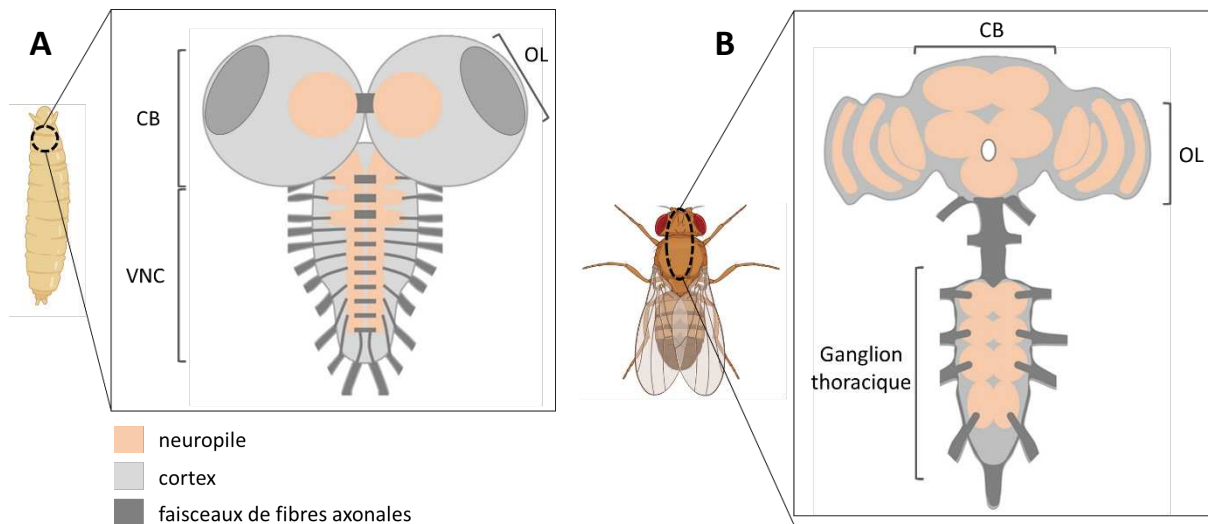


Figure 45. Comparaison du système nerveux central larvaire et adulte. (A) Schéma du SNC de larve L3. Il se compose de la VNC et du CB, divisé en deux hémisphères. Chaque hémisphère compte un lobe optique. (B) Schéma du SNC chez l'adulte. Ils se compose du CB, de deux lobes optiques, et du ganglion thoracique qui s'est formé à partir de la VNC. CB : cerveau central ; OL : lobe optique ; VNC : corde nerveuse ventrale.

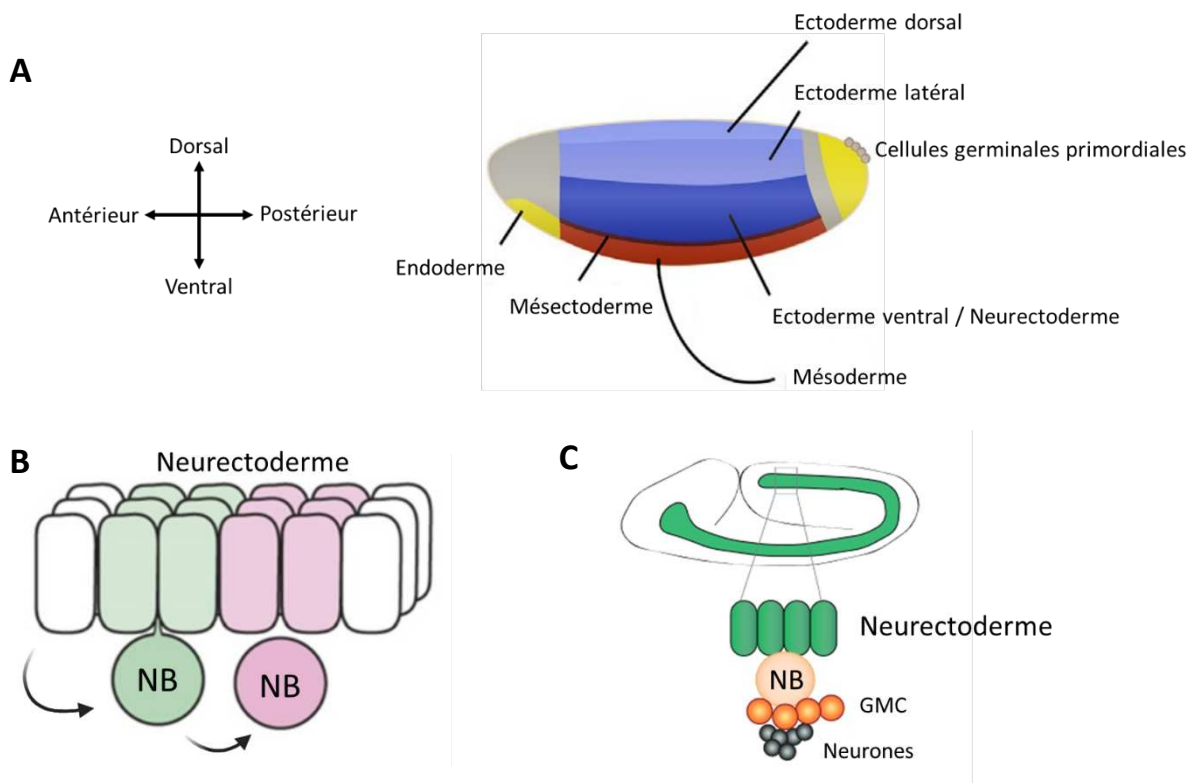


Figure 46. La spécification des neuroblastes. (A) Schéma d'un embryon de *Drosophila* au stade 5 représentant les différents feuilletts embryonnaires. (B) Schéma montrant la délamination des neuroblastes (NB) à partir du neurectoderme. (C) Schéma d'un embryon au stade 11 montrant la localisation du neurectoderme ainsi que l'organisation d'un neuroblaste et des cellules progénitrices de cellules nerveuses et des neurones issus de sa division. GMC : ganglion mother cell. D'après (Crews 2019).

lobe) qui vont être à l'origine du système visuel chez l'adulte (Fig.45A). D'un point de vue histologique, le SNC se divise en deux zones : le cortex où réside l'ensemble des corps cellulaires, et le neuropile qui se compose des projections axonales et dendritiques formant les différents réseaux neuronaux. Si le développement embryonnaire du SNC représente un évènement relativement stéréotypé aboutissant à environ 15 000 cellules, la métamorphose de la larve en adulte conduit au développement d'un organe bien plus complexe dont le nombre de cellules dépasse 150 000. A noter que chez l'adulte, la VNC devient le ganglion thoracique, un équivalent fonctionnelle de la moelle épinière chez les mammifères (Fig.45B).

5.3. Composition cellulaire du système nerveux central

5.3.1. Les neuroblastes

Les cellules souches neuronales chez la *Drosophile* sont appelés neuroblastes (NB) (K. H. Kang et Reichert 2015). Ces cellules se spécifient à partir du neurectoderme (Doe 1992), correspondant à la partie ventro-latérale du blastoderme cellulaire embryonnaire, et sont à l'origine de l'ensemble du SNC (Fig.46). A noter que les cellules médianes du SNC sont une exception, puisqu'elles ont pour origine le mésectoderme (Wheeler, Stagg, et Crews 2008), une région limitant le neurectoderme du mésoderme ventral. Les NB émergent du neurectoderme tout au long de l'axe antéro-postérieur entre les stades embryonnaires 8 et 11, et vont s'internaliser par délamination (Fig.46).

Les NB se divisent de manière asymétrique afin d'assurer d'une part leur renouvellement, et d'autre part la formation de cellules nerveuses (Homem, Repic, et Knoblich 2015). Trois types de NB se distinguent en fonction de l'issue de leur division asymétrique (Fig.47). La division de type I produit un NB et une *Ganglion Mother Cell* (GMC) qui à son tour se divisera de manière asymétrique en deux neurones. Ce mode de division concerne la plupart des NB du SNC. La division de type II conduit à la formation d'un NB et d'un progéniteur neuronal intermédiaire (INP pour *intermediate neural progenitor*). Les INP ont la capacité de se renouveler par division environ 5 fois, générant en parallèle des GMC à l'image des NB de type I (Bello, Holbro, et Reichert 2007; Boone et Doe 2008). La division de type II ne concerne qu'une population restreinte de NB présents au nombre de 8 par hémisphère du CB. Lors du développement, certains NB vont passer d'une division de type I à une division de type 0. Ce dernier mode de division conduit à la production d'un NB et

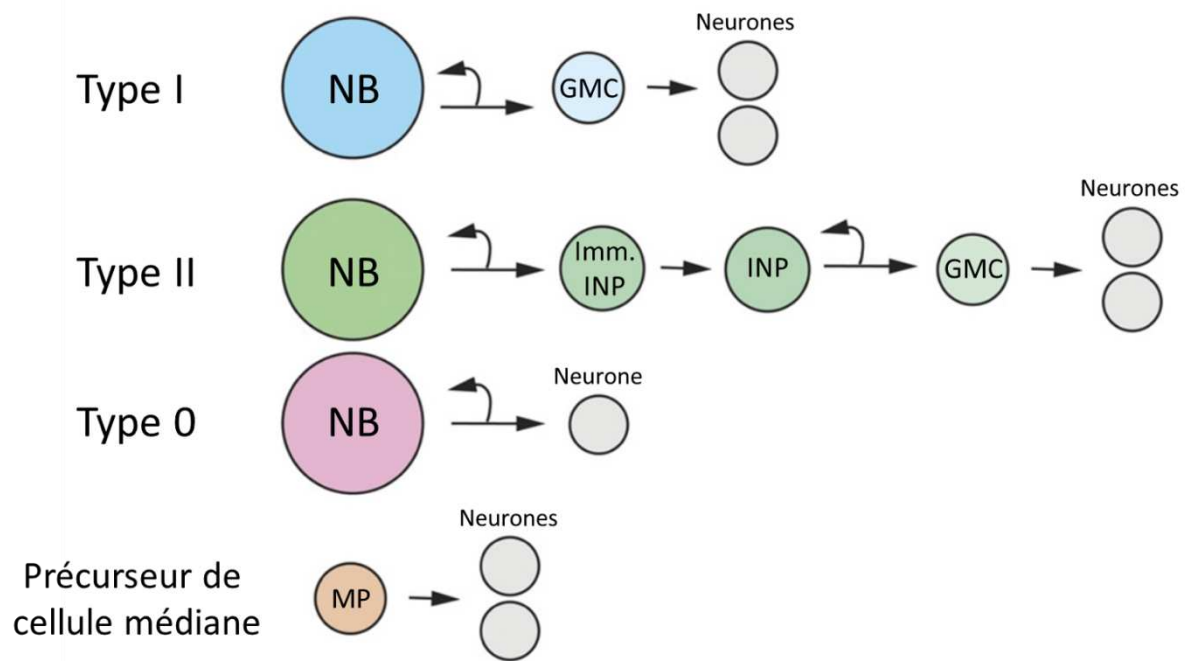


Figure 47. Les différents modes de division des neuroblastes (NB) Les NB sont classifiés en trois groupes selon leurs modalités de divisions qui permettent leur renouvellement, la production de neurones (ou de cellules gliales), ou de cellules intermédiaires. GMC : ganglion mother cell ; INP : progéniteur neuronal intermédiaire ; Imm. : immature ; MP : précurseur de cellule médiane. D'après (Crews 2019).

directement d'un neurone (Baumgardt et al. 2014). A noter également que les cellules précurseurs de la ligne médiane (*Midline precursors*) ne se divisent qu'une seule fois, à l'image des GMC, pour former deux neurones (Wheeler et al. 2006).

L'identité et les cellules filles de chaque NB dépendent de sa localisation au sein des différents neuromères. Les NB de type I peuvent générer entre 4 et 36 neurones alors que ceux de type II en génèrent plus de 50. Cette hétérogénéité dépend du nombre de GMC générées, de la fenêtre de différenciation, et du moment où un NB adopte la division de type 0. Cette fenêtre de compétence dépend de l'expression de différents facteurs de transcription exprimés en cascade temporelle au fil des divisions asymétriques (Brody et Odenwald 2000; Isshiki et al. 2001; Maurange 2020). Ces facteurs sont eux même contrôlés par d'autres facteurs comme les gènes *Hox*, la signalisation Notch, les facteurs de transcription Distal-antenna (*Dan*) et Distal-antenna related (*Danr*), ou encore le complexe Polycomb (Crews 2019).

5.3.2. Les neurones

Les neurones de la *Drosophile* possèdent une morphologie et des caractéristiques électrophysiologiques similaires aux neurones mammifères. Une stimulation génère un potentiel d'action basé sur un échange d'ions Na^+/K^+ . La communication synaptique est également extrêmement conservée puisqu'elle met en jeu des neurotransmetteurs connus chez les mammifères comme le glutamate, l'acétylcholine, la dopamine, ou l'acide γ -aminobutyrique (GABA).

La différenciation des neurones s'effectue suite à la division asymétrique d'une GMC, qui produit deux neurones différents (Spana et Doe 1996). Ce processus implique l'acquisition de la morphologie du neurone, la guidance axonale, l'établissement de synapses, et la production de canaux ioniques, de neurotransmetteurs, et de récepteurs aux neurotransmetteurs. Ces propriétés extrêmement variées suggèrent qu'un très large panel de gènes contrôle la différenciation neuronale. L'une des premières signalisations impliquées dans cette différenciation est la voie Notch. En effet, la division asymétrique d'une GMC produit une cellule « Notch ON » et une cellule « Notch OFF » (Spana et Doe 1996).

Le SNC se compose d'une grande diversité de neurones différenciés dont les neurones à neurotransmetteurs, tous caractérisés par au moins un gène impliqué dans la production ou

le transport de leur propre neurotransmetteur, comme les neurones cholinergiques (ChAT+ pour Choline acetyltransferase), GABAergique (Gad1+ pour Glutamic acid decarboxylase 1), glutamatergique (VGlut+ pour Vesicular glutamate transporter), et monoaminergique (Ddc+ pour Dopa decarboxylase / Trhn+ pour Tryptophan hydroxylase neuronal / Vmat+ pour Vesicular monoamine transporter ; en fonction du neurotransmetteur monoaminergique produit) (Brunet Avalos et al. 2019). Les neurones peptidergiques représentent une famille de neurones impliqués dans un nombre important de fonctions biologiques par la sécrétion d'hormones et de neuropeptides variés. Ils assurent une réponse aux fluctuations environnementales et permettent de réguler par exemple la prise alimentaire, le cycle circadien, ou le comportement reproductif. Si aucun facteur n'a encore été clairement identifié pour leur différenciation, les neurones peptidergiques sont néanmoins caractérisés par la présence de la protéine Dimmed, un facteur de transcription de type basic helix-loop-helix (bHLH) (Hewes et al. 2003). Un autre type notable de neurone est le motoneurone qui, chez la Drosophile, ne provient pas d'une population précise de NB ayant un destin de motoneurone. Généralement, la GMC à l'origine d'un motoneurone produit en parallèle un interneurone. Les motoneurones projettent à l'extérieur du SNC et vont innover les muscles en formant des jonctions neuromusculaires et participent de ce fait à la locomotion. Ces neurones particuliers sont pour la plupart caractérisés par l'expression du facteur de transcription Zn finger homeodomain 1 (Zfh1) (Layden et al. 2006) et des molécules d'adhésion Fasciclin (Fas) 2 et 3 (Zarin et al. 2014).

5.3.3. Les cellules gliales

Tout comme chez les mammifères, différents types de cellules gliales ont été caractérisés chez la Drosophile en fonction de leur morphologie et de leur relation avec les neurones, et elles sont caractérisées par l'expression des facteurs de transcription Glial cell missing (Gcm) et Reversed polarity (Repo) (Freeman 2015; Freeman et al. 2003). L'ontogénèse des cellules gliales repose sur des précurseurs appelés neurogliaoblastes (NGB) et glioblastes (GB). Ces cellules ont le potentiel de se diviser à la fois en neurones et en cellules gliales pour les NGB et seulement en cellules gliales pour les GB (Altenhein, Cattenoz, et Giangrande 2016). Toutes les cellules gliales (sauf la glie médiane) dérivent de cellules exprimant *gcm*, le régulateur clé du destin glial, puisque sa perte conduit les NGB vers un destin neuronal

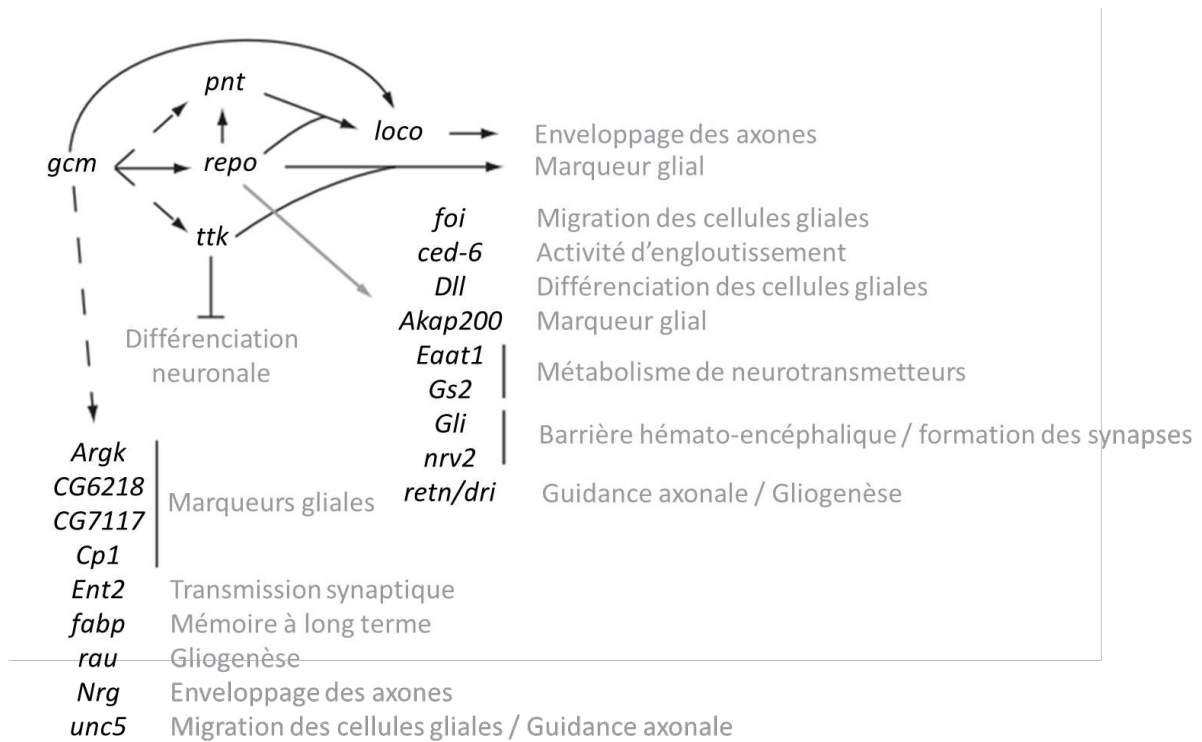


Figure 48. Les cibles de *gcm*. Schéma représentant les cibles directes (flèches pleines) et indirectes (flèches en pointillés) de *gcm* et de ses effecteurs. Les termes en gris sont les termes de Gene Ontology associés aux gènes identifiés. D'après (Altenhein, Cattenoz, et Giangrande 2016).

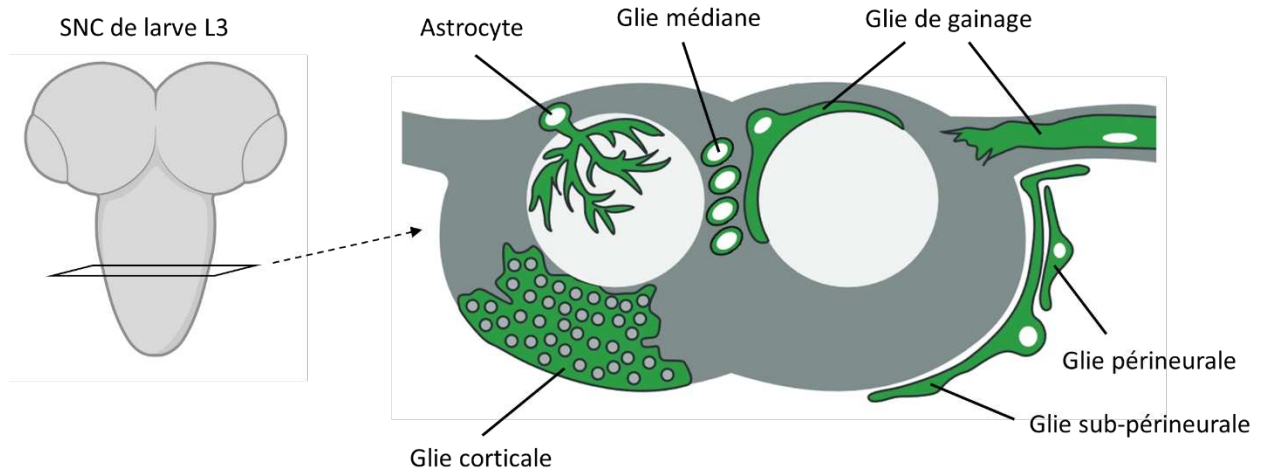


Figure 49. Diversité et localisation des cellules gliales chez la *Drosophile*. Schéma d'une coupe transversale de la corde nerveuse ventrale au stade larvaire L3 montrant la localisation et la morphologie des différentes cellules gliales (en vert). D'après (Freeman 2015).

(Hosoya et al. 1995; B. W. Jones et al. 1995; Vincent, Vonesch, et Giangrande 1996). A l'inverse, son expression ectopique dans l'ensemble du SNC induit une différenciation des précurseurs vers le destin glial. Ce facteur de transcription active l'expression de gènes en aval dont *tramtrack (ttk)* qui va inhiber l'identité neuronale, ainsi que *repo* et *pointed (pnt)* qui vont favoriser la différenciation en cellule gliale (Fig.48). Ensuite, un haut niveau de Repo stabilise le destin glial et conduit à la dégradation de Gcm (Altenhein, Cattenoz, et Giangrande 2016).

Parmi les cellules gliales différenciées et fonctionnelles, les cellules gliales périneurales (PG pour *perineural glia*) et sub-périneurales (SPG pour *sub-perineural glia*) représentent les cellules les plus externes du SNC (Fig.49). Les PG sécrètent une couche de carbohydrates qui recouvre et protège le SNC et les nerfs périphériques. Cette couche est renforcée par les SPG qui recouvrent également l'entièreté du SNC et forment la barrière hématoencéphalique chez la Drosophile (BBB pour *Blood Brain Barrier*) (Carlson et al. 2000). Du fait de leur localisation périphérique, ces cellules n'établissent que très peu de contacts avec les neurones en comparaison avec les cellules gliales présentes plus profondément dans le SNC.

Parmi les cellules gliales associées aux neurones, les types cellulaires majoritaires sont les astrocytes, la glie corticale (*cortex glia*), la glie de gainage (*ensheathing glia*), et la glie médiane (*midline glia*) (Fig.49). Ces cellules assurent le développement des circuits neuronaux, leur fonctionnement, leur plasticité, ainsi que leur dégénérescence. Les astrocytes se situent à l'interface entre cortex et neuropile (Stork et al. 2014). Ils participent à la nutrition des cellules nerveuses et au nettoyage de l'espace synaptique en exprimant des enzymes impliquées dans le catabolisme de différents neurotransmetteurs comme le glutamate et le GABA (Rival et al. 2004; Stork et al. 2014). Cette activité est nécessaire au bon fonctionnement des circuits neuronaux puisqu'une absence de clairance des neurotransmetteurs synaptiques par les astrocytes conduit à des conséquences drastiques sur le comportement et la mobilité des mouches. De plus, lors de la métamorphose, les astrocytes développent une intense activité phagocytaire leur permettant d'éliminer les nombreux débris de neurones entrés en apoptose pour laisser place aux circuits neuronaux adultes, comme observé au sein du corps pédonculé (Watts et al. 2004). La glie corticale, située dans le cortex, entoure quant à elle l'ensemble des corps neuronaux (Awasaki et al. 2008). Elle communique également avec les SPG et permet probablement de conduire des nutriments de l'hémolymph vers les cellules du SNC. Divers résultats supportent également un rôle de la glie corticale dans le contrôle de

la prolifération des NB (Dumstrei, Wang, et Hartenstein 2003). La glie de gainage s'étend le long des neuropiles et subdivise le SNC en différents compartiments distincts, séparant notamment la zone corticale des neuropiles (Hartenstein 2011). Ces cellules sont nécessaires à la bonne localisation des NB et des neurones. Lors de la différenciation d'un NB en neurone, son axone va se diriger vers le neuropile et être immédiatement mis en contact avec la glie de gainage (Dumstrei, Wang, et Hartenstein 2003).

Enfin, la glie médiane n'est pas définie par l'expression de *gcm* et *repo*, mais par celle du facteur de transcription Single minded (Sim) dans le méséctoderme (Nambu et al. 1991). La glie médiane est requise pour le développement des connexions neuronales au sein de la VNC dès le stade embryonnaire (Crews 2010). Ces cellules représentent un centre de signalisation crucial pour le développement neuronal, puisqu'elles expriment les ligands Sli et Netrin (Net), tous deux requis pour la guidance axonale le long de la ligne médiane (Dickson et Gilestro 2006; Garbe et Bashaw 2004). Ces deux ligands interagissent respectivement avec les récepteurs Roundabout (Robo) dans le cas de Sli, et Deleted in Colorectal Cancer (DCC), Down's syndrome cell adhesion molecule (Dscam) et UNC-5 pour Net. La glie médiane exprime également l'Epidermal Growth Factor Receptor (Egfr). L'activation de la signalisation Egfr par le ligand Spitz (Spi) permet la différenciation des neurones latéraux, démontrant également un rôle de la glie médiane dans le contrôle de l'identité neuronale (Estes, Fulkerson, et Zhang 2008).

6. OBJECTIFS DU PROJET DE THESE

Alors que les enzymes TET sont principalement décrites pour leur fonction de déméthylation des 5mC sur l'ADN, de récentes études suggèrent que ces enzymes peuvent également agir par des voies non-canoniques. L'objectif de mes travaux de thèse a été d'approfondir la caractérisation de ces fonctions originales en tirant profit de la Drosophile dont le génome est globalement dépourvu de 5mC. De ce fait, cet organisme représente un modèle de choix pour étudier les fonctions des enzymes TET au-delà de leur capacité à oxyder la marque 5mC.

Chez la Drosophile, le mode d'action de TET a principalement été associé à la déméthylation de la marque 6mA. Néanmoins, les nombreuses controverses liées à la caractérisation de cette marque épigénétique, qui est très rare chez les métazoaires et dont la détection est associée à de nombreux biais, nous ont incités à réévaluer sa présence au sein du génome de la Drosophile par des méthodes indépendantes de l'utilisation d'anticorps ainsi qu'à réexaminer le rôle potentiel de TET dans l'élimination de cette marque. De plus, l'étude d'un mutant *Tet* dépourvu d'activité catalytique nous a permis d'évaluer l'importance fonctionnelle de l'activité catalytique de cette enzyme chez la Drosophile. Nous avons ensuite cherché à comprendre comment TET peut réguler l'expression des gènes dans le SNC de la larve de drosophile et notamment quels mécanismes sont mis en jeu pour l'activation de la transcription indépendamment de son activité enzymatique. Ces travaux nous ont amené à analyser la relation moléculaire entre TET et les complexes PRC1 et PRC2.

Résultats

1. La marque 6mA est rare dans le génome de la Drosophile et n'est pas effacée par la dioxygénase TET

Depuis 2015, différentes études ont détecté la présence de la marque 6mA au sein du génome de différents métazoaires incluant la souris, *C. elegans*, et la Drosophile (Boulias et Greer 2022). Chez la Drosophile, plusieurs études soutiennent que la marque 6mA est présente sur le génome et associent son élimination aux dioxygénases de la famille TET (Ismail et al. 2019; Yao et al. 2018; G. Zhang et al. 2015). Cependant, l'importance de cette modification et de son rôle en tant que marque épigénétique est controversée chez les métazoaires, puisque différentes études remettent en cause les méthodes employées pour détecter la marque 6mA (O'Brown et al. 2019; Douvlataniotis et al. 2020; Kong et al. 2022). Parmi les techniques couramment employées pour détecter les 6mA, le Dot-Blot et le DIP-seq sont des méthodes dépendantes d'anticorps dont la spécificité est insuffisante pour une détection fidèle de la marque chez des organismes présentant des taux très faibles de 6mA. La spectrométrie de masse quant à elle, est une méthode très sensible qui permet une estimation précise et sans ambiguïté des niveaux de 6mA, mais la contamination des échantillons par de l'ADN bactérien riche en 6mA peut fausser les résultats. Enfin, la technologie SMRT-seq discrimine lors du séquençage les bases modifiées des bases non modifiées permettant leur détection et leur localisation à la base près, mais est sujette à un taux de faux positifs élevé lorsque la modification est rare.

Dans cette étude (en revue à eLife), nous avons ré-évalué la présence de la marque 6mA dans le génome de la Drosophile ainsi que le rôle potentiel de TET dans l'élimination de cette marque. Nos résultats de UHPL-MS/MS montrent qu'en conditions axéniques, les taux de 6mA sont très faibles (de l'ordre de 0.0001% 6mA/A, soit quelques centaines de bases méthylées par copie de génome) dans différents tissus et indépendants de *Tet*. De même, nos analyses de SMRT-seq ne révèle aucune différence dans les taux de 6mA entre le SNC larvaire de mouches sauvage ou mutantes pour *Tet*. Ces résultats nous ont incité à évaluer l'importance fonctionnelle du domaine catalytique de TET. Ainsi, nos analyses biochimiques et génétiques indiquent que le domaine catalytique de TET est incapable de déméthyliser la marque 6mA *in vitro*, et que l'abolition de l'activité enzymatique de TET ne récapitule pas les phénotypes observés en cas de perte total de TET *in vivo*, suggérant une fonction majoritairement non-catalytique pour ces enzymes chez la Drosophile.

Adenine methylation is very scarce in the drosophila genome and not erased by the Ten Eleven Translocation dioxygenase.

Manon Boulet ^{1#}, Gueric Gilbert ^{1#}, Yoan Renaud ^{1#}, Martina Schmidt-Dengler ², Emilie Plantié ¹, Romane Bertrand ¹, Xinsheng Nan ³, Tomasz Jurkowski ³, Mark Helm ², Laurence Vandel ^{1*} & Lucas Waltzer ^{1*}

¹ Université Clermont Auvergne, CNRS, INSERM, iGRoD, F-63000 Clermont-Ferrand, France

² Institute of Pharmaceutical and Biomedical Sciences, Johannes Gutenberg Universität, Mainz, Germany

³ Cardiff University, School of Biosciences, Museum Avenue, CF10 3AX Cardiff, Wales, UK

co-first authors

* co-corresponding authors: laurence.vandel@uca.fr & lucas.waltzer@uca.fr

Abstract

N6-methyladenine (6mA) DNA modification has recently been described in metazoans, including in drosophila, for which the erasure of this epigenetic mark has been ascribed to the Ten Eleven Translocation (TET) enzyme. Here, we re-evaluated 6mA presence and TET impact on drosophila genome. Using axenic or conventional breeding conditions, we found only traces of 6mA by LC-MS/MS and no significant increase in 6mA levels in the absence of TET. Further molecular and genetic analyses suggest that TET does not demethylate 6mA but acts essentially in an enzymatic-independent manner. Our results call for further caution concerning the role and regulation of 6mA DNA modification in metazoans.

Keywords

Epigenetics, DNA methylation, N6-methyladenine (6mA), Ten Eleven Translocation (TET), liquid chromatography coupled with mass tandem mass spectrometry (LCMS/MS), single-molecule real-time sequencing (SMRT-seq), drosophila.

Introduction

Until recently, N⁶-methyl-2'-deoxyadenosine (also called N6-methyladenine or 6mA) was considered to be essentially restricted to the genome of prokaryotes, where this modification plays a well-established role in the restriction-modification system and other processes such as DNA replication or transcription (Sanchez-Romero & Casadesus, 2020; Wion & Casadesus, 2006). Since 2015, several reports detected the presence of 6mA in the DNA of different eukaryotic organisms (Alderman & Xiao, 2019; Boulias & Greer, 2022), including in metazoans (Greer et al., 2015; Koziol et al., 2016; Liu et al., 2016; Wu et al., 2016; Xiao et al., 2018; Xie et al., 2018; Zhang et al., 2015a). Although a small fraction of all adenines seems methylated at N6 position (from 0.4% to 0.0001% or below), it was proposed that this modification participates in eukaryotic genome regulation (Wu, 2020). Yet, the significance of 6mA in eukaryotes and the enzymes involved in its metabolism remain controversial with several studies questioning the existence and/or the level of this modification, particularly in metazoans (Douvlataniotis et al., 2020; Kong et al., 2022; Liu et al., 2021; Musheev et al., 2020; O'Brown et al., 2019; Schiffers et al., 2017). Part of the controversy stems from the technologies used to detect 6mA (Boulias & Greer, 2022; Li et al., 2021). Notably, antibody-based techniques such as dot blot or DNA immunoprecipitation followed by sequencing (DIP-seq) have been particularly called into question to study low levels of 6mA (Bochtler & Fernandes, 2021; Douvlataniotis et al., 2020; Lentini et al., 2018). If liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LCMS/MS) provides a sensitive method to identify 6mA and measure its absolute levels unambiguously, bacterial contaminations can affect the results (Douvlataniotis et al., 2020; Kong et al., 2022; O'Brown et al., 2019). Finally, single-molecule real-time sequencing (SMRT-seq) can detect 6mA presence (and location) on genomic DNA but is prone to give rise to a high false discovery rate when 6mA is rare (Douvlataniotis et al., 2020; O'Brown et al., 2019; Zhu et al., 2018).

Notwithstanding, 6mA presence appears strongly supported in drosophila genome (He et al., 2019; Ismail et al., 2019; Shah et al., 2019; Yao et al., 2018; Ye et al., 2017; Zhang et al., 2015a), where this modification was described to be associated with transposable element silencing and activation of gene transcription (He et al., 2019; Yao et al., 2018; Zhang et al., 2015a). Unexpectedly, 6mA demethylation in drosophila was attributed to the Ten Eleven Translocation (TET) enzyme (Zhang et al., 4 2015a), a member of the 5-methylcytosine (5mC)

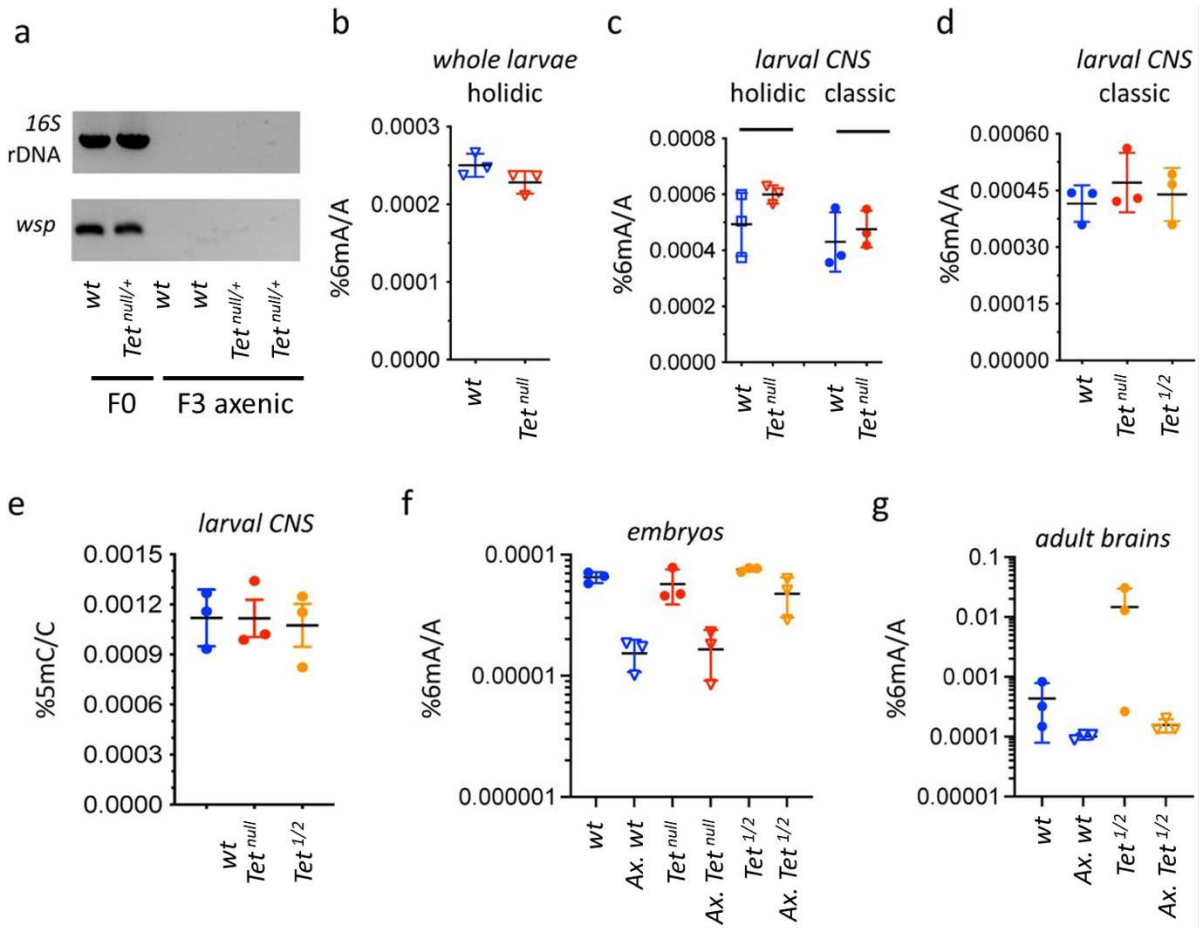


Figure 1. 6mA levels in axenic drosophila larvae are very low and not affected by TET loss. **(a)** The presence of bacterial contaminations in wild type (*wt*) and $Tet^{null/+}$ adult flies was checked by PCR using universal primers against bacterial 16S rDNA and against the endosymbiotic bacteria gene *wsp*. PCR were performed on DNA from parental (F0) flies and after 3 generations of breeding in axenic conditions (F3). **(b-d)** 6mA levels were measured by LC-MS/MS in gDNA from whole larvae **(b)** or dissected CNS **(c, d)** generated from axenic flies reared on holidic medium **(b,c)** or conventional flies reared on classic medium **(c,d)**. **(e)** 5mC levels were measured by LC-MS/MS in gDNA from dissected CNS generated flies reared on classic medium. **(f, g)** 6mA levels were measured by LC-MS/MS in embryos **(f)** and dissected adult brains **(g)** collected from crosses with conventional or axenic (Ax.) individuals raised on classic fly medium supplemented (Ax.) or not with antibiotics. *wt*: wild type (w^{1118}); Tet^{null} : $Tet^{null/null}$; $Tet^{1/2}$: $Tet^{DMAD1/DMAD2}$. Filled circles: conventional flies; open triangles: axenic flies. Individual values, means and standard deviations are plotted. No statistically significant differences were observed between *wt* and *Tet* mutant samples (Mann-Whitney test).

dioxygenase family (Iyer et al., 2009). Here, we re-evaluated 6mA levels in drosophila and reassessed the impact of TET on this mark. Using LC-MS/MS, we show that 6mA is present at very low levels in drosophila in axenic conditions and that the absence of TET does not lead to any consistent increase in 6mA levels in the larval central nervous system, nor in the whole larva, the embryo or the adult brain. Furthermore, our genetic and molecular analyses suggest that TET is not involved in 6mA demethylation and that its function during drosophila development is largely catalytic-independent.

Results and discussion

Previously reported levels of 6mA measured by LC/MS-MS in drosophila ranged from 0.07% to 0.0006% (6mA/A), with the highest levels in the early embryo (Yao et al., 2018; Zhang et al., 2015a). However, a recent study reported much lower levels (0.0002%) even in early embryos and showed that initially reported “high” levels of 6mA were likely due to bacterial contaminations (Kong et al., 2022). Indeed, the contamination of genomic DNA (gDNA) by bacterial DNA is a major confounding factor for LC-MS/MS experiments (Douvlataniotis et al., 2020; Kong et al., 2022; O’Brown et al., 2019). Moreover, the presence of intracellular bacteria can also be a source of 6mA (Douvlataniotis et al., 2020). Along that line, it is worth noting that the genome of *Wolbachia*, a frequent endosymbiont in drosophila, codes for DNA Adenine methyltransferases (Saridaki et al., 2011). In addition, 6mA derived from exogenous sources might be incorporated into gDNA via the salvage pathway (Musheev et al., 2020), and independently of autonomously-directed adenine methylation (O’Brown et al., 2019; Schiffers et al., 2017). To exclude these possible sources of contamination, we generated germ-free drosophila and reared the larvae on chemically-defined (“holidic”) food devoid of exogenous DNA contribution (see Methods). The absence of exogenous or endosymbiotic bacteria in the resulting flies was confirmed by PCR (Fig. 1a). In these conditions, we observed 0.00025% of 6mA in whole larvae (Fig. 1b) and 0.0005% in the larval central nervous system (CNS) (Fig. 1c). Noteworthy, this corresponds to around 200 to 400 methylated adenines per haplogenome. In addition, similar levels of 6mA were measured in the CNS when non-axenic larvae were reared on classic medium without antibiotic treatment (Fig. 1c), suggesting that contamination by exogenous sources is not a major problem in this tissue. These results confirm the presence of a very small fraction of methylated adenines in drosophila DNA.

Changes in 6mA levels following genetic manipulations of putative adenine methylases or demethylases have brought further credence to the existence and role of this modification in metazoans (Boulias & Greer, 2022). In drosophila, the absence of TET (also called DMAD, for DNA Methyl Adenine Demethylase) was associated with a strong increase in 6mA levels in embryo or adult ovary and brain (Yao et al., 2018; Zhang et al., 2015a). In addition, *in vitro* experiments suggested that drosophila TET can demethylate 6mA (Yao et al., 2018; Zhang et al., 2015a). However, that TET mediates 6mA oxidation is at odd with the well-characterized function of this family of enzymes in 5mC oxidation in metazoans (Lio et al., 2020). Moreover, the other enzymes involved in methyladenine oxidation/demethylation belong to the AlkB family (Boulias & Greer, 2022; Xu & Bochtler, 2020), which is related to, but distinct from the TET family (Iyer et al., 2009; Jia et al., 2017). Indeed, conserved residues involved in TET 5mC recognition differ from those found within the AlkB family and may not be able to accommodate a purine residue instead of a pyrimidine (Hu et al., 2013; Iyer et al., 2009; Parker et al., 2019; Xu & Bochtler, 2020). Nevertheless, the fact that the drosophila genome presents extremely low levels of 5mC and does not code for any 5mC DNA methyltransferase (Iyer et al., 2011; Krauss & Reuter, 2011) prompted the idea that TET could catalyze other forms of DNA modifications and notably 6mA oxidation/demethylation in the absence of its canonical substrate (Zhang et al., 2015a). As *Tet* was shown to be highly expressed in the larval CNS (Delatte et al., 2016; Wang et al., 2018), we first focused on its impact on 6mA in this tissue. Yet, we found that the levels of 6mA measured by LC-MS/MS in the absence of TET (*Tet^{null}*, an allele that abolishes *Tet* transcription (Delatte et al., 2016), were similar to wild type in the larval CNS using either axenic flies raised on holidic medium or non-axenic flies raised on classic medium (i.e. conventional conditions) (Fig. 1c). Of note, TET loss did not show any impact on 6mA level either in whole larvae (Fig. 1b). As previous experiments showing an increase in 6mA in the absence of TET were performed under conventional conditions with *Tet^{DMAD1}/Tet^{DMAD2}* mutant alleles (Yao et al., 2018; Zhang et al., 2015a), which introduce a premature stop codon in *Tet* open reading frame before its catalytic domain (Zhang et al., 2015a), we repeated the analyses with this allelic combination. Yet, we did not find any increase of 6mA levels in the larval CNS in this setting either (Fig. 1d). Moreover, consistent with previous results showing that TET does not control 5mC oxidation in drosophila (Zhang et al., 2015a), we observed very low levels of 5mC (around 0.001%) in the larval CNS and no increase upon TET loss (Fig. 1e). In addition, the first product of 5mC oxidation, 5hmC (5-

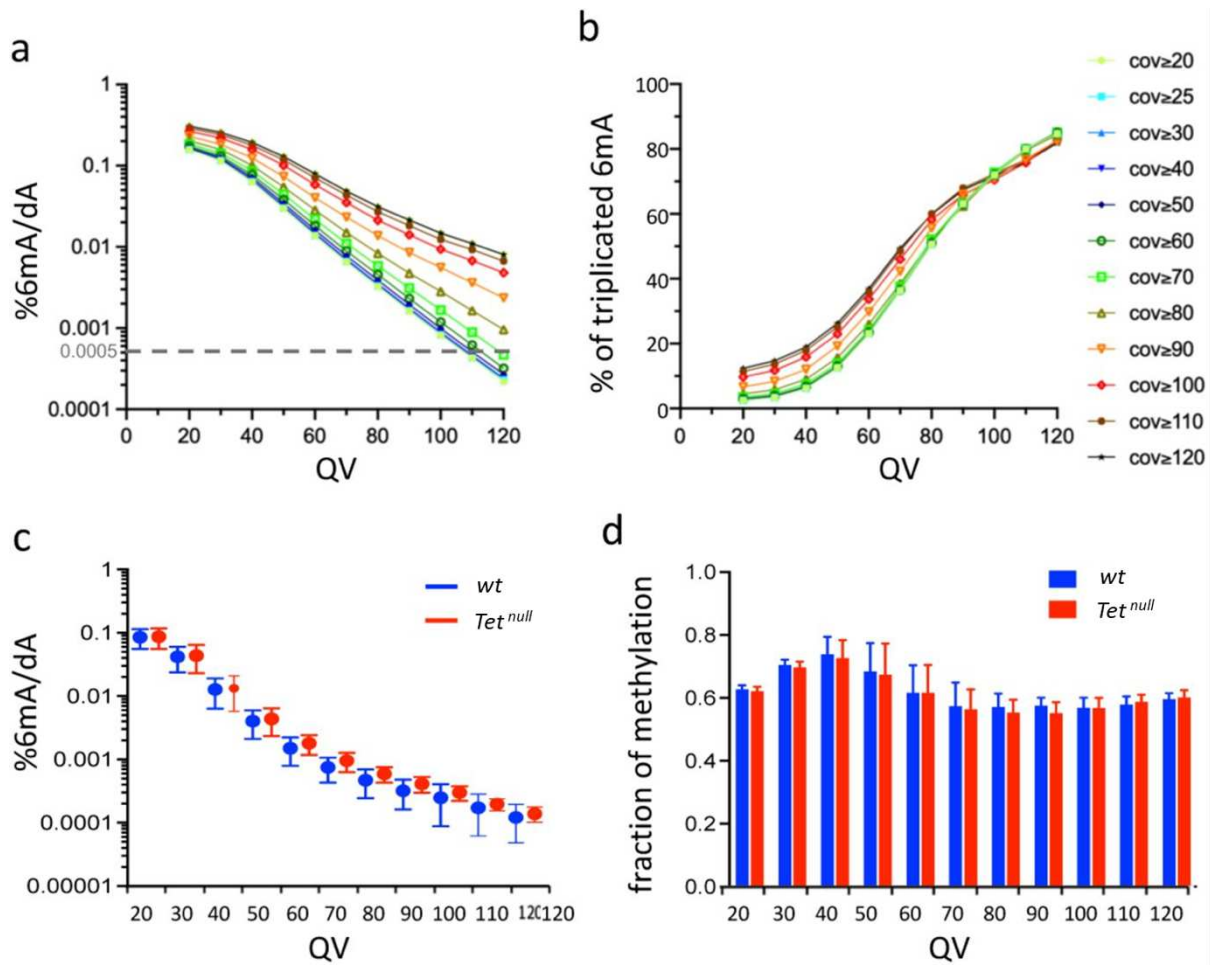


Figure 2. SMRT-seq analysis of larval CNS gDNA does not reveal an increase in 6mA in the absence of TET. **(a)** Percentage of adenines identified as 6mA in the wild type fusion dataset depending on the QV and coverage values used for 6mA selection. The dashed grey line indicates the level of 6mA measured by LC-MS/MS (0.0005%). **(b)** Influence of the QV and the coverage values on the proportion of 6mA identified in the wild type fusion dataset and in the three original samples. **(c)** Percentage of adenines covered at least 25x and identified as 6mA in each of the 3 wild type (*wt*) or *Tet*^{null} datasets depending on the QV. Means and standard deviations are represented. **(d)** Fraction of methylation in *wt* or *Tet*^{null} datasets depending on the QV (coverage \geq 25x). Means and standard deviations are represented.

hydroxymethylcytosine), was below the detection limit (0.00001%). These results suggest that TET is not involved in 6mA (or 5mC) demethylation in the drosophila larval CNS.

To test whether the lack of impact of TET on 6mA levels that we observe here contrary to previous studies (Yao et al., 2018; Zhang et al., 2015a), could be due to a tissue-specific effect or to breeding conditions, we assessed 6mA levels in embryos and adult brains using conventional or germ-free flies (see Methods). As *Tet^{null}* homozygote mutation is pupal lethal (Zhang et al., 2015a), only *Tet^{DMAD1/DMAD2}* could be used for adult brains. The presence/absence of bacterial contaminants in conventional versus germ-free stocks was validated by PCR (Supplementary Figure S1a). Moreover, by performing gDNA sequencing, we found around 2% of bacterial DNA contaminant in gDNA in conventional flies versus less than 0.003% in germ-free flies (Supplementary Figure S1b). Hence, possible traces of bacterial contaminations in axenic samples should have negligible impact on LC-MS/MS measurements. LC-MS/MS analyses showed that 6mA levels were higher in embryos (Fig. 1f) or adult brains (Fig. 1g) using conventional flies as compared to their germ-free siblings. They were also more variable across samples in non-axenic conditions. It is thus likely that 6mA levels measured in non-axenic conditions do not solely reflect endogenous 6mA in the drosophila genome and variations between genotypes should be interpreted with caution. Still, we did not observe any significant increase in 6mA levels in the absence of TET in non-axenic conditions (Fig. 1f, g). Importantly, the same observation was made in axenic conditions (Fig. 1f, g). All together, we did not find evidence that TET loss caused an increase in 6mA levels in embryos, whole larvae, larval CNS or adult brain.

As an alternate method to study TET impact on 6mA, we used SMRT sequencing (Boulias & Greer, 2022). We generated SMRT-seq data on CNS gDNA from three biological replicates of wild type and *Tet^{null}* larvae. As genome coverage is an important parameter to analyze SMRT-seq data, we first merged the three replicates to increase read density. In the resulting fusion datasets, around 95% of all the adenines were covered at least 25x (Supplementary Figure S2 and Table S1). The detection of 6mA by SMRT-seq is based on a modification quality value (mQV or QV), reflecting the consistency by which a specific modification is observed at a given position in a subread. Using standard parameters (coverage $\geq 25x$ and $QV \geq 20$), we found respectively, 0.158% and 0.172% of potential 6mA in the CNS of wild type and *Tet^{null}* larvae (Fig. 2a, Supplementary Table S2), which is much more than expected based on LC-MS/MS measurements. However, when we considered the methylation status of these

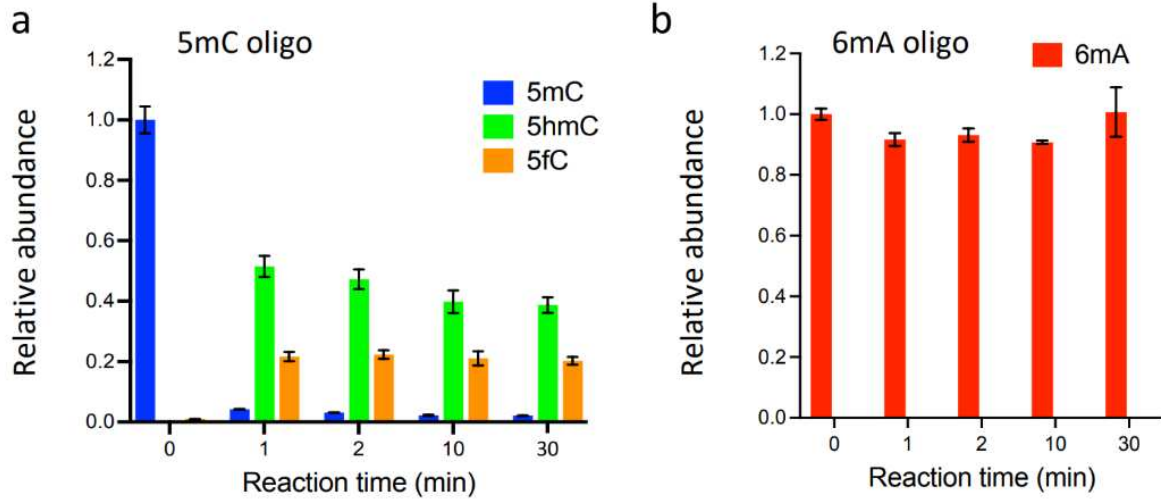


Figure 3. TET does not oxidize 6mA. **(a, b)** *In vitro* assays showing TET activity profile on 5mC **(a)** and 6mA **(b)** containing double stranded oligonucleotide substrates. The levels of 5mC and its oxidised products (5hmC and 5fC) are represented relative to 5mC level at t=0. The levels of 6mA are represented relative to 6mA level at t=0. Error bars denote standard deviations from 3 independent experiments.

adenines in the individual samples, only 2.6% were labeled as 6mA in all 3 replicates and 13.7% in at least two replicates (Fig. 2b, Supplementary Figure S3 and Table S3), consistent with the idea that SMRT-seq gives a high rate of false positives in organisms containing low 6mA levels (Douvlataniotis et al., 2020; Kong et al., 2023; Schadt et al., 2013; Zhu et al., 2018). Interestingly, increasing the QV strongly ameliorated the fraction of replication and drastically reduced the proportion of potential 6mA both in wild type and *Tet^{null}* datasets, whereas increasing the coverage had little effect (Fig. 2a, b, Supplementary Figure S3 and Table S3). We thus analyzed SMRT-seq results from wild type and *Tet^{null}* replicates using a coverage $\geq 25x$ and increasing QV. However, we did not observe any significant differences either in the percentage of 6mA/A or in the fraction of methylation of these potential 6mA even with stringent QV values (Fig. 2c, d and Supplementary Table S4). Hence, while SMRT-seq data are noisy, as cautioned in previous studies, they did not reveal an increase in 6mA levels in the absence of TET.

To directly test whether TET demethylates 6mA, we then assessed its activity *in vitro*. Accordingly, the recombinant catalytic domain of drosophila TET was incubated with double-stranded DNA (dsDNA) containing either a 5mC or a 6mA modification and the level of modified bases was quantified by LC-MS/MS at different time-points. Under our experimental conditions, 5mC levels were drastically reduced in 1 min with the concomitant appearance of 5mC oxidation products (5hmC and 5fC) (Fig. 3a). In sharp contrast, the level of 6mA remained constant even after 30 min of incubation (Fig. 3b). Hence, contrary to 5mC, 6mA does not seem to be a good substrate for drosophila TET *in vitro*. Of note, only traces of 5mC, 5hmC, 5fC or 6mA were observed when recombinant TET was incubated with non-modified dsDNA, indicating that the levels measured in the presence of modified dsDNA were not due to contaminations (Supplementary Figure S5). Besides, it is worth mentioning that a distant TET homolog in the fungus *Coprinopsis cinerea* was recently shown to oxidize both 5mC and 6mA (Mu et al., 2022). Yet, its peculiar capacity to bind and demethylate 6mA requires key residues within its catalytic domain which are not conserved in other TET homologs including in drosophila (Supplementary Figure S6). These observations support our results showing that drosophila TET does not demethylate 6mA.

Although previous reports suggested that TET controls fly viability, ovarian development or adult brain formation by demethylating 6mA (Yao et al., 2018; Zhang et al., 2015a), the functional importance of TET enzymatic activity has never been tested genetically as available

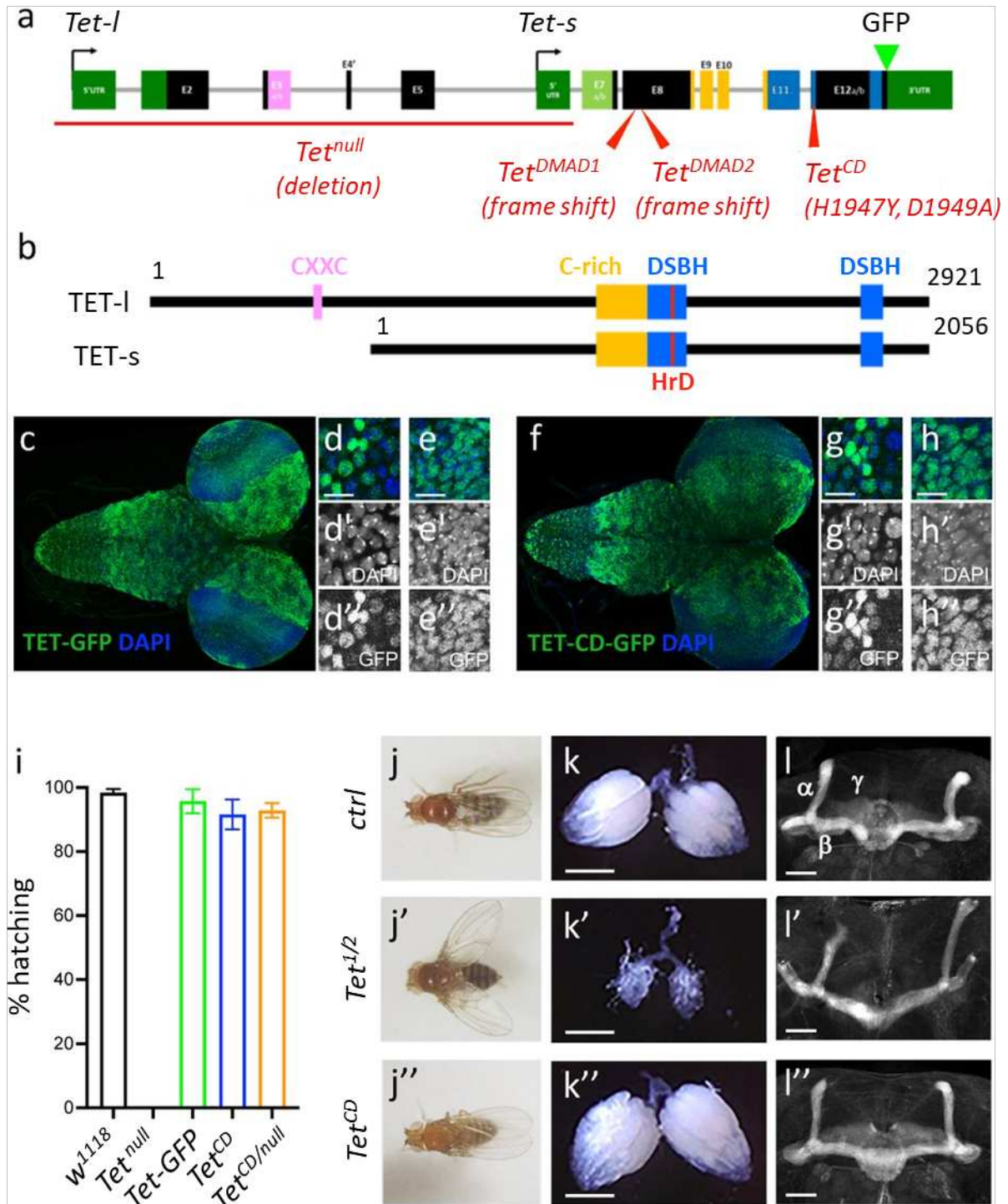


Figure 4. TET catalytic activity is largely dispensable in drosophila. **(a, b)** Schematic representation of *Tet* locus **(a)** and main protein isoforms **(b)**. **(a)** *Tet* is transcribed from two alternative promoters giving rise to *Tet-long* (*Tet-l*) and *Tet-short* (*Tet-s*) isoforms. Filled boxes represent exons; non-coding exons (UTR) are depicted in green, coding exons in black or according to their domain-associated color. Introns are represented as gray lines (not to scale). The *Tet null*, *DMAD1*, *DMAD2* and *catalytic dead* (*CD*) alleles are depicted in red. The location of the GFP insertion generated by CRISPR/Cas9-mediated knock-in is also indicated. **(b)** The conserved domains of TET are colored; pink: CXXC DNA binding domain, orange: Cystein-rich domain, blue: double-stranded β helix (DSBH) domain, red: HxD (iron binding motif). Amino acid positions are indicated according to the longest TET-I and TET-s isoforms.

Tet alleles either abolish its expression or delete the whole catalytic domain. In view of our results and to address this issue, we generated a catalytic dead mutant allele of *Tet* (*Tet*^{CD}). Accordingly, the conserved HxD ironbinding motif required for the catalytic activity of TET/AlkB dioxygenase family of enzymes (Hu et al., 2013; Tahiliani et al., 2009; Xu & Bochtler, 2020) was mutated by CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination using a *Tet-GFP* knock-in which allows to tag all protein TET isoforms with GFP (Fig. 4a, b). Of note, immunostaining in the larval CNS confirmed that TET is widely expressed in this tissue and showed that the H1947Y/D1949A mutation does not alter TET expression or its nuclear localization (Fig. 4c-h). Strikingly, while *Tet*^{null} homozygote individuals die at the pupal stage (Delatte et al., 2016), we found that *Tet*^{CD/CD} as well as *Tet*^{CD/null} pupae had a normal hatching rate and gave rise to viable adult flies (Fig. 4i). We did not observe lethality of *Tet*^{CD/CD} individuals at earlier developmental stage either (Supplementary Figure S7). Then, we assessed whether this mutation affected adult wing positioning, ovarian development or mushroom body formation as reported upon TET loss of expression (Wang et al., 2018; Yao et al., 2018; Zhang et al., 2015a). Yet, *Tet*^{CD/CD} flies did not exhibit the “held out” wing positioning defects present in *Tet*^{DMAD1/DMAD2} adult escapers (Fig. 4j, j', j''). Similarly, atrophied ovaries or mushroom body projection defects observed in the absence of TET expression were not reproduced when only its catalytic activity was impaired (Fig. 4k, k', k'' and 4l, l', l''). Thus, TET function in drosophila seems essentially independent of its enzymatic activity, indicating that TET-mediated regulation of 6mA level, if it truly happens, is not essential either for fly development.

Conclusions

In sum, our results confirm that 6mA is present only at very low levels in the drosophila genome. With only a few hundred methylated adenines per haplogenome, we argue that 6mA is unlikely to play a major regulatory function in normal conditions. In addition, we did not find any evidence that TET loss promotes 6mA accumulation. Rather, our results strongly suggest that this conserved enzyme is not a methyladenine demethylase and that its catalytic activity is largely dispensable for drosophila development. Further experiments will be necessary to firmly establish whether regulated adenine methylation/demethylation takes place and what are the enzymes involved, not only in drosophila but also in other metazoans.

Figure 4. (c-h) Expression pattern of the wild type and catalytic-dead versions of TET in the larval CNS. *Tet-GFP* (c-e) and *Tet^{CD}-GFP* (f-h) knock-in lines were used to detect TET proteins by confocal imaging after immunostaining against GFP (green). Nuclei were labelled with DAPI (blue). (c, f): stitched images showing dorsal views of the entire CNS. Scale bar: 100 μ m. (d, e, g, h): high-magnification views of TET expression in the ventral nerve cord (d, g) or the central brain (e, h). DAPI only and GFP only channels are presented in the middle (') and lower (") panels, respectively. Scale bar: 10 μ m. (i) Percentage of adult flies of the indicated genotypes hatching from their pupal case. Means and standard deviations from 4 independent experiments. (j-l) Wing positioning (j), ovaries (k) and mushroom bodies (l) of wild type adult flies (ctrl: *Tet-GFP*) as compared to flies lacking TET expression (*Tet^{1/2}: Tet^{DMAD1/DMAD2}* adult escapers) or TET enzymatic activity (*Tet^{CD}*). (l-l") Immunostaining against Fas2 on adult brains was used to label mushroom body a, b and g lobes. (k-k") Scale bar 500 μ m. (l-l") Scale bar 50 μ m.

Methods

Fly strains and breeding

The following *D. melanogaster* strains were used: *w¹¹¹⁸* (control, Bloomington), *Tet^{null}* (Delatte et al., 2016), *Tet^{DMAD1}*, *Tet^{DMAD2}* (Zhang et al., 2015b). The *Tet-GFP* knock-in line was generated by InDroso Functional Genomics (Rennes, France) using CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination to insert the EGFP in frame with the last amino-acid of TET. Similarly, the catalytic dead *Tet^{CD}* flies were generated by CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination in the *Tet-GFP* background to mutate TET HRD motif into YRA (*dm6*: chromosome 3L:2,791,624 "A" to "C" and 3L:2,791,631 "C" to "T"). In both cases, the resulting flies were validated by sequencing.

Unless otherwise specified, stock maintenance and sample collection were performed using classic fly medium (75 g/l organic corn flour, 28 g/l dry yeast, 40 g/l sucrose, 8 g/l agar, 10 ml/l Moldex 20%) with a 12 h dark:light cycle. Germ-free drosophila lines were generated as described (Sabat et al., 2015). Briefly: embryos were collected on grape juice agar plates, dechorionated with 2.7% bleach for 2-3 min, washed in sterile ddH₂O and transferred to standard fly medium supplemented with antibiotics (50 µg/ml amoxicillin, tetracyclin, kanamycin and puromycin) for at least two successive generations. When "holidic" medium was used to avoid any source of contamination by exogenous DNA, embryos from germ-free adults were collected on grape juice agar plates, dechorionated, washed with ddH₂O and transferred to a chemically-defined medium, using the amino acid ratio of the FLYAA recipe (Piper et al., 2017), together with antibiotics to maintain axenic conditions. All crosses and larvae collections were performed at 25°C.

Viability assays

Embryos were collected at 25°C from 1-week-old flies over 8h on grape juice agar plates. For each genotype, batches of 100 embryos were transferred to corn flour-yeast-agar plates; the number of first instar larvae was counted after 30h, the number of pupae was counted at day 9 and the number of hatched adults was counted from days 10 to 15. Each experiment was repeated at least four times.

Immunostainings

Third instar larvae or adult fly brains were dissected in 1X Phosphate Buffer Saline (PBS) and fixed for 25 min in PBS containing 4% paraformaldehyde. Fixed samples were washed rapidly twice with PBS and 3 times for 15 min with PBS-0.3% Triton X100 (PBT) before being pre-incubated for 1h in PBT-1% bovine serum Albumin (BSA, Sigma). Samples were incubated overnight at 4°C with primary antibody diluted in PBT-1% BSA, washed 3 times for 15 min in PBT, and incubated with respective secondary antibodies diluted in PBT-1% BSA for 3h at room temperature or overnight at 4°C. Samples were washed in PBT and mounted in Vectashield-DAPI (Vector Laboratories). Images were acquired using a Leica LSM800 confocal microscope. The following antibodies were used: goat anti-GFP (Abcam, 1/500), mouse anti-Fasciclin II (DSHB, 1/25), donkey anti-goat Alexa fluor 488 (Invitrogen, 1/1000), donkey anti-mouse Cy3 (Jackson Immuno, 1/1000).

Bacterial contamination assays

The presence of bacterial DNA contamination in parental and “germ-free” derived stocks was checked by PCR using universal primers targeting bacterial *16S rDNA* (*16S-s*: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', *16S-r*: 5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3' (Weisburg et al., 1991)) and primers amplifying the *wsp* gene from the endosymbiont *Wolbachia* (*wsp-s*: 5'-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3', *wsp-r*: 5'-AAAAATTAAACGCTACTCCA-3' (as from (Jeyaprakash & Hoy, 2000))). The presence of any contaminant was also checked by DNA sequencing: for each sample, genomic DNA from 10 adult flies (5 males/5 females) was extracted using DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). DNA was resuspended and sheared in 1X TE (0.1 mM EDTA, 10 mM Tris HCl pH 8.0) by sonication for 20 min (30 sec ON/30 sec OFF) using the Bioruptor Pico (Diagenode) to obtain an average size of ~300pb. DNA libraries were prepared from 1µg DNA using the NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit (Illumina) following manufacturer's instructions and sequencing was performed by Novogene (Cambridge, UK) using NovaSeq 6000 (paired-end, 150pb). Between 15 to 19 million reads were obtained per sample. To assess the presence of contamination, the resulting reads were first aligned to the drosophila reference genome (*dm6* Ensembl release 70) with Bowtie2. Unaligned reads were then processed for blast search to bacteria, viral and fungal genomes using the DecontaMiner tool (Sangiovanni et al., 2019).

LC-MS/MS analyses

For DNA purification, whole larvae, bleach-dechorionated embryos or dissected adult brains of the required genotypes were washed in sterile PBS, crushed in lysis buffer (100 mM Tris-HCl pH 9, 100 mM EDTA, 1% SDS), incubated at 70°C for 30 min and then in 1 M potassium acetate at 4°C for 30 min. After centrifugation at 12000 g for 20 min, the supernatant was digested with RNase A and RNase H for 3 h at 37°C, extracted twice with phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) and precipitated with isopropanol. DNA from dissected third instar larval brains (around 100 per sample) was extracted using DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen), digested with RNase A and RNase H for 3 h. In both types of extraction, DNA was precipitated with 500 mM ammonium acetate (pH 6.2). DNA pellets were dissolved in ddH₂O, and their concentration, as the absence of RNA contamination, were checked on a Qubit 3.0 fluorometer (Invitrogen).

Up to 1200 ng of DNA per sample were digested to nucleosides using 0.6 U nuclease P1 from *P. citrinum* (Sigma-Aldrich), 0.2 U snake venom phosphodiesterase from *C. adamanteus* (Worthington), 0.2 U bovine intestine phosphatase (Sigma-Aldrich), 10 U benzonase (Sigma-Aldrich), 200 ng Pentostatin (Sigma-Aldrich) and 500 ng Tetrahydrouridine (Merck-Millipore) in 5 mM Tris (pH 8) and 1 mM MgCl₂ for 2 h at 37°C. 1000 ng of digested DNA were spiked with internal standard (D₃-5mC and D², ¹⁵N₂-5hmC, 250 fmol each) and subjected to analysis by LC-MS (Agilent 1260 Infinity system in combination with an Agilent 6470 Triple Quadrupole mass spectrometer equipped with an electrospray ion source (ESI)). The solvents consisted of 5 mM ammonium acetate buffer (pH 5.3, adjusted with acetic acid; solvent A) and LC-MS grade acetonitrile (solvent B; Honeywell). A C18 reverse HPLC column (SynergiTM 4 μM particle size, 80 Å pore size, 250 × 2.0 mm; Phenomenex) was used at a temperature of 35°C and a constant flow rate of 0.5 mL/min was applied. The compounds were eluted with a linear gradient of 0-20% solvent B over 10 min. Initial conditions were regenerated with 100% solvent A for 5 min. The four main nucleosides were detected photometrically at 254 nm via a diode array detector (DAD). The following ESI parameters were used: gas temperature 300°C, gas flow 7 L/min, nebulizer pressure 60 psi, sheath gas temperature 400°C, sheath gas flow 12 L/min, capillary voltage 3000 V, nozzle voltage 0 V. The MS was operated in the positive ion mode using Agilent MassHunter software in the MRM (multiple reaction monitoring) mode. Therefore, the following mass transitions were used to detect the respective modifications: 6mA 266->150; 5mC 242->126; D₃-5mC 245->129; 5hmC 258->142; D₂, ¹⁵N₂-5hmC 262->146; 5fC 256->140. For absolute quantification, internal and external

calibrations were applied as described previously (Kellner et al., 2014), except for 6mA and 5fC, for which only external calibration was performed.

SMRT sequencing analyses

Around 250 brains from w^{1118} or Tet^{null} third instar larvae were dissected for each sample. Tissues were crushed in lysis buffer (100 mM Tris-HCl pH 9, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS), digested with RNase A for 15 min at room temperature and 30 min at 65°C, before being incubated with 4 volumes of 3.2 M LiCl, 0.9 M KAc for 30 min at 4°C. After centrifugation at 12000 g for 20 min at 4°C, the supernatant was extracted twice with phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) and DNA was precipitated with isopropanol. 5 µg of DNA were used to prepare each sequencing library.

SMRT-seq was performed at the Gentyane Sequencing Platform (Clermont-Ferrand, France) with a PacBio Sequel Sequencer (Pacific Biosciences, Menlo Park, CA, USA). The SMRTBell libraries were prepared using a SMRTbell Express 2 Template prep kit, following the manufacturer's recommendations. High Molecular Weight Genomic DNA (5 µg) was sheared with the 40 kb program using a Diagenode Megaruptor (Diagenode) to generate DNA fragments of approximately 30 kb. Assessment of the fragment size distribution was performed with a Femto Pulse (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Sheared genomic DNA was carried into enzymatic reactions to remove single-strand overhangs and to repair any damage that may be present on the DNA backbone. An A-tailing reaction followed by the overhang adapter ligation was conducted to generate the SMRTBell templates. After a 0.45X AMPure PB beads purification, the samples were size-selected using the BluePippin (Sage Science, Beverly, MA, USA) to recover all the material above 15 kb. The samples were then purified with 0.45X AMPure PB Beads to obtain the final libraries of around 30 kb. The SMRTBell libraries were quality inspected and quantified on a Femto Pulse and a Qubit fluorimeter with Qubit dsDNA HS reagent Assay kit (Life Technologies). A ready-to-sequence SMRTBell Polymerase Complex was created using a Binding Kit 3.0 (PacBio) and the primer V4, the diffusion loading protocol was used, according to the manufacturer's instructions. The PacBio Sequel instrument was programmed to load a 6 pM library and samples were sequenced on PacBio SMRTCells v2.0 (Pacific Biosciences), acquiring one movie of 600 min per SMRTcell.

For each sequenced sample, SMRT-seq reads were aligned using pbmm2 tool (<https://github.com/PacificBiosciences/pbmm2>) on Drosophila genome (*dm6* Ensembl release 70). For each condition (wild type or *Tet^{null}*), a fusion of alignments of the three biological replicates was done using « samtools merge » (Li et al., 2009). 6mA detection was performed on individual and on merged samples with lpdSummary tool from KineticTools (<http://github.com/PacificBiosciences/kineticsTools>) applying the following parameters: --identify m6A --numWorkers 16 --pvalue 0.01 --identifyMinCov 5 --methylFraction. To detect 6mA with higher confidence, we applied several thresholds on coverage and modificationQV (QV) with homemade scripts in bash and R. 6mA genomic repartition was obtained using Annotatepeaks tool from Homer suite (Heinz et al., 2010). To find associated motifs for 6mA, we used MEME web application (Bailey et al., 2009). The different heatmaps were generated with R package “pheatmap” (V.1.0.12). Other graphics were mainly done with ggplot2 (V.3.3.2) R package or Prism9. The SMRT-seq data are deposited under GEO accession number GSE206852.

Purification of drosophila TET catalytic domain

The catalytic domain of drosophila TET (dTET) was cloned in pET28a expression vector. The His-tagged protein was overexpressed in *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus RIL cells for 17 h at 16°C. Cells were resuspended in lysis buffer (50 mM HEPES pH 7.5, 20 mM imidazole, 500 mM NaCl, 1 mM DTT, 10% glycerol and supplemented with protease inhibitor 0.2 mM PMSF) and disrupted using Bandelin Sonoplus ultrasonic homogenizer. The cell lysates were cleared by centrifugation (Lynx 600 (Thermo), Fiberlite F21-8x50y) at 38.300 g for 30 min at 4°C and the supernatant was loaded onto an affinity column packed with Ni-NTA agarose beads (Genaxxon, Germany). The column was washed with wash buffer (50 mM HEPES pH 7.5, 20 mM imidazole, 500 mM NaCl, 1 mM DTT, 10% glycerol) then the recombinant protein was eluted with elution buffer (50 mM HEPES pH 7.5, 250 mM imidazole, 500 mM NaCl, 1 mM DTT, 10% glycerol). Purified protein was dialyzed against dialysis buffer I (50 mM HEPES pH 7.5, 1 mM DTT, 300 mM NaCl and 10% glycerol) followed by dialysis buffer II (50 mM HEPES pH 7.5, 1 mM DTT, 300 mM NaCl and 50% glycerol).

TET activity assays

The double-stranded DNA substrates were prepared by annealing forward oligos and reverse complement counterpart by heating at 95°C followed by bringing temperature to RT slowly on the heat block in Annealing Buffer (10mM Tris-HCl pH7.5 100mM NaCl). Forward oligos sequences containing a 5mC or 6mA modified nucleotide were the following: 5mC 5'-GTAAGTCTGGCA5mCGTGAGCCTCAGAG-3', 6mA 5'-GTAAGTCTGGCG6mAGTGAGCCTCAGAG-3'. The reaction was performed with 0.5 μM DNA substrate and 2 μM recombinant dTET in Reaction Buffer (50 mM HEPES pH 6.8, 100 μM Ammonium ion(II) sulfate hexahydrate, 1 mM, α-ketoglutarate, 1 mM ascorbic acid and 150 mM NaCl) at 37 °C. Reaction was stopped at different time points by adding 2μl of 0.5 M EDTA to a 40μl volume reaction followed by heating at 90°C for 5 min. Samples were treated with proteinase K for 1 h at 50°C and precipitated with ethanol. The level of 6mA, 5mC, 5hmC and 5fC was analyzed by LC-MS/MS as described above.

Competing interests

The other authors declare no competing interests.

Authors' contribution

LV and LW conceived the study. MB, GG, YR, LV and LW designed the experiments. MB, GG, EP, MSD, RB and XN performed the experiments. MB, GG, YR, MSD, TJ, MH, LV and LW analyzed the results. LW and LV wrote the manuscript with inputs from all co-authors. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. A. Molaro for critical reading of the manuscript and to the members of the iGReD for helpful discussions. We also thank Dr V. Gautier and the Gentyane platform at the Clermont-Ferrand INRAE for PacBio sequencing and the iGReD CLIC imaging facility for help with confocal experiments. We thank the Drosophila Bloomington Stock Center, Dr. R. Steward (Piscataway), Dr. D. Chen (Beijing) for fly stocks, as well as the Developmental Study

Hybridoma Bank for antibodies. This project was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-17-CE12-0030-03), Fondation ARC (PJA20171206371) and I-Site Cap20-25 (EpiMob) to LW. MB was supported by fellowships from the Université Clermont-Auvergne and the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). GG was supported by fellowships from the Université Clermont-Auvergne and the Ligue Nationale Contre le Cancer. MH was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) TRR-319 TP C03, SPP1784, HE 3397/13-2 and HE 3397/14-2.

References

- Alderman MH, 3rd, Xiao AZ (2019) **N(6)-Methyladenine in eukaryotes.** *Cell Mol Life Sci* 76: 2957-2966 doi:10.1007/s00018-019-03146-w
- Bailey TL, Boden M, Buske FA, Frith M, Grant CE, Clementi L, Ren J, Li WW, Noble WS (2009) **MEME SUITE: tools for motif discovery and searching.** *Nucleic Acids Res* 37: W202-208 doi:10.1093/nar/gkp335
- Bochtler M, Fernandes H (2021) **DNA adenine methylation in eukaryotes: Enzymatic mark or a form of DNA damage?** *Bioessays* 43: e2000243 doi:10.1002/bies.202000243
- Boulias K, Greer EL (2022) **Means, mechanisms and consequences of adenine methylation in DNA.** *Nat Rev Genet* doi:10.1038/s41576-022-00456-x
- Delatte B, Wang F, Ngoc LV, Collignon E, Bonvin E, Deplus R, Calonne E, Hassabi B, Putmans P, Awe S et al (2016) RNA biochemistry. **Transcriptome-wide distribution and function of RNA hydroxymethylcytosine.** *Science* 351: 282-285 doi:10.1126/science.aac5253
- Doulatanotis K, Bensberg M, Lentini A, Gylemo B, Nestor CE (2020) **No evidence for DNA N (6)-methyladenine in mammals.** *Sci Adv* 6: eaay3335 doi:10.1126/sciadv.aay3335
- Greer EL, Blanco MA, Gu L, Sendinc E, Liu J, Aristizabal-Corrales D, Hsu CH, Aravind L, He C, Shi Y (2015) **DNA Methylation on N6-Adenine in C. elegans.** *Cell* 161: 868- 878 doi:10.1016/j.cell.2015.04.005
- He S, Zhang G, Wang J, Gao Y, Sun R, Cao Z, Chen Z, Zheng X, Yuan J, Luo Y et al (2019) **6mA-DNA-binding factor Jumu controls maternal-to-zygotic transition upstream of Zelda.** *Nat Commun* 10: 2219 doi:10.1038/s41467-019-10202-3
- Heinz S, Benner C, Spann N, Bertolino E, Lin YC, Laslo P, Cheng JX, Murre C, Singh H, Glass CK (2010) **Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-**

regulatory elements required for macrophage and B cell identities. *Mol Cell* 38: 576-589
doi:10.1016/j.molcel.2010.05.004

Hu L, Li Z, Cheng J, Rao Q, Gong W, Liu M, Shi YG, Zhu J, Wang P, Xu Y (2013) **Crystal structure of TET2-DNA complex: insight into TET-mediated 5mC oxidation.** *Cell* 155: 1545-1555
doi:10.1016/j.cell.2013.11.020

Ismail JN, Badini S, Frey F, Abou-Kheir W, Shirinian M (2019) **Drosophila Tet Is Expressed in Midline Glia and Is Required for Proper Axonal Development.** *Front Cell Neurosci* 13: 252
doi:10.3389/fncel.2019.00252

Iyer LM, Abhiman S, Aravind L (2011) **Natural history of eukaryotic DNA methylation systems.** *Prog Mol Biol Transl Sci* 101: 25-104 doi:10.1016/B978-0-12-387685-0.00002-0

Iyer LM, Tahiliani M, Rao A, Aravind L (2009) **Prediction of novel families of enzymes involved in oxidative and other complex modifications of bases in nucleic acids.** *Cell Cycle* 8: 1698-1710 doi:10.4161/cc.8.11.8580

Jeyaprakash A, Hoy MA (2000) **Long PCR improves Wolbachia DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species.** *Insect Mol Biol* 9: 393-405
doi:10.1046/j.1365-2583.2000.00203.x

Jia B, Tang K, Chun BH, Jeon CO (2017) **Large-scale examination of functional and sequence diversity of 2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent oxygenases in Metazoa.** *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1861: 2922-2933 doi:10.1016/j.bbagen.2017.08.019

Kellner S, Ochel A, Thuring K, Spenkuch F, Neumann J, Sharma S, Entian KD, Schneider D, Helm M (2014) **Absolute and relative quantification of RNA modifications via biosynthetic isotopomers.** *Nucleic Acids Res* 42: e142 doi:10.1093/nar/gku733

Kong Y, Cao L, Deikus G, Fan Y, Mead EA, Lai W, Zhang Y, Yong R, Sebra R, Wang H et al (2022) **Critical assessment of DNA adenine methylation in eukaryotes using quantitative deconvolution.** *Science* 375: 515-522 doi:10.1126/science.abe7489 17

Kong Y, Mead EA, Fang G (2023) **Navigating the pitfalls of mapping DNA and RNA modifications.** *Nat Rev Genet* 24: 363-381 doi:10.1038/s41576-022-00559-5

Kozioł MJ, Bradshaw CR, Allen GE, Costa ASH, Frezza C, Gurdon JB (2016) **Identification of methylated deoxyadenosines in vertebrates reveals diversity in DNA modifications.** *Nat Struct Mol Biol* 23: 24-30 doi:10.1038/nsmb.3145

Krauss V, Reuter G (2011) **DNA methylation in Drosophila--a critical evaluation.** *Prog Mol Biol Transl Sci* 101: 177-191 doi:10.1016/B978-0-12-387685-0.00003-2

Lentini A, Lagerwall C, Vikingsson S, Mjoseng HK, Douvlataniotis K, Vogt H, Green H, Meehan RR, Benson M, Nestor CE (2018) **A reassessment of DNA immunoprecipitation-based genomic profiling.** *Nat Methods* 15: 499-504 doi:10.1038/s41592-018-0038-7

Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R, Genome Project Data Processing S (2009) **The Sequence Alignment/Map format and SAMtools.** *Bioinformatics* 25: 2078-2079 doi:10.1093/bioinformatics/btp352

Li X, Zhang Z, Luo X, Schrier J, Yang AD, Wu TP (2021) **The exploration of N6- deoxyadenosine methylation in mammalian genomes.** *Protein Cell* 12: 756-768 doi:10.1007/s13238-021-00866-3

Lio CJ, Yue X, Lopez-Moyado IF, Tahiliani M, Aravind L, Rao A (2020) **TET methylcytosine oxidases: new insights from a decade of research.** *J Biosci* 45

Liu J, Zhu Y, Luo GZ, Wang X, Yue Y, Wang X, Zong X, Chen K, Yin H, Fu Y et al (2016) **Abundant DNA 6mA methylation during early embryogenesis of zebrafish and pig.** *Nat Commun* 7: 13052 doi:10.1038/ncomms13052

Liu X, Lai W, Li Y, Chen S, Liu B, Zhang N, Mo J, Lyu C, Zheng J, Du YR et al (2021) **N(6)-methyladenine is incorporated into mammalian genome by DNA polymerase.** *Cell Res* 31: 94-97 doi:10.1038/s41422-020-0317-6

Mu Y, Zhang L, Hu J, Zhou J, Lin HW, He C, Chen HZ, Zhang L (2022) **A fungal dioxygenase CcTet serves as a eukaryotic 6mA demethylase on duplex DNA.** *Nat Chem Biol* 18: 733-741 doi:10.1038/s41589-022-01041-3

Musheev MU, Baumgartner A, Krebs L, Niehrs C (2020) **The origin of genomic N(6)-methyl-deoxyadenosine in mammalian cells.** *Nat Chem Biol* 16: 630-634 doi:10.1038/s41589-020-0504-2

O'Brown ZK, Boulias K, Wang J, Wang SY, O'Brown NM, Hao Z, Shibuya H, Fady PE, Shi Y, He C et al (2019) **Sources of artifact in measurements of 6mA and 4mC 18 abundance in eukaryotic genomic DNA.** *BMC Genomics* 20: 445 doi:10.1186/s12864-019-5754-6

Parker MJ, Weigele PR, Saleh L (2019) **Insights into the Biochemistry, Evolution, and Biotechnological Applications of the Ten-Eleven Translocation (TET) Enzymes.** *Biochemistry* 58: 450-467 doi:10.1021/acs.biochem.8b01185

Piper MDW, Soultoukis GA, Blanc E, Mesaros A, Herbert SL, Juricic P, He X, Atanassov I, Salmonowicz H, Yang M et al (2017) **Matching Dietary Amino Acid Balance to the In Silico-**

Translated Exome Optimizes Growth and Reproduction without Cost to Lifespan. *Cell Metab* 25: 610-621 doi:10.1016/j.cmet.2017.02.005

Sabat D, Johnson EM, Abhinay A, Jayabalan R, Mishra M (2015) **A Protocol to Generate Germ Free Drosophila for Microbial Interaction Studies.** *Adv Tech Biol Med S1* doi:10.4172/2379-1764.S1-001

Sanchez-Romero MA, Casadesus J (2020) **The bacterial epigenome.** *Nat Rev Microbiol* 18: 7-20 doi:10.1038/s41579-019-0286-2

Sangiovanni M, Granata I, Thind AS, Guarracino MR (2019) **From trash to treasure: detecting unexpected contamination in unmapped NGS data.** *BMC Bioinformatics* 20: 168 doi:10.1186/s12859-019-2684-x

Saridaki A, Sapountzis P, Harris HL, Batista PD, Biliske JA, Pavlikaki H, Oehler S, Savakis C, Braig HR, Bourtzis K (2011) **Wolbachia prophage DNA adenine methyltransferase genes in different Drosophila-Wolbachia associations.** *PLoS One* 6: e19708 doi:10.1371/journal.pone.0019708

Schadt EE, Banerjee O, Fang G, Feng Z, Wong WH, Zhang X, Kislyuk A, Clark TA, Luong K, Keren-Paz A et al (2013) **Modeling kinetic rate variation in third generation DNA sequencing data to detect putative modifications to DNA bases.** *Genome Res* 23: 129-141 doi:10.1101/gr.136739.111

Schiffers S, Ebert C, Rahimoff R, Kosmatchev O, Steinbacher J, Bohne AV, Spada F, Michalakis S, Nickelsen J, Muller M et al (2017) **Quantitative LC-MS Provides No Evidence for m(6) dA or m(4) dC in the Genome of Mouse Embryonic Stem Cells and Tissues.** *Angew Chem Int Ed Engl* 56: 11268-11271 doi:10.1002/anie.201700424

Shah K, Cao W, Ellison CE (2019) **Adenine Methylation in Drosophila Is Associated with the Tissue-Specific Expression of Developmental and Regulatory Genes.** *G3 (Bethesda)* 9: 1893-1900 doi:10.1534/g3.119.400023

Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L et al (2009) **Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1.** *Science* 324: 930-935 doi:10.1126/science.1170116

Wang F, Minakhina S, Tran H, Changela N, Kramer J, Steward R (2018) **Tet protein function during Drosophila development.** *PLoS One* 13: e0190367 doi:10.1371/journal.pone.0190367

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) **16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study.** *J Bacteriol* 173: 697-703 doi:10.1128/jb.173.2.697-703.1991

Wion D, Casadesus J (2006) **N6-methyl-adenine: an epigenetic signal for DNA-protein interactions.** *Nat Rev Microbiol* 4: 183-192 doi:10.1038/nrmicro1350

Wu KJ (2020) **The epigenetic roles of DNA N(6)-Methyladenine (6mA) modification in eukaryotes.** *Cancer Lett* 494: 40-46 doi:10.1016/j.canlet.2020.08.025

Wu TP, Wang T, Seetin MG, Lai Y, Zhu S, Lin K, Liu Y, Byrum SD, Mackintosh SG, Zhong M et al (2016) **DNA methylation on N(6)-adenine in mammalian embryonic stem cells.** *Nature* 532: 329-333 doi:10.1038/nature17640

Xiao CL, Zhu S, He M, Chen, Zhang Q, Chen Y, Yu G, Liu J, Xie SQ, Luo F et al (2018) **N(6)-Methyladenine DNA Modification in the Human Genome.** *Mol Cell* 71: 306- 318 e307 doi:10.1016/j.molcel.2018.06.015

Xie Q, Wu TP, Gimple RC, Li Z, Prager BC, Wu Q, Yu Y, Wang P, Wang Y, Gorkin DU et al (2018) **N(6)-methyladenine DNA Modification in Glioblastoma.** *Cell* 175: 1228- 1243 e1220 doi:10.1016/j.cell.2018.10.006

Xu GL, Bochtler M (2020) **Reversal of nucleobase methylation by dioxygenases.** *Nat Chem Biol* 16: 1160-1169 doi:10.1038/s41589-020-00675-5

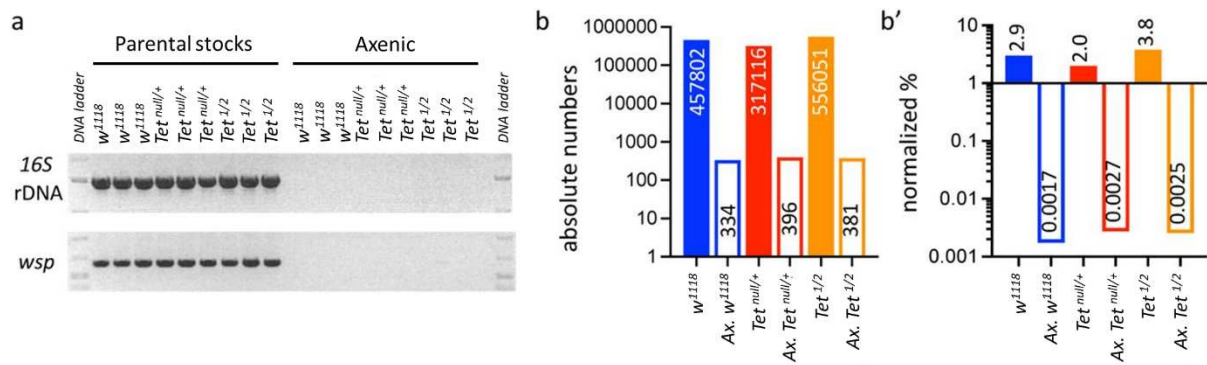
Yao B, Li Y, Wang Z, Chen L, Poidevin M, Zhang C, Lin L, Wang F, Bao H, Jiao B et al (2018) **Active N(6)-Methyladenine Demethylation by DMAD Regulates Gene Expression by Coordinating with Polycomb Protein in Neurons.** *Mol Cell* 71: 848- 857 e846 doi:10.1016/j.molcel.2018.07.005

Ye P, Luan Y, Chen K, Liu Y, Xiao C, Xie Z (2017) **MethSMRT: an integrative database for DNA N6-methyladenine and N4-methylcytosine generated by single-molecular real-time sequencing.** *Nucleic Acids Res* 45: D85-D89 doi:10.1093/nar/gkw950

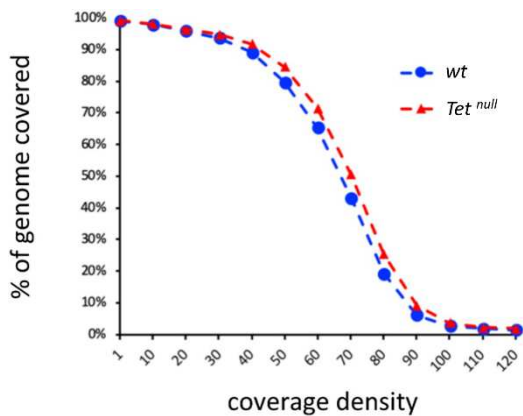
Zhang G, Huang H, Liu D, Cheng Y, Liu X, Zhang W, Yin R, Zhang D, Zhang P, Liu J et al (2015a) **N6-methyladenine DNA modification in Drosophila.** *Cell* 161: 893-906 doi:10.1016/j.cell.2015.04.018 20

Zhang Q, Zhao K, Shen Q, Han Y, Gu Y, Li X, Zhao D, Liu Y, Wang C, Zhang X et al (2015b) **Tet2 is required to resolve inflammation by recruiting Hdac2 to specifically repress IL-6.** *Nature* 525: 389-393 doi:10.1038/nature15252

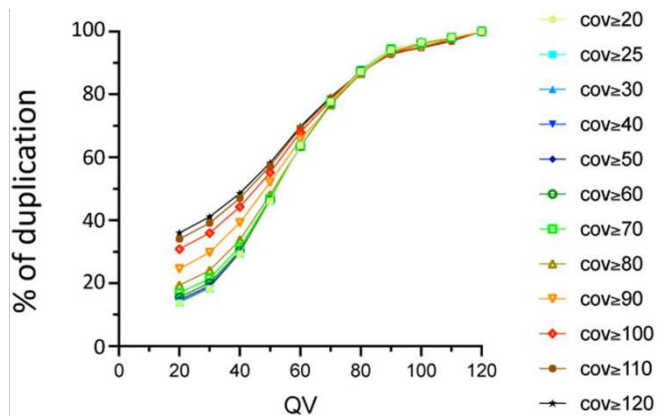
Zhu S, Beaulaurier J, Deikus G, Wu TP, Strahl M, Hao Z, Luo G, Gregory JA, Chess A, He C et al (2018) **Mapping and characterizing N6-methyladenine in eukaryotic genomes using single-molecule real-time sequencing.** *Genome Res* 28: 1067- 1078 doi:10.1101/gr.231068.117



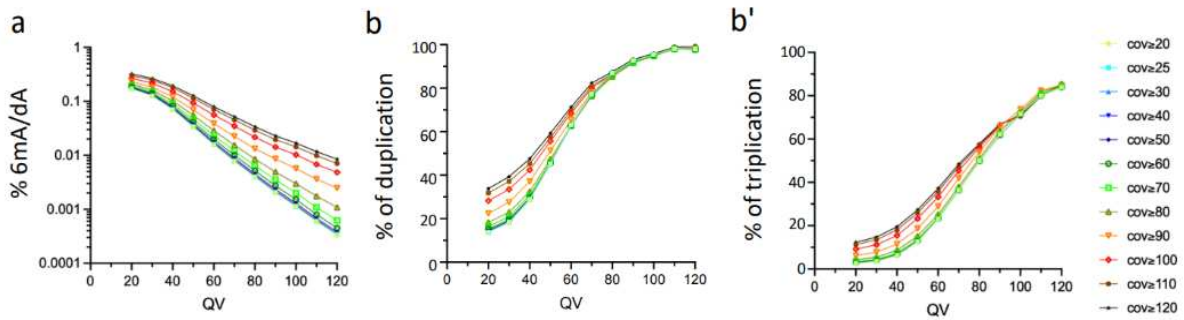
Supplementary Figure S1. Detection of bacterial contamination in parental stocks and after 3 generations of breeding in axenic conditions. **(a)** The presence of bacterial contamination in adult flies of the indicated genotypes was checked by PCR using universal primers against bacterial 16S rDNA and against the endosymbiotic bacteria gene *wsp*. **(b, b')** Genome-wide sequencing was used to assess the presence of contamination in gDNA from adult flies of the indicated genotypes. Between 15 and 19 million reads were analysed per sample. The absolute numbers of reads mapping to bacteria, virus or fungi genomes are represented in **b**, and their proportions normalized to the total number of reads are presented in **b'**. *Tet^{1/2}*: *Tet^{DMAD1/DMAD2}*.



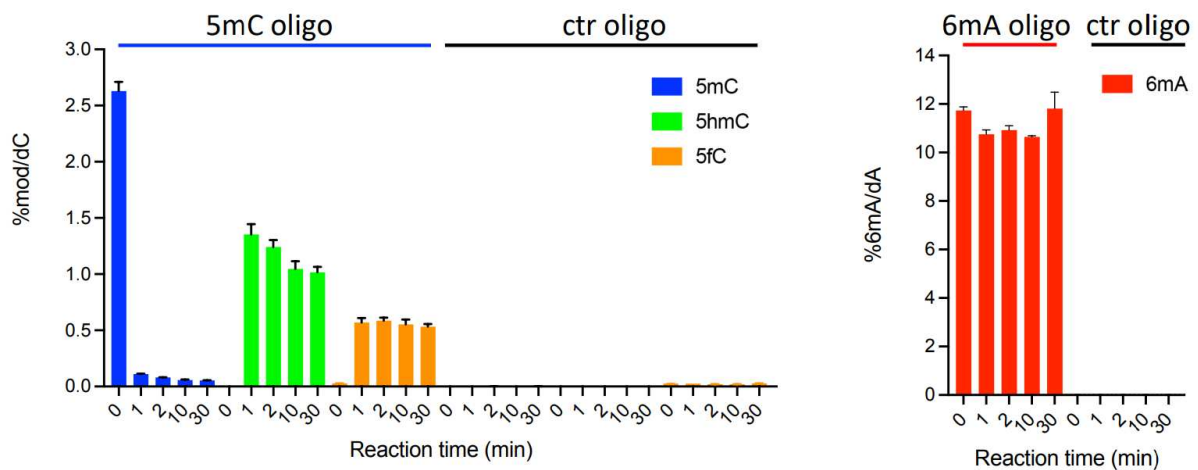
Supplementary Figure S2. Proportion of the drosophila genome covered in wild type (*wt*) and *Tet^{null}* SMRT-seq fusion datasets according to coverage density.



Supplementary Figure S3. Influence of the QV and the coverage values on the proportion of 6mA identified in the *wt* fusion dataset and in the three original samples. The percentage of 6mA identified in at least 2 out of 3 replicates is shown.



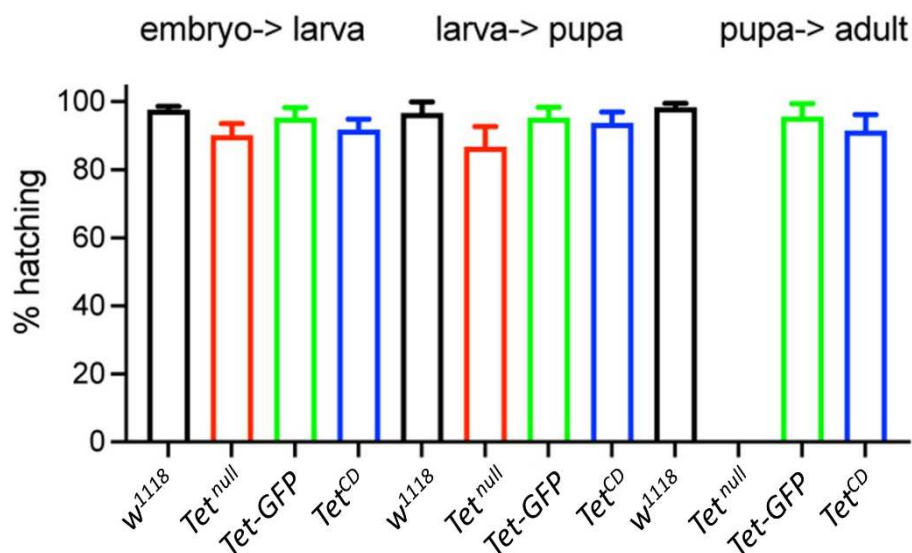
Supplementary Figure S4. (a) Percentage of all adenines identified as 6mA by SMRT-seq in the *Tet^{null}* fusion dataset depending on the QV and coverage values used for 6mA selection (log10 scale). (b, b') Influence of the QV and the coverage values on the proportion of 6mA identified in the *Tet^{null}* fusion dataset and in the three original samples (b: percentage of 6mA identified in at least 2 out of 3 samples; b': percentage of 6mA identified in all 3 samples).



Supplementary Figure S5. *In vitro* assays showing TET activity profile on double stranded oligonucleotide substrates containing or not 5mC (a) or 6mA (b). The levels of 5mC, 5hmC and 5fC normalized to dC (a) or 6mA normalized to dA (b) are represented. Error bars denote standard deviations from 3 independent experiments. Only background levels of modified nucleosides were detected when purified 23 recombinant TET catalytic domain was incubated with unmodified (ctr) oligonucleotides.

ccTET	318	IVNRATPIH R DTSGPIEGMD I LV L TGGN	344
JBP1	205	NERFRTASHTDNGDFDNGYGV L AVL K G	230
dTET	1939	CMD F CA H A H KDQH N LYNGCTV V CT L TK	1965
hTET1	1664	CLDFCA H SH R DLH N M Q DGCTV H V A LL K	1690
hTET2	1374	CLDFCA H A H R D LH N M Q NGSTLV C TL T R	1400
hTET3	1069	CLDFCA H PH R DI H N M N N GSTV V CT L TR	1095

Supplementary Figure S6. Multiple sequence alignment of TET/JBP family members. The sequence surrounding the HxD motif in *Coprinopsis cinerea* TET (ccTET), *Trypanosoma brucei* JBP1, *Drosophila melanogaster* TET (dTET) and *Homo sapiens* TET1, TET2, TET3 is shown. Conserved amino-acids between TET homologs are boxed in yellow. The two key amino acids required for 6mA oxidation by ccTET are labelled with a star.



Supplementary Figure S7. Survival assays showing the percentage of hatching embryos, larvae and adults of the indicated genotypes. Means and standard deviations are from at least 6 independent experiments.

coverage	adenines		% genome	
	wild type	Tet null	wild type	Tet null
cov ≥ 1	78 654 968	78 739 986	99,02	99,13
cov ≥ 5	78 395 357	78 519 317	98,70	98,85
cov ≥ 10	77 726 188	77 925 530	97,85	98,11
cov ≥ 15	76 953 823	77 227 836	96,88	97,23
cov ≥ 20	76 177 160	76 563 241	95,90	96,39
cov ≥ 25	75 379 803	75 976 049	94,90	95,65
cov ≥ 30	74 379 637	75 260 111	93,64	94,75
cov ≥ 35	72 931 699	74 300 152	91,82	93,54
cov ≥ 40	70 726 685	72 872 299	89,04	91,74
cov ≥ 45	67 535 617	70 594 244	85,02	88,88
cov ≥ 50	63 275 085	67 191 865	79,66	84,59
cov ≥ 60	51 840 207	56 773 516	65,27	71,48
cov ≥ 70	34 271 787	40 171 883	43,15	50,57
cov ≥ 80	15 245 823	20 154 960	19,19	25,37
cov ≥ 90	4 890 026	7 195 785	6,16	9,06
cov ≥ 100	2 063 633	2 812 939	2,60	3,54
cov ≥ 110	1 433 215	1 800 184	1,80	2,27
cov ≥ 120	1 171 957	1 471 374	1,48	1,85

Supplementary Table S1. Genome coverages of wild type and *Tet^{null}* fusion datasets in SMRT-seq.

% 6mA/A											
wild type	QV ≥ 20	QV ≥ 30	QV ≥ 40	QV ≥ 50	QV ≥ 60	QV ≥ 70	QV ≥ 80	QV ≥ 90	QV ≥ 100	QV ≥ 110	QV ≥ 120
cov ≥ 20	0,15743	0,11492	0,06314	0,02978	0,01373	0,00654	0,00325	0,00162	0,00082	0,00043	0,00022
cov ≥ 25	0,15837	0,11589	0,06378	0,03009	0,01387	0,00661	0,00329	0,00164	0,00083	0,00043	0,00023
cov ≥ 30	0,15929	0,11695	0,06456	0,03049	0,01406	0,00670	0,00333	0,00166	0,00084	0,00044	0,00023
cov ≥ 40	0,16212	0,12004	0,06698	0,03187	0,01475	0,00703	0,00350	0,00175	0,00089	0,00046	0,00024
cov ≥ 50	0,16697	0,12502	0,07128	0,03442	0,01612	0,00774	0,00389	0,00195	0,00099	0,00051	0,00027
cov ≥ 60	0,17401	0,13175	0,07713	0,03828	0,01829	0,00890	0,00455	0,00232	0,00119	0,00062	0,00032
cov ≥ 70	0,18519	0,14214	0,08607	0,04440	0,02196	0,01102	0,00583	0,00311	0,00167	0,00089	0,00047
cov ≥ 80	0,20235	0,15834	0,10042	0,05483	0,02849	0,01501	0,00834	0,00476	0,00283	0,00164	0,00096
cov ≥ 90	0,22953	0,18335	0,12391	0,07346	0,04029	0,02321	0,01372	0,00853	0,00556	0,00362	0,00235
cov ≥ 100	0,26589	0,21835	0,15778	0,10108	0,05830	0,03508	0,02132	0,01405	0,00935	0,00678	0,00480
cov ≥ 110	0,28830	0,24093	0,17841	0,11813	0,07110	0,04340	0,02707	0,01828	0,01235	0,00928	0,00670
cov ≥ 120	0,30556	0,25624	0,19284	0,12953	0,07927	0,04872	0,03123	0,02142	0,01476	0,01101	0,00802
<i>Tet^{null}</i>	QV ≥ 20	QV ≥ 30	QV ≥ 40	QV ≥ 50	QV ≥ 60	QV ≥ 70	QV ≥ 80	QV ≥ 90	QV ≥ 100	QV ≥ 110	QV ≥ 120
cov ≥ 20	0,17148	0,12640	0,07067	0,03367	0,01578	0,00780	0,00397	0,00206	0,00113	0,00060	0,00033
cov ≥ 25	0,17225	0,12719	0,07119	0,03393	0,01590	0,00786	0,00400	0,00207	0,00114	0,00060	0,00034
cov ≥ 30	0,17300	0,12806	0,07180	0,03424	0,01605	0,00794	0,00404	0,00209	0,00115	0,00061	0,00034
cov ≥ 40	0,17508	0,13032	0,07359	0,03525	0,01655	0,00820	0,00417	0,00216	0,00119	0,00063	0,00035
cov ≥ 50	0,17940	0,13475	0,07727	0,03747	0,01772	0,00881	0,00451	0,00234	0,00129	0,00068	0,00038
cov ≥ 60	0,18610	0,14122	0,08276	0,04101	0,01979	0,01003	0,00519	0,00273	0,00152	0,00080	0,00045
cov ≥ 70	0,19525	0,14991	0,09056	0,04653	0,02322	0,01206	0,00643	0,00353	0,00200	0,00109	0,00062
cov ≥ 80	0,20923	0,16239	0,10206	0,05504	0,02870	0,01548	0,00855	0,00493	0,00298	0,00175	0,00109
cov ≥ 90	0,23155	0,18259	0,12108	0,06949	0,03891	0,02250	0,01330	0,00856	0,00567	0,00363	0,00247
cov ≥ 100	0,26684	0,21700	0,15219	0,09328	0,05610	0,03484	0,02172	0,01426	0,01024	0,00683	0,00483
cov ≥ 110	0,30064	0,24820	0,17998	0,11427	0,07094	0,04566	0,02927	0,01961	0,01433	0,00989	0,00705
cov ≥ 120	0,32235	0,26601	0,19451	0,12614	0,07945	0,05192	0,03398	0,02297	0,01679	0,01176	0,00850

Supplementary Table S2. Percentages of 6mA/A according to QV and coverage cutoff in wild type and *Tet^{null}* fusion datasets.

% triplicated											
<i>wild type</i>	QV ≥ 20	QV ≥ 30	QV ≥ 40	QV ≥ 50	QV ≥ 60	QV ≥ 70	QV ≥ 80	QV ≥ 90	QV ≥ 100	QV ≥ 110	QV ≥ 120
cov ≥ 20	2,5	3,5	6,2	12,6	23,1	36,3	50,6	63,1	72,0	80,0	84,7
cov ≥ 25	2,5	3,5	6,2	12,6	23,1	36,3	50,6	63,1	72,0	80,0	84,7
cov ≥ 30	2,6	3,5	6,3	12,6	23,1	36,3	50,6	63,1	72,0	80,0	84,7
cov ≥ 40	2,6	3,6	6,3	12,7	23,1	36,3	50,6	63,1	72,0	80,0	84,7
cov ≥ 50	2,8	3,7	6,5	12,8	23,3	36,5	50,8	63,2	72,0	80,0	84,7
cov ≥ 60	3,1	4,0	6,8	13,1	23,5	36,5	51,0	63,0	72,2	80,1	85,1
cov ≥ 70	3,5	4,6	7,5	13,9	24,3	37,7	52,2	63,3	72,8	80,0	85,1
cov ≥ 80	4,5	5,8	9,0	15,7	26,0	38,5	51,8	62,4	72,0	79,6	84,4
cov ≥ 90	6,7	8,3	12,1	19,2	29,8	42,3	55,6	65,9	71,0	76,8	82,6
cov ≥ 100	9,7	11,8	15,8	23,0	33,7	46,0	58,2	65,9	70,5	75,7	82,8
cov ≥ 110	11,5	13,7	17,9	25,2	35,9	48,6	60,1	67,9	72,3	76,7	82,3
cov ≥ 120	12,4	14,7	18,9	26,3	36,9	49,4	59,8	67,3	71,7	76,0	81,9

% triplicated or duplicated											
<i>wild type</i>	QV ≥ 20	QV ≥ 30	QV ≥ 40	QV ≥ 50	QV ≥ 60	QV ≥ 70	QV ≥ 80	QV ≥ 90	QV ≥ 100	QV ≥ 110	QV ≥ 120
cov ≥ 20	13,6	18,2	29,2	46,1	63,8	77,6	87,3	94,2	96,5	98,2	100,0
cov ≥ 25	13,7	18,3	29,3	46,1	63,8	77,6	87,3	94,2	96,5	98,2	100,0
cov ≥ 30	13,8	18,3	29,3	46,1	63,8	77,6	87,3	94,2	96,5	98,2	100,0
cov ≥ 40	14,1	18,6	29,4	46,1	63,8	77,6	87,3	94,2	96,5	98,2	100,0
cov ≥ 50	14,7	19,2	29,7	46,1	63,7	77,6	87,3	94,2	96,5	98,2	100,0
cov ≥ 60	15,6	20,1	30,4	46,4	63,6	77,4	87,4	94,2	96,4	98,1	100,0
cov ≥ 70	16,9	21,5	31,5	46,9	63,6	77,5	87,6	94,4	96,3	98,0	100,0
cov ≥ 80	19,4	24,1	33,7	48,1	63,5	76,7	86,7	93,5	96,1	98,0	100,0
cov ≥ 90	24,6	29,8	39,2	52,1	65,6	76,7	87,2	93,8	95,2	97,7	100,0
cov ≥ 100	30,8	36,0	44,3	55,2	68,0	78,0	87,7	93,1	95,3	97,1	100,0
cov ≥ 110	34,1	39,2	47,0	57,3	69,2	78,8	87,4	92,7	94,9	97,0	100,0
cov ≥ 120	36,0	41,1	48,5	58,2	69,8	79,2	87,2	92,8	94,8	96,9	100,0

% triplicated											
<i>Tet null</i>	QV ≥ 20	QV ≥ 30	QV ≥ 40	QV ≥ 50	QV ≥ 60	QV ≥ 70	QV ≥ 80	QV ≥ 90	QV ≥ 100	QV ≥ 110	QV ≥ 120
cov ≥ 20	2,6	3,6	6,4	12,6	23,2	36,4	50,1	62,2	71,6	80,0	84,0
cov ≥ 25	2,7	3,6	6,4	12,6	23,2	36,4	50,1	62,2	71,6	80,0	84,0
cov ≥ 30	2,7	3,6	6,4	12,6	23,2	36,4	50,1	62,2	71,6	80,0	84,0
cov ≥ 40	2,7	3,6	6,4	12,7	23,2	36,4	50,1	62,2	71,6	80,0	84,0
cov ≥ 50	2,8	3,8	6,5	12,8	23,2	36,4	50,0	62,0	71,6	80,0	84,0
cov ≥ 60	3,1	4,0	6,8	13,1	23,3	36,4	50,0	61,9	71,5	80,0	84,0
cov ≥ 70	3,5	4,5	7,4	13,7	23,8	36,7	50,2	62,2	71,7	80,7	84,4
cov ≥ 80	4,3	5,5	8,6	15,1	25,2	38,0	51,0	63,8	72,3	81,6	85,0
cov ≥ 90	6,2	7,8	11,5	18,7	28,9	41,9	54,0	65,7	73,8	82,4	84,8
cov ≥ 100	9,2	11,2	15,5	23,3	33,2	45,4	56,1	66,3	71,5	80,2	85,3
cov ≥ 110	11,2	13,5	18,0	25,9	35,8	47,3	57,1	66,6	70,5	79,8	85,0
cov ≥ 120	12,3	14,7	19,5	27,4	37,2	48,4	57,8	66,9	70,9	79,8	84,8

% triplicated or duplicated											
<i>Tet null</i>	QV ≥ 20	QV ≥ 30	QV ≥ 40	QV ≥ 50	QV ≥ 60	QV ≥ 70	QV ≥ 80	QV ≥ 90	QV ≥ 100	QV ≥ 110	QV ≥ 120
cov ≥ 20	13,8	18,3	28,9	45,4	63,2	77,3	86,9	92,6	95,4	98,2	98,0
cov ≥ 25	13,8	18,3	28,9	45,4	63,2	77,3	86,9	92,6	95,4	98,2	98,0
cov ≥ 30	13,9	18,4	28,9	45,4	63,2	77,3	86,9	92,6	95,4	98,2	98,0
cov ≥ 40	14,1	18,6	29,0	45,4	63,2	77,3	86,9	92,6	95,4	98,2	98,0
cov ≥ 50	14,5	19,0	29,3	45,5	63,1	77,3	86,9	92,5	95,4	98,2	98,0
cov ≥ 60	15,2	19,6	29,6	45,5	62,9	77,1	86,8	92,6	95,4	98,2	98,0
cov ≥ 70	16,4	21,0	30,8	46,0	62,9	76,9	86,3	92,0	95,0	98,2	98,0
cov ≥ 80	18,3	23,0	32,5	47,3	62,8	76,4	85,4	91,6	94,8	98,0	97,7
cov ≥ 90	22,4	27,6	37,1	51,3	65,5	77,9	85,2	91,9	94,9	98,1	97,8
cov ≥ 100	28,2	33,5	42,4	55,7	68,4	80,1	86,4	92,5	95,1	98,4	98,5
cov ≥ 110	31,9	37,1	45,3	57,4	69,7	81,0	86,7	92,6	95,3	98,9	99,2
cov ≥ 120	33,8	39,3	47,6	59,3	71,3	82,3	87,6	93,2	96,0	98,8	99,2

Supplementary Table S3. Proportions of replicated 6mA (triplicated and/or duplicated).

Fraction of methylation	QV ≥ 20	QV ≥ 30	QV ≥ 40	QV ≥ 50	QV ≥ 60	QV ≥ 70	QV ≥ 80	QV ≥ 90	QV ≥ 100	QV ≥ 110	QV ≥ 120
WT1, cov≥25	0,6419	0,7238	0,7952	0,7795	0,7169	0,6610	0,6201	0,6035	0,6054	0,6081	0,6182
WT2, cov≥25	0,6178	0,7009	0,7376	0,6723	0,5754	0,5306	0,5548	0,5686	0,5484	0,5691	0,5882
WT3, cov≥25	0,6253	0,6902	0,6837	0,5996	0,5583	0,5293	0,5394	0,5545	0,5539	0,5597	0,5833
Tet ^{null} 1, cov≥25	0,6348	0,7117	0,7832	0,7849	0,7172	0,6354	0,5989	0,5920	0,6046	0,6114	0,6234
Tet ^{null} 2, cov≥25	0,6220	0,7010	0,7275	0,6420	0,5787	0,5387	0,5206	0,5281	0,5494	0,5839	0,5754
Tet ^{null} 3, cov≥25	0,6072	0,6753	0,6700	0,5931	0,5519	0,5158	0,5395	0,5333	0,5476	0,5662	0,6034

Supplementary Table S4. Percentages of 6mA/A and 6mA fractions of methylation according to QV in the three wild type or three Tet^{null} datasets (coverage ≥25x).

2. TET agit avec PRC1 pour activer l'expression des gènes indépendamment de son activité catalytique

Les enzymes de la famille TET sont des régulateurs clés de l'expression des gènes du fait de leur capacité à oxyder les 5mC sur l'ADN (Lio et al. 2020). Cependant, de récentes études montrent grâce à l'utilisation d'allèles permettant l'expression de protéines TET dépourvues d'activité catalytique que ces enzymes peuvent également agir par des voies non-enzymatiques (K. Ito et al. 2019; Flores et al. 2023). Par exemple, les protéines TET peuvent contrôler l'expression de leurs gènes cibles via des interactions protéine-protéine avec des facteurs de transcription ou d'autres enzymes épigénétiques. Ainsi, TET2 chez les mammifères peut s'associer à OGT pour activer la transcription (Q. Chen et al. 2013), et TET1 interagit avec les complexes sin3A et PRC2 pour la réprimer (Chrysanthou et al. 2022). Cependant, l'étude des modes d'action des enzymes TET reste complexe chez les vertébrés due à une redondance fonctionnelle entre ces protéines. De manière intéressante, le génome de la Drosophile code pour un gène *Tet* bien conservé, mais pas pour une DNMT capable de déposer la marque 5mC, et est globalement dépourvu de cette marque épigénétique (Bewick et al. 2017). Cet organisme représente de ce fait un modèle de choix pour caractériser les fonctions non-canoniques des enzymes TET. De plus, nos résultats précédents indiquent que l'activité catalytique de TET n'est pas requise pour le développement des mouches. Cela suggère que les enzymes TET agissent majoritairement par un mode d'action non-enzymatique chez la Drosophile, mais le mécanisme sous-jacent est encore inconnu.

L'objectif de cette étude a été de mieux caractériser le mode d'action de TET dans le SNC larvaire de la Drosophile. La comparaison des phénotypes associés à la perte totale de TET ou de son activité catalytique seulement montre que TET participe à l'activation de ses gènes cibles majoritairement de façon non-enzymatique. TET se lie principalement à des régions actives du génome et colocalise avec les protéines PcG. Plus précisément, TET interagit avec le complexe PRC1, et ces deux facteurs peuvent promouvoir leur recrutement sur les gènes cibles de TET afin d'activer leur transcription indépendamment de PRC2. Nos résultats apportent une meilleure compréhension des modes de régulation de l'expression des gènes par les enzymes TET, puisqu'ils mettent en lumière un nouveau mode d'action non-enzymatique pour cette famille d'enzyme.

Drosophila TET acts together with PRC1 to activate gene expression independently of its catalytic activity.

Guerric Gilbert ¹, Yoan Renaud ¹, Camille Teste ¹, Nadège Anglaret ¹, Romane Bertrand ¹, Bernd Schüttengruber ², Giacomo Cavalli ², Lucas Waltzer ^{1*} & Laurence Vandel ^{1*}

¹ Université Clermont Auvergne, CNRS, INSERM, iGReD, F-63000 Clermont-Ferrand, France

² Institute of Human Genetics, CNRS and University of Montpellier, Montpellier, France

* co-corresponding authors

Abstract

Enzymes of the Ten Eleven Translocation family play a key role in the regulation of gene expression in many species by oxidizing 5-methylcytosine (5mC), a prominent epigenetic mark, into 5-hydroxymethylcytosine (5hmC). Yet, TET proteins also have non-canonical modes of action beyond 5mC oxidation, notably in *Drosophila* whose genome is devoid of this epigenetic mark. As our recent data showed that TET catalytic activity is largely dispensable for its function in *Drosophila*, here we further investigated how TET regulates gene expression. The comparison of *null* and *catalytic dead* mutant alleles revealed that TET controls larval central nervous system (CNS) development mainly through a catalytic-independent process. Interestingly, genome-wide profiling of TET binding to chromatin revealed that TET is mostly recruited to enhancer and promoter regions and that its binding sites strongly overlap with Polycomb Group Complex (PcG) proteins, particularly on genes whose transcription is activated by TET. Actually, we found that TET colocalizes preferentially with PRC1 on chromatin and interacts with PRC1 but not with PRC2. Besides, our data show that *PRC1* but not *PRC2* knock-down affects the expression of TET-activated genes in the larval CNS. Furthermore, TET loss causes a decrease in the binding of the PRC1 component Ph on those genes and *vice versa* but does not affect the binding of the PRC2 protein E(z). Altogether, our data indicate that TET mainly acts in a catalytic-independent manner to promote larval CNS development and interacts with PRC1 to activate gene expression.

Keywords

Ten Eleven Translocation (TET); DMAD; CNS; larval brain; drosophila; Polycomb Group Complex; PRC1; PRC2; Catalytic activity

Introduction

Epigenetic enzymes are involved in reversible modifications of DNA or histones, which impact chromatin structure and recruitment of chromatin binding factors (Villasenor and Baubec, 2021). Thereby, they play an important role in genome biology notably by regulating gene transcription, DNA replication or genome stability. Accordingly, the balanced action of writers, which deposit these modifications, and erasers, which remove these marks, controls cell fate choice and differentiation in multicellular organisms. Indeed, mutations affecting these enzymes can cause developmental defects and various pathologies, including cancers and neurodegenerative disorders (Armstrong et al., 2019; Lee and Kim, 2022). The development of drugs targeting the enzymatic activity of these factors has thus emerged as a promising therapeutic avenue for these diseases (Sahafnejad et al., 2023; Valencia and Kadoch, 2019). Yet, recent studies revealed that several epigenetic enzymes also possess crucial catalytic-independent functions (Morgan and Shilatifard, 2023), calling for a careful reexamination of the bases for their loss-of-function phenotypes.

Since their discovery in 2009, members of the Ten Eleven Translocation (TET) family have emerged as key players in the epigenetic regulation of gene expression (Iyer et al., 2009; Lio et al., 2020 #305). Indeed, TET proteins are Fe^{2+} - and 2-oxoglutarate- dependent dioxygenases capable of oxidizing 5-methylcytosine (5mC) on DNA into 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) and further oxidized derivatives, which serve as intermediate products in the cytosine demethylation cascade or as stable epigenetic marks with distinct regulatory roles (Bachman et al., 2014; He et al., 2011; Ito et al., 2011; Spruijt et al., 2013; Tahiliani et al., 2009). Since 5mC is a prevalent epigenetic mark in many species (Schmitz et al., 2019), the discovery of 5mC “demethylases” has sparked much interest. Indeed, TET enzymes are conserved across evolution in metazoans and their functions have been particularly well studied in mammals, where the three TET paralogs (TET1-3) are implicated in a variety of biological processes including regulation of embryonic stem cell pluripotency, blood cell differentiation and immune response, or nervous system development and neuronal plasticity (MacArthur and Dawlaty, 2021; Yang et al., 2020). Their role is also highlighted in human pathologies as somatic mutations affecting TET genes are frequently associated with the development of various cancers, in particular leukemia (Delhommeau et al., 2009; Langemeijer et al., 2009; Lio et al., 2019), and TET2 germline mutations have been

linked to blood cell transformation (Duployez et al., 2020; Stremenova Spegarova et al., 2020; Zink et al., 2017), or neurodevelopmental and neurodegenerative disorders for TET1 (Beck et al., 2020; Cochran et al., 2020; Seyama et al., 2022).

So far, TET protein activity has been largely associated with their capacity to oxidize 5mC, thereby regulating transcription by promoting DNA hypomethylation after their recruitment to chromatin by specific transcription factors (Lio et al., 2020 #305). Consistently, most studies focused on the link between TET and 5mC/5hmC levels, in particular in pathological contexts such as leukemia or neurodevelopmental and neurodegenerative disorders (Lio et al., 2019; MacArthur and Dawlaty, 2021). Still, less studied non-canonical modes of actions have been described that contribute to TET functions (Yang et al., 2020). First, TET proteins also oxidize 5-methylcytosine on RNA (m5C) (Basanta-Sanchez et al., 2017; Fu et al., 2014). Along that line, both TET1 and TET2 bind RNA (He et al., 2021; He et al., 2016; Lan et al., 2020), and it was proposed that TET-mediated hydroxymethylation of mRNA (Delatte et al., 2016; Guallar et al., 2018; Lan et al., 2020; Li et al., 2023; Shen et al., 2018) or tRNA (He et al., 2021; Shen et al., 2021) regulates gene expression at the post-transcriptional level. Second, it was shown in vertebrates by overexpression and rescue experiments or using catalytic-dead alleles, that some functions of TET1 (Damal Villivalam et al., 2020; Gao et al., 2016; Kaas et al., 2013; Stolz et al., 2022; Tsai et al., 2014; van der Veer et al., 2023), TET2 (Ito et al., 2019; Montagner et al., 2016; Zhang et al., 2015b) or TET3 (Montagner et al., 2016; Xu et al., 2012) are independent of their enzymatic activity. Notably, TET proteins also control gene expression indirectly by interacting with other factors implicated in chromatin regulation (Yang et al., 2020). For instance, mammalian TETs interact with the O-linked N-acetylglucosamine transferase (OGT) to activate transcription (Chen et al., 2013; Deplus et al., 2013; Vella et al., 2013), whereas TET1 was shown to bind the Sin3A deacetylase (Williams et al., 2011) and the Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) to repress transcription (Neri et al., 2013; Wu et al., 2011). Actually, there is strong evidence in embryonic stem cells that TET1 can promote gene repression in a catalytic-independent manner by recruiting PRC2 and Sin3A to target Histone H3 lysine 27 (H3K27) modifications (Chrysanthou et al., 2022; van der Veer et al., 2023). However, the analyses of TET functions and modes of action in vertebrates are difficult due to partial gene redundancy and cross-regulatory interactions between TET proteins (Dawlaty et al., 2013; Lu et al., 2014; Stolz et al., 2022; van der Veer et al., 2023).

Interestingly, the *Drosophila* genome contains a single and well-conserved Tet gene even though it does not code for 5mC DNA methyltransferase and is largely devoid of this epigenetic mark (Bewick et al., 2017; Iyer et al., 2011; Iyer et al., 2009). This insect thus stands as a valuable model system to investigate TET non-canonical functions. The complete loss of Tet expression is lethal at the pupal stage (Delatte et al., 2016; Wang et al., 2018; Zhang et al., 2015a), indicating that TET plays a vital role in this organism. Further analyses showed that Tet loss or knock-down affects ovarian development (Wang et al., 2018; Zhang et al., 2015a), zygotic genome activation in the early embryo (He et al., 2019), larval locomotion (Wang et al., 2018), as well as larval and adult brain development (Delatte et al., 2016; Frey et al., 2022; Ismail et al., 2019; Yao et al., 2018). At the molecular level, TET function was attributed either to the oxidation of m5C on mRNA to promote translation (Delatte et al., 2016), or to the oxidation of 6-methyladenine (6mA) on DNA to control transcription (Yao et al., 2018; Zhang et al., 2015a). However, the direct impact of TET enzymes on mRNA epitranscriptome remains disputed notably because hm5C is essentially detected on tRNAs (He et al., 2021; Shen et al., 2021; Yao et al., 2018). In addition, the presence and potential significance of 6mA in metazoan genomes remain highly controversial (Boulias and Greer, 2022), and the capacity of *drosophila* TET to oxidize 6mA is at odd with the conserved structure of its catalytic domain, which lacks crucial amino acids necessary for 6mA recognition and oxidation in more distant TET homologs or in the related AlkB family of 6mA-demethylase, strongly suggesting that TET cannot demethylate 6mA (Iyer et al., 2016; Mu et al., 2022). Indeed, our recent results further support the conclusion that TET does not act as a 6mA-demethylase in *drosophila* and showed that, in contrast to its expression, TET catalytic activity is dispensable for adult fly emergence, survival and reproduction (Boulet et al., 2023). Thus, TET essentially acts via a catalytic-independent manner in *drosophila*, but the underlying molecular mechanisms remain unknown.

To fill this gap, we further dissected TET mode of action in the larval central nervous system (CNS). By comparing the phenotypes associated with the absence of TET expression or only of its catalytic activity and using a combination of genetics, transcriptomics and chromatin profilings, we show that TET can directly activate gene transcription independently of its catalytic activity. Our results show that TET binding sites strongly overlap with PcG proteins and we found that TET preferentially colocalizes with PRC1 than with PRC2 on chromatin. Moreover, TET interacts with PRC1 but not with PRC2 in the larval CNS, and only

PRC1 is required for the activation of TET target genes. In addition, we found that TET and PRC1 facilitate each other recruitment to chromatin on TET-activated target genes. Our results highlight a novel mode of gene expression regulation by TET which does not require its catalytic activity and bring further evidence for PRC1 implication in the activation of gene transcription independently of PRC2.

Materials & Methods

Fly strains and husbandry

The following *D. melanogaster* strains were used: *w¹¹¹⁸*, *Tet^{null}* (Delatte et al., 2016), *Tet-GFP*, *Tet^{CD}-GFP (Tet^{CD})* (Boulet et al., 2023), *UAS-RNAi white* (BL33623), *UAS-RNAi ph* (Vienna Drosophila Resource Center, VDRC50028), *UAS-RNAi E(z)* (BL33659), *UAS-RNAi Tet* (BL62280), *sim-GAL4* (BL9150), *sgs3-GAL4* (BL6870), *tub-GAL4*, *tub-GAL80^{ts}* (BL86328). *UAS-HA-Tet* transgenic flies were generated by cloning the full-length *Tet* cDNA (NP_001261344.1) in frame with an N-terminal 3xHA tag into the pUASTattB vector. The resulting plasmid was used by CBM Drosophila Transgenesis Facility (Madrid) to generate transgenic flies using phiC31-based integration system (Bischof et al., 2007). Unless otherwise specified, stock maintenance and sample collection were performed using classic fly medium (75 g/l organic corn flour, 28 g/l dry yeast, 40 g/l sucrose, 8 g/l agar, 10 ml/l Moldex 20%) with a 12 h dark:light cycle at 25°C. For *ph* and *E(z)* RNAi knock-down experiments, *UAS-RNAi* flies were crossed to *tub-GAL4*, *tub-GAL80^{ts}* flies at 18°C. Following 8h of egg-laying, adult flies were discarded, and the tubes were kept at 18°C for 96h before being transferred at 29°C for 48h to collect third instar larvae.

Immunostainings and Imaging

For CNS immunostaining, wandering third instar larvae were dissected in 1X Phosphate Buffer Saline (PBS) and fixed for 30 min in PBS containing 4% paraformaldehyde. Fixed samples were washed rapidly twice with PBS and 3 times for 15 min with PBS- 0.3% Triton X-100 (PBT) before being pre-incubated for 1h in PBT – 1% bovine serum Albumin (BSA, Sigma). Samples were incubated overnight at 4°C with primary antibody diluted in PBT- 1% BSA, washed 3 times for 15 min in PBT, and incubated with respective secondary antibodies diluted in PBT- 1% BSA for 2h at room temperature or overnight at 4°C. Samples were washed in PBT and larval CNS were further dissected and mounted in Vectashield - DAPI (Vector Laboratories).

For polytene chromosome preparation, *UAS-HA-Tet* flies were crossed to *sgs3-GAL4* flies at 18°C. Third instar larvae were collected, and salivary glands were dissected in 1X PBS, fixed for 30 sec in 1X PBS, 1% Triton X-100, 3.7% PFA, and for 2 min 30 sec in 1X PBS, 3.7% PFA, 50% acetic acid. Salivary glands were squashed between a coverslip and a poly-L-lysine-treated slide to spread chromosomes. Slides were then snap-frozen in liquid nitrogen. Coverslips were quickly removed, and slides were washed twice for 15 min in 1X PBS before incubation for 1h in blocking solution (1X PBS, 1% BSA). Antibodies diluted in blocking solution were then incubated with the slides at 4°C overnight in a humid chamber. Slides were washed twice in washing solution (1X PBS, 300mM NaCl, 0.2% NP40, 0.2% Tween20) before being incubated for 2h at room temperature with the appropriate secondary antibodies diluted in the blocking solution. Chromosome preparations were then washed twice in washing solution and mounted in Vectashield - DAPI (Vector Laboratories).

The following antibodies were used: mouse anti-Slit (DSHB C555.6D, dilution 1/50), mouse anti-Fasciclin III (DSHB 7G10, 1/50), rat anti-HA (Sigma #11867423001, 1/500), goat anti-Ph (1/500) (Grimaud et al., 2006), rabbit anti-E(z) (1/500) (Gambetta et al., 2009), donkey anti-rabbit, anti-mouse or anti-goat Alexa Fluor 488 (Invitrogen, 1/1000), donkey anti-rat or anti-mouse Cy3 (Jackson ImmunoResearch, 1/1000). Images were acquired using a Zeiss SP8 confocal microscope.

RNA-seq and data analysis

Total RNA was isolated from 30 third instar larval brains dissected in ice-cold PBS using Trizol™ extraction. RNA quality and concentration were assessed with Agilent TapeStation and Qubit device. Libraries were prepared using the Illumina TruSeq RNA Library Prep kit and sequenced by Novogene (Cambridge, UK) on Novaseq 6000 (paired-end, 150pb). Reads were filtered and trimmed to remove adapter-derived or low-quality bases using Trimmomatic Cutadapt and checked again with FASTQC. Illumina reads were aligned to the *Drosophila* reference genome (dm6 Ensembl release 70) with Hisat2. Read counts were generated for each annotated gene using HTSeq-Count. RPKM (Reads Per Kilobase of exon per Megabase of library size) values were calculated using Cufflinks. Read normalization, variance estimation and pair-wise differential expression analysis with multiple testing corrections were conducted using the R Bioconductor DESeq2 package. Gene set enrichment analyses were performed with Pangea (Hu et al., 2023), using all the genes expressed in the larval CNS as a

background universe. Enrichment in Gene Ontology terms and Pathways (KEGG, Panther, Reactome) were considered significant for a P -value <0.01 using the Benjamini-Hochberg correction.

ChIP-seq and ChIP-qPCR

ChIP-seq and ChIP-qPCR were performed as previously described (Loubiere et al., 2017) with minor modifications. Briefly, for ChIP-seq, ~400 third instar larvae brains were dissected per replicate in ice-cold PBS and experiments were performed in duplicates for each genotype. For ChIP-qPCR, ~50 CNS were used per replicate and experiments were performed in triplicates. Samples were fixed for 15 min in 1.8% PFA with shaking before quenching for 5 min by adding glycine to a final concentration of 350 mM. Tissues were lysed in 1% SDS lysis buffer (140mM NaCl, 15mM HEPES, 1mM EDTA, 0.5mM EGTA, 1% Triton, 0.5mM DTT, 0.1% sodium deoxycholate, 10 mM sodium butyrate, 1X Merck cOmplete EDTA-free protease inhibitor cocktail) before sonication using a Bioruptor pico device (Diagenode) with the following settings: 18 cycles, 30 sec ON / 30 sec OFF. The size of DNA fragments was confirmed on agarose gel (200-300pb). Samples were pre-cleared with a 50/50 mix of protein-A-agarose beads (Sigma, P7786) and protein-G-Sepharose Fast Flow beads (Sigma, P3296) for 4h at 4°C. Beads were removed and anti-GFP (Abcam Ab290), anti-Ph (Grimaud et al., 2006) or anti-Ez (Gambetta et al., 2009) antibodies diluted in 1/1000 were added and incubated overnight with the samples. Beads were added for another incubation of 4h at 4°C and then washed. DNA was de-crosslinked at 65°C before purification with Phenol: Chloroform (Sigma 77617) and precipitation overnight in ethanol. For ChIPs followed by qPCR, inputs were diluted in 1/100 and samples in 1/10. QPCRs reactions were performed with SsoFast EvaGreen reagent (Biorad) on a LightCycler 480 Instrument II (Roche Life Science). Primer sequences used for ChIP-qPCR are provided in Supplementary Table 1. For ChIP-sequencing, libraries were prepared using the NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina (NEB E7103) following the manufacturer's instructions. Finally, sequencing was performed by Novogene (Cambridge, UK) on a Novaseq 6000 device (paired-end, 150pb).

CUT&RUN

CUT&RUN was performed as previously described (Ahmad and Spens, 2019). For each sample, around 30 third instar larval CNS were dissected in cold 1X PBS. All experiments were

performed in duplicates. Tissues were bound to BioMag Plus Concanavalin-A-conjugated magnetic beads (Polysciences Inc) before blocking and permeabilization in db_e+ buffer (20mM HEPES, 150mM NaCl, 0.1% BSA, 0.5mM spermidine, 2mM EDTA, 5% digitonin, 1X Merck cOmplete EDTA-free protease inhibitor cocktail). The antibodies (cf. Supplementary Table 1) were diluted (1/100) in db_e+ buffer before overnight incubation at 4°C. Samples were washed with db_e+ buffer and then incubated for 1h at RT with CUTANA pAG MNase (EpiCypher #15-1016) diluted in db_e+ buffer. After a wash in db_e+ buffer, DNA was cleaved in wash+C buffer on ice for 30 min. The cleavage reaction was stopped and samples were treated with RNase A for 30 min at 37°C. After 2h of proteinase K treatment at 50°C, DNA was recovered using Ampure XP beads (Beckman Coulter). Library preparation and sequencing was performed as detailed for CHIP-seq.

Processing of CHIP-seq and CUT&RUN data

Sequencing Adapters were removed using TrimGalore (v0.6.6, --paired, --stringency 6). Resulting reads were mapped to the dm6 genome using bowtie2 (v2.4.2) reporting at most one hit for each read (the best one). Peaks were called using MACS2 (v2.2.7.1) to capture narrow (-q 0.05 -g dm) and broad peaks (-q 0.05 -g dm -broad -broad-cutoff 0.1). As a control, we used a CHIP with IgGs for each condition except for TET-GFP and TET^{CD}-GFP for which ChIPs were compared to ChIPs with GFP in a *w¹¹¹⁸* background. Final peak calling was done on merged replicates.

RT-qPCR

For RT-qPCR, RNA samples were prepared from dissected larval CNS using RNeasy kit (Qiagen) with an additional on-column DNase treatment with RNase-Free DNase Set (Qiagen). Reverse transcription was performed with SuperScript IV Reverse Transcriptase (ThermoFisher) according to the manufacturer's instructions on 100ng of RNA, using a mix (1:1) of random primers (Promega) and oligo dT (Promega). QPCRs were performed with SsoFast EvaGreen reagent (Biorad) on a LightCycler 480 Instrument II (Roche Life Science). Primer sequences used in RT-qPCR are provided in Supplementary Table 1. qPCR data were analyzed with $\Delta\Delta C_t$ method and gene expressions were normalized to *gadh*. All experiments were performed in biological quadruplicates.

Co-immunoprecipitations

Immunoprecipitation reactions were carried out as described in (Ray et al., 2016). Proteins from dissected 3rd instar larval CNS were extracted after dissection in cold 1X PBS supplemented with cOmplete EDTA-free protease inhibitor cocktail (Merck). Tissues were crushed with a motorized pestle in HEMG buffer (25mM HEPES, 0.1mM EDTA, 12.5mM MgCl₂, 10% glycerol, 0.01% NP-40, 10mM NaCl, 1X cOmplete EDTA-free protease inhibitor cocktail) before sonication with the Bioruptor pico device (Diagenode) (settings: 3 cycles, 30 sec ON / 30 sec OFF). Protein concentration was assayed by DC Protein Assay (Bio-Rad) and 1mg of protein was used per reaction. Proteins were pre-cleared with a 50:50 mix of protein-A-agarose beads (Sigma) and protein-G-Sepharose Fast Flow beads (Sigma) for 4h at 4°C. After beads elimination, samples were incubated with anti-Ph or anti-Ez (1/200) overnight at 4°C. Beads were then added to the samples for 4h at 4°C. After 3 washes in HEMG buffer, proteins were boiled directly in 4X Laemmli sample buffer before being subjected to Western-Blot analysis (see below).

Western blots

Proteins were loaded on 7.5% or 4-20% Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Gels (Bio-Rad) after the addition of 4x Laemmli sample buffer and denaturation at 95°C for 5 min. After migration, proteins were transferred to a nitrocellulose blotting membrane (Amersham). Membranes were washed in 1X Tris-Buffered Saline (TBS) and then blocked 1h at RT in blocking solution (1X TBS, 10% milk, 0.1% Tween-20). The following primary antibodies were diluted in washing buffer (1X TBS, 2% milk, 0.1% Tween-20) and incubated with the membranes overnight at 4°C at the following concentrations: anti-Ph (1/1000), anti-Ez (1/1000), anti-Pho (1/1000, a kind gift from J. Kassis), anti-GFP (1/1000, Takara JL-8) and anti-Tubulin (1/1000, Sigma DM1A). Membranes were washed 3 times in washing solution and incubated with appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies for 2h at RT. Detection was performed using Clarity Western ECL substrate (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions and the signals were analyzed with the ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad).

Results

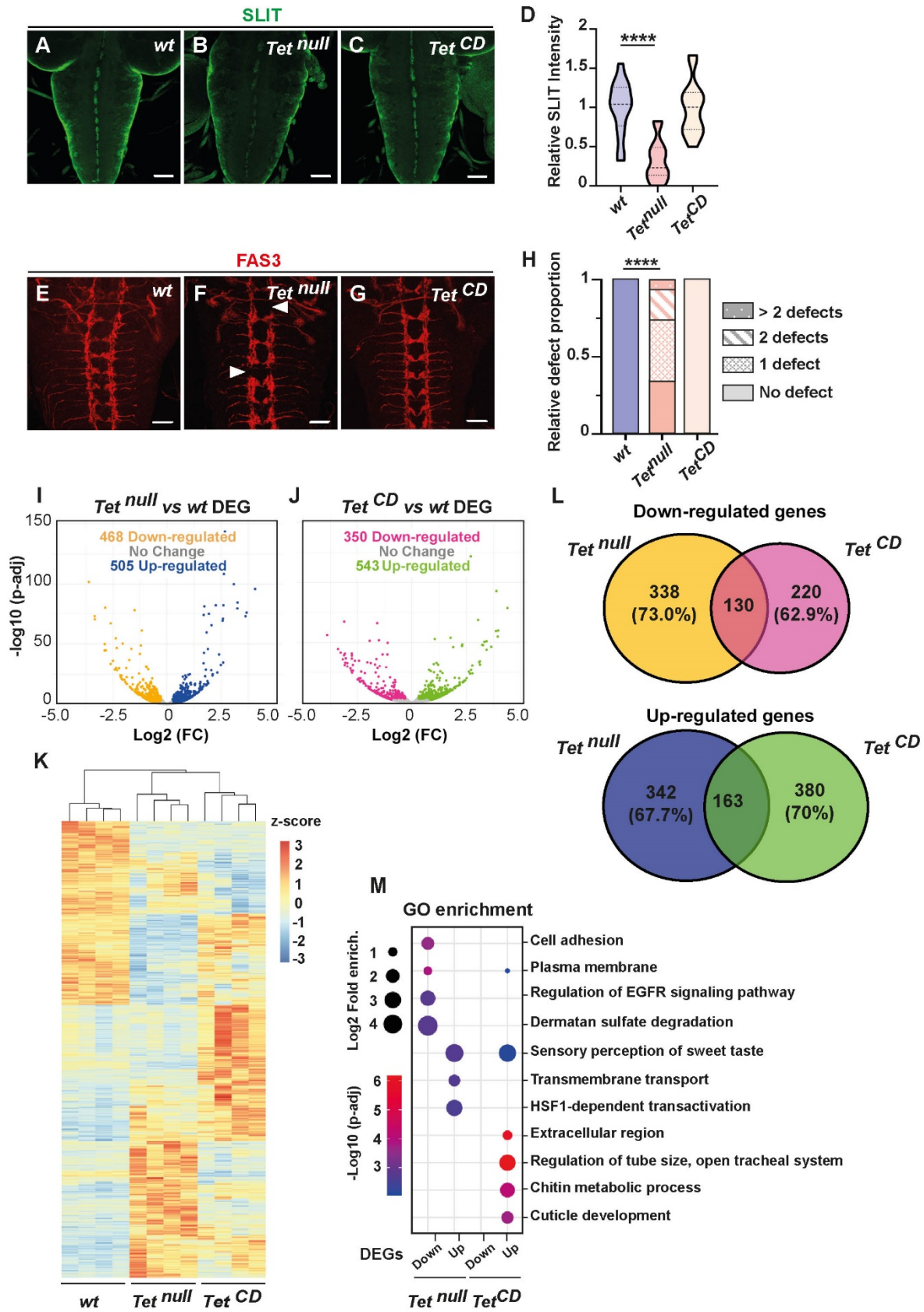


Figure 1. TET controls larval CNS development mainly in a catalytic-independent manner.

TET controls larval CNS development mainly in a catalytic-independent manner

To analyze TET catalytic and non-catalytic function in the larval CNS, we made use of two alleles: *Tet^{null}* (Delatte et al., 2016), which carries a deletion abolishing the transcription of all *Tet* isoforms, and *Tet^{CD}* (Boulet et al., 2023), which carries a double point mutation in the conserved iron binding motif (HrD to YrA) required for the catalytic activity of TET/AlkB family of enzymes (Xu and Bochtler, 2020). It was shown that RNAi-mediated *Tet* knock-down or allelic combinations causing a strong decrease in *Tet* expression lead to a reduction in the expression of the axon guidance ligand Slit (Frey et al., 2022; Ismail et al., 2019), which is normally expressed in midline glial cells of the larval CNS. Consistent with the role of Slit, this reduction was associated with axon guidance defects in the ventral nerve cord (VNC) as revealed by immunostaining against the adhesion molecule Fasciclin 3 (Fas3) (Frey et al., 2022; Ismail et al., 2019). In line with these observations, Slit levels were strongly decreased in the VNC of *Tet^{null}* larvae as compared to control (Fig. 1A, B, D). However, they were not affected in *Tet^{CD}* (Fig. 1A, C, D). Similarly, Fas 3 immunostainings revealed that longitudinal axon projections were interrupted (white arrowheads) in ~66% of the cases in the absence of *Tet* expression while they were not affected in *Tet^{CD}* larvae or in wild type conditions (Fig. 1E-H). Thus, TET controls Slit expression and axonal projections independently of its enzymatic activity.

To gain broader molecular insights into the possible catalytic and non-catalytic functions of TET, we established the genome-wide expression profile of *Tet^{null}*, *Tet^{CD}* and wild type third instar larval CNS by RNA-seq. Principal components analyses revealed that the biological replicates were clustered together but the three genotypes were clearly separated (Supplementary Figure 1) suggesting that the loss of TET expression or of its catalytic activity leads to distinct phenotypes. Differential gene expression analyses showed that complete TET loss was associated with the activation of the expression of 505 genes and the down-regulation of 468 genes (Adjusted p-value<0.01; fold change >1.2) (Fig. 1I, Supplementary Table S2). Similarly, the loss of TET catalytic activity led to the up-regulation of 543 genes and the down-regulation of 350 genes (Fig. 1J, Supplementary Table S3). Heatmap hierarchical clustering and Venn diagram analyses also showed a clearly distinct pattern of gene deregulation between these two conditions, with limited overlap between the genes either up or down-regulated in the CNS of *Tet^{null}* and *Tet^{CD}* larvae (Fig. 1K). Indeed, around 70%

Figure 1. TET controls larval CNS development mainly in a catalytic-independent manner. (A-C) Immunostaining showing Slit expression in the ventral nerve cord of wild type (A, *wt*), *Tet^{null}* (B) and *Tet^{CD}* (C) third instar larvae. Scale bar 50 μ m. (D) Quantifications of Slit expression levels. ****: One-way ANOVA $p < 0.0001$. (E-G) Immunostaining showing Fas3 expression in the ventral nerve cord of wild type (E), *Tet^{null}* (F) and *Tet^{CD}* (G) third instar larvae. Interruptions in the axonal chain are indicated by white arrowheads. Scale bar 50 μ m. (H) Quantifications of the proportion of larvae with axonal chain interruptions. ****: Fisher's t-test $p < 0.0001$. (I, J) Volcano plots showing differentially expressed genes (DEG) between wild type and *Tet^{null}* (I) or *Tet^{CD}* (J) CNS as determined by RNA-seq. (K) Heatmap and hierarchical clustering of the differentially expressed genes for the indicated genotypes. (L) Venn diagrams showing the overlap between the genes either down-regulated (upper panel) or up-regulated (lower panel) in the absence of TET expression (*Tet^{null}*) or of its catalytic activity (*Tet^{CD}*). (M) Main Gene Ontology (GO) categories over-represented among either the up- or the down-regulated genes in *Tet^{null}* or *Tet^{CD}* third instar larval CNS.

(680/973) of the genes deregulated in *Tet^{null}* are not affected in *Tet^{CD}*, suggesting that TET mostly controls gene expression in a catalytic-independent manner in the larval CNS (Fig. 1L).

Consistently, gene set enrichment analyses identified very few common terms between *Tet^{null}* and *Tet^{CD}*, except for genes associated with sensory perception of sweet taste, which were enriched among up-regulated genes in both conditions (Fig. 1M, Supplementary Table S4). Otherwise, up-regulated genes were associated with heat response or transmembrane transport in *Tet^{null}* whereas they were implicated in tracheal and cuticle development or chitin metabolism in *Tet^{CD}*. Down-regulated genes were associated with cell adhesion or epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathway in *Tet^{null}*, but no significant enrichment was found in *Tet^{CD}*. In *Tet^{null}*, enriched terms were essentially contributed by genes deregulated in a catalytic-independent manner. For instance, out of the 10 genes of the EGFR pathway down-regulated in *Tet^{null}*, 9 were not affected in *Tet^{CD}* and 8 coded for negative regulators, suggesting that TET contributes in an enzymatic-independent manner to the regulation of the EGFR pathway, which is important for ventral midline glial cells development (Gallio et al., 2004; Scholz et al., 1997). Reminiscent of the projection defects observed specifically in *Tet^{null}* larvae (Fig. 1E-H), many genes implicated in axonal guidance including *slit* as well as *Ephrin receptor tyrosine kinase (Eph)* (Boyle et al., 2006), *Ephrin* (Bossing and Brand, 2002), *failed axon connections (fax)* (Hill et al., 1995), *Fasciclin 2 (Fas2)* (Grenningloh et al., 1991), *Laminin A (LanA)* (Stevens and Jacobs, 2002) or *off-track (otk)* (Winberg et al., 2001) were down-regulated in *Tet^{null}* but not in *Tet^{CD}* (Supplementary Tables S2 & S3).

These results show that the loss of TET enzymatic activity does not recapitulate its total loss-of-function in the larval CNS as *Tet^{CD}* and *Tet^{null}* mutations elicit distinct changes. Our data also suggest that TET expression rather than its catalytic activity is key for the proper activation of genes implicated in CNS development.

TET binds to enhancers and active transcriptional start sites to activate gene expression in a catalytic-independent manner

Next, to characterize TET mode of action, we sought to determine its genomic binding profile. Accordingly, we performed ChIP-seq on dissected third instar larval CNS from *Tet-GFP* or *Tet^{CD}-GFP* knock-in flies as well as *w¹¹¹⁸* flies (as negative control) using an anti-GFP antibody (Fig. 2A). The experiments were performed in duplicates and TET peak calling was assessed against *w¹¹¹⁸* ChIP-seq results. We detected 7612 binding sites for wild type TET-GFP fusion

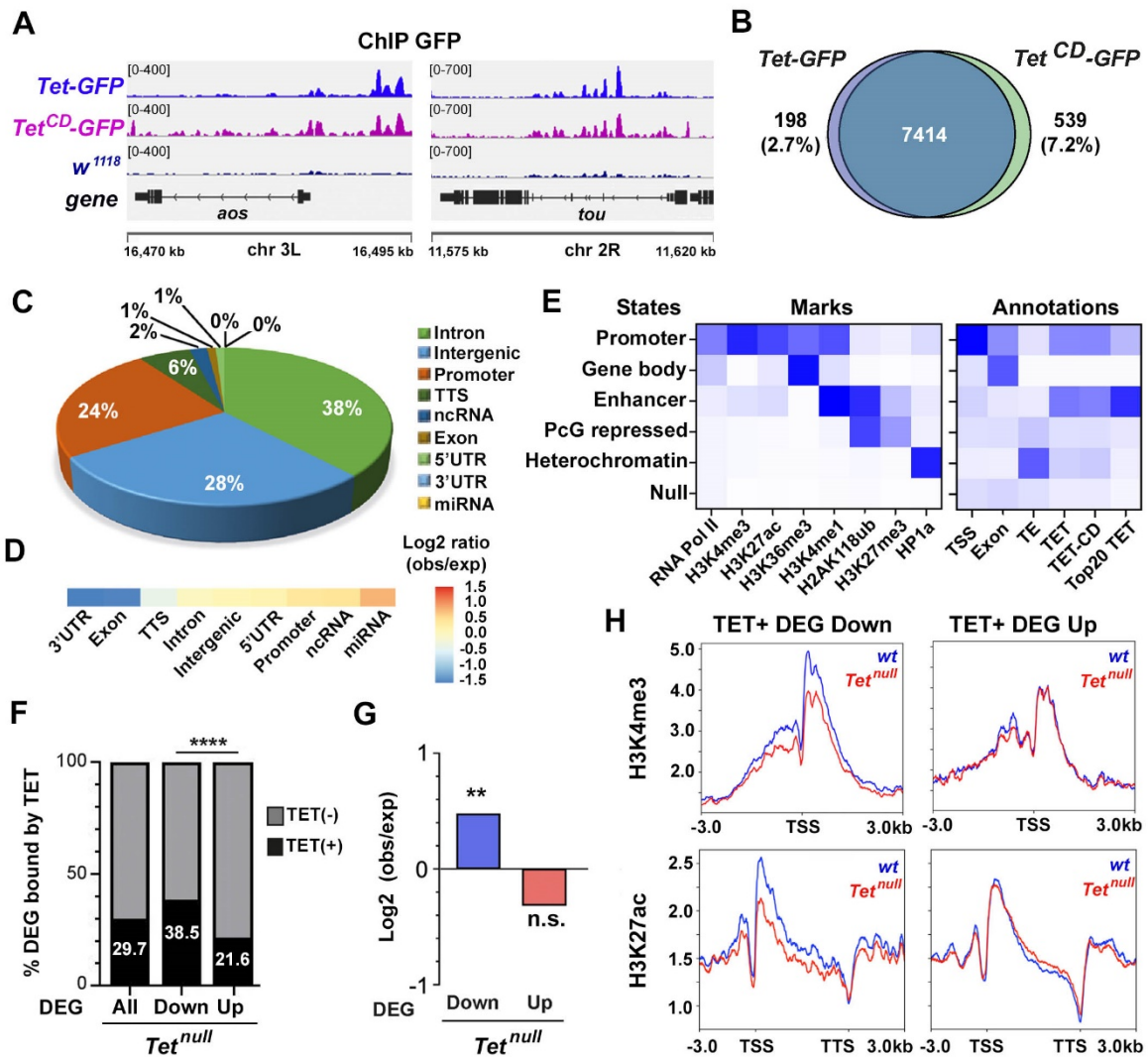


Figure 2. Genome-wide binding profile of TET binding to chromatin in the larval CNS. (A) Integrative genomics viewer (IGV) tracks showing peaks following anti-GFP ChIP-seq on dissected CNS from *TET-GFP*, *TET^{CD}-GFP* or *w¹¹¹⁸* third instar larvae. (B) Venn diagrams showing the overlap between *TET-GFP* and *TET^{CD}-GFP* peaks. (C) Pie chart of *TET-GFP* peaks distribution according to RefSeq genomic annotations. (D) Heatmap showing *TET-GFP* enrichment according to genomic features. (E) Enrichment of *TET-GFP*, *TET^{CD}-GFP* and the top 20% *TET-GFP* peaks to the different chromatin states of the larval CNS as defined by ChromHMM using ChIP-seq or CUT&RUN signals for RNA pol II, H2AK118ub, H3K4me1, H3K4me3, H3K27Ac, H3K27me3, H3K36me3 and HP1a. (F) Proportion of differentially expressed genes (DEG) between wild type and *Tet^{null}* larval CNS with TET peaks within 2kb of their TSS or in their gene body (TET+). (G) Enrichment of TET peaks among up- or down-regulated genes as compared to random sets of genes. **: Exact Fisher's test $p < 0.001$. (H) Profiles of H3K4me3 (upper panels) or H3K27ac (lower panels) CUT&RUN signals on differentially expressed TET+ target genes in the CNS of *wt* (blue) or *Tet^{null}* (red) larvae. TSS: transcription start site. TTS: transcription termination site.

protein and 7953 for its catalytic dead counterpart, with more than 92% of overlap between the two sets (Fig. 2B), indicating that the HrD to YrA mutation has a minor impact on TET binding site repertoire. As compared to annotated genomic regions, around 38% of TET peaks were in introns, 28% in intergenic regions and 24% in promoters (± 2 kb of transcription start site (TSS)) (Fig. 2C). No notable difference was observed with TET CD (Supplementary Figure 2A). Using RefSeq *D. melanogaster* genome annotations, we observed a slight over-representation for TET peaks at promoter regions (Fig. 2D). The over-representation seen for miRNA and ncRNA was due to a very small fraction of TET peaks ($n=120$) and deemed insignificant. Conversely, TET was under-represented in 3'UTR, exons and transcription termination sites (TTS). Of note, similar over- and under- representations were found for TET CD peaks (Supplementary Figure 2B). To obtain a more representative vision of TET binding sites repartition, we sought to determine the main chromatin states in the larval CNS. Accordingly, we performed ChIP-seq or CUT&RUN for the following histone marks: H3K4me3, H3K27ac, H3K27me3, H2AK118ub. In addition, we collected public datasets for H3K4me1, H3K36me3, RNA polymerase II and the heterochromatin-associated protein HP1a (see M&M). We then performed a chromatin state discovery and genome annotation analysis using ChromHMM (Ernst and Kellis, 2017). With a 6-state model, we found that TET essentially targets enhancers (42% of peaks) and active TSS/promoter regions (17% of peaks) (Fig. 2E and supplementary Figure 3). Again, a similar distribution was observed when analysing TET CD peaks. In addition, focusing on the top 20% TET peaks, we also observed that TET primarily binds enhancers (Fig. 2E and supplementary Figure 3).

The integration of the ChIP-seq and RNA-seq results showed that 29.7% (289/973) of the genes deregulated in *Tet^{null}* have a TET binding site within 2kb of their TSS or in their gene body (Fig. 2F) with TET peaks significantly more frequently found in down-regulated than in up-regulated genes (38.5% versus 21.6%, $p\text{-val}<0.001$) (Fig. 2F). Actually, as compared to random gene sets, TET peaks were over-represented in down-regulated genes but not in up-regulated ones (Fig. 2G), suggesting that TET may play a more prominent role in gene activation than gene repression. As gene transcription is correlated with H3K4me3 levels around the promoter region, we monitored the levels of this histone mark across TET target genes in the larval CNS by CUT&RUN. As compared to wild type, the H3K4me3 profile of TET target genes was not affected among the genes up-regulated in *Tet^{null}* larvae but we observed lower levels of H3K4me3 among the down-regulated genes, suggesting that TET contributes

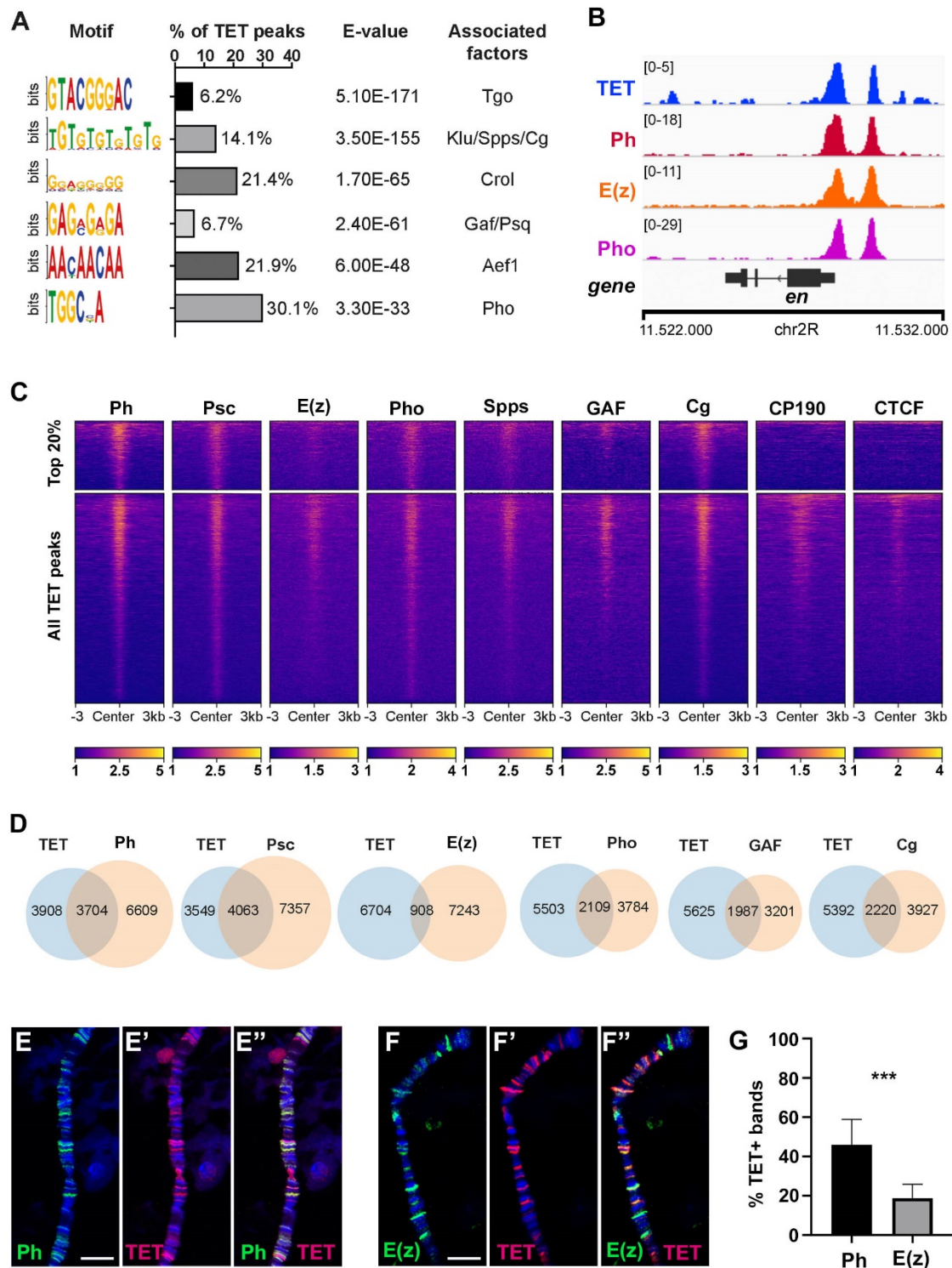


Figure 3. TET colocalizes with PRC1 and PRC2. (A) *De novo* motif discovery analysis at TET binding sites with their abundance and the associated factors. (B) Integrative genomics viewer (IGV) ChIP-seq tracks showing the binding of TET, Ph, E(z) and Pho on the *engrailed* (*en*) locus in the CNS of third instar larvae. (C) Heatmaps of binding sites of Polycomb subunits (Ph, Psc; E(z)), Polycomb recruiters (Spps, GAF, Cg) or insulators (CP190, CTCF) on all TET peaks (± 3 kb of the center) or on the top 20% of TET peaks.

to their transcriptional activation (Fig. 2H). Similar experiments in *Tet^{CD}* larvae showed that the loss of TET enzymatic activity did not alter the H3K4me3 profile of either up or down-regulated TET targets (Supplementary Figure 4). To confirm the impact of TET on gene activation, we also analyzed the H3K27ac profile and found that this activation mark was reduced around the promoter of *Tet^{null}* down-regulated genes, whereas no difference was observed in up-regulated genes (Fig. 2H). Altogether, these data suggest that TET can directly contribute to gene transactivation in a catalytic-independent manner.

TET colocalises with PRC1 and PRC2 on chromatin

In parallel, we performed *de novo* motif discovery analyses at TET peaks. Besides a very significant enrichment for Tango (Tgo) consensus binding sites, which were present in 6% of TET peaks, we primarily recovered motifs corresponding to binding sites for the transcription factors Pleiohomeotic (Pho) (30%), Crooked-legs (Crol) (21%), Combgap (Cg), Klumpfuss (Klu) and Sp1 for pairing-sensitive silencing (Spps) (14%), or GAGA factor (GAF) and Pipsqueak (Psq) (7%), which are well-established recruiters for PcG proteins (Kassis et al., 2017) (Fig. 3A). Similarly, binding sites for Adult enhancer factor 1 (Aef1), which were previously found to be enriched at Polycomb Response Elements (PRE) (Orsi et al., 2014), were associated with 22% of TET peaks. These observations enticed us to further examine the relationships between TET and PcG.

PcG proteins are organized into two main complexes, PRC1 and PRC2, which act together to maintain repressive chromatin states, with PRC2 depositing the H3K27me3 repressive mark and PRC1 the H2AK118ub mark (Kassis et al., 2017; Parreno et al., 2022). However, PcG complexes are also found in active chromatin regions and several lines of evidence indicate that PRC1 can act independently of PRC2 to activate gene expression, notably in *Drosophila* (Brown et al., 2018; Giner-Laguada and Vidal, 2020; Loubiere et al., 2016; Loubiere et al., 2020; Pherson et al., 2017; Schaaf et al., 2013). First, we compared TET binding to previously published ChIP-seq datasets for members of the PRC1 (Polyhomeotic – Ph) or PRC2 (Enhancer of Zeste - E(z)) complexes as well as PcG recruiters in the larval CNS. In line with the above results, we observed that TET colocalizes with these factors on well-characterized Polycomb Response Elements (PRE), such as on the *engrailed* locus (Fig. 3B). When we plotted the ChIP-seq signals for each of these factors across a ± 3 kb region surrounding TET peaks, we observed that Ph, Posterior sex combs (Psc) (a component of

Figure 3. TET colocalizes with PRC1 and PRC2. (D) Venn diagrams showing the overlaps of TET peaks with the indicated Polycomb factors/recruiters. (E, F) Immunostaining on salivary gland polytene chromosomes from *sgs3-GAL4; UAS-HA-TET* third instar larvae showing the expression of Ph (E) or E(z) (F) and a HA-tagged version of TET (E', F'). E'' and F'': merged panels. DNA was stained with DAPI (blue). Scale bar 10 μ m. (G) Quantifications of the colocalization between HA-TET positive bands and Ph or E(z) immunostaining on 10 polytene chromosome regions. ***: $p < 0.001$.

PRC1), E(z), Pho, Spps, GAF and Cg colocalized with TET and that the stronger TET peaks are associated with stronger binding for these factors (Fig. 3C), whereas we found little or no association with the architectural proteins CP190 and CTCF, which mark boundary/insulator elements (Chetverina et al., 2022; Sexton et al., 2012), in particular for the top 20% TET peaks. Furthermore, considering a direct overlap between MACS2-defined peaks for TET and these factors, we found that 53% of TET peaks colocalized with Psc, 49% with Ph, 29% with Cg, 28% with Pho, 26% with GAF and 12% with E(z) peaks (Fig. 3D). Conversely, 38% of GAF, 36% of Pho, Cg, or Ph, 35% of Psc and 11% of E(z) and peaks colocalized with TET. Hence, these results suggest that there is a stronger overlap between TET and PRC1 (Ph or Psc) than with PRC2 (E(z)).

When we examined the colocalization of TET with PRC1 (Ph or Psc), PRC2 (E(z)) and other chromatin features defined by K-mean clustering, we found distinct patterns of bindings (Supplementary Figure 5A). Notably, around 9% of TET pics colocalized with PRC1 & PRC2 at broad H3K27me3 and H2AK118Ub-enriched regions (cluster 2), which correspond to typical large PcG-repressed domains (Kassis et al., 2017; Parreno et al., 2022), suggesting that TET binds to repressed PREs. Besides, around 18% of TET peaks coincided with PRC1 on regions with low levels of H3K27me3 but enriched in H2AK118Ub (cluster 3) (Supplementary Figure 5A). This cluster was also enriched in active histone modification marks such as H3K27Ac or H3K4me3 and H3K4me1 (Loubiere et al., 2016; Pherson et al., 2017) and could reflect developmental enhancers, which were previously shown to bind PRC1 and PcG recruiters in larval eye disc and S2 cells (Gutierrez-Perez et al., 2019; Loubiere et al., 2020). Along that line, using a combination of chromatin features to distinguish housekeeping enhancers (H3K4me3 high, H3K4me1 low and enriched CP190) *versus* developmental enhancers (H3K4me1 high, H3K4me3 low and depleted for CP190) (Cubenas-Potts et al., 2017), we found that, like Ph and unlike E(z), TET is enriched at developmental enhancers (Supplementary Figure 5B).

As the larval CNS is composed of many cell types, it is possible that the above analyses do not reflect the concomitant binding of TET and PcG proteins. Therefore, to assess whether TET colocalizes with PcG on chromatin *in vivo*, we analyzed the pattern of binding of TET, Ph and E(z) on polytene chromosomes by immunostaining. As TET is not expressed in the larval salivary gland (Supplementary Figure 6), we ectopically expressed an HA-tagged version of TET in these cells. In line with our ChIP-seq results, we observed discrete TET signals on all chromosome arms, confirming that drosophila TET binds chromatin (Supplementary Figure 6).

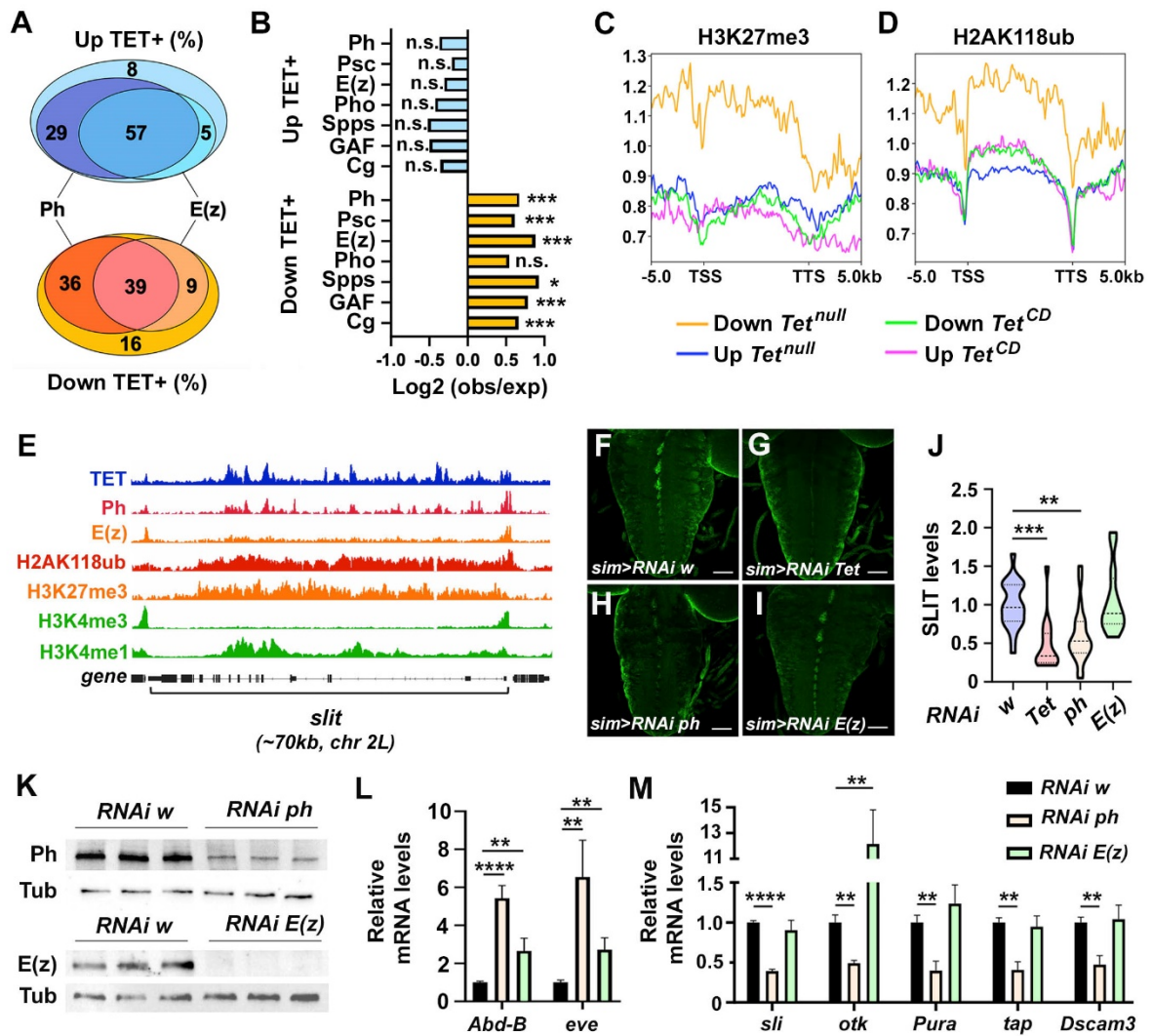


Figure 4. PRC1 but not PRC2 is required for the activation of TET target genes. (A) Venn diagrams showing the proportion of TET+ genes up- or down-regulated in *Tet^{null}* larval CNS and bound by Ph and/or E(z). (B) Enrichment for peaks of the indicated factors among up- or down-regulated genes bound by TET as compared to random sets of genes. Exact Fisher's test. * p<0.01; *** p<0.0001. (C, D) Profiles of H3K27me3 (C) and H2AK118ub (D) CUT&RUN signals in wild type larval CNS for TET target genes activated or repressed in *Tet^{null}* or *Tet^{CD}* mutants. (E) IGV tracks showing the binding of TET, Ph and E(z) and the histone modification profiles as indicated, along the *slit* gene. (F-I) Immunostaining showing Slit expression in the ventral nerve cord of third instar larvae expressing an RNAi against *white* (*w*, F), *Tet* (G), *Ph* (H) or *E(z)* (I) in the ventral midline glial cells (*sim-GAL4* driver). Scale bar 50 μ m. (J) Corresponding quantifications of Slit levels in the ventral midline. One-way ANOVA test. **: p<0.01; ***: p<0.001. (K) Western blots showing the expression of Ph, Tubulin (Tub) or E(z) in the CNS of *tub-GAL4*, *tub-GAL80^{ts}* third instar larvae expressing an RNAi against *w*, *ph* or *E(z)* since the early second larval stage.

Furthermore, we found that some TET-positive bands colocalized with Ph as well as with E(z) (Fig. 3E, F). Interestingly though, it seemed that TET was more frequently associated with Ph than E(z). Indeed, reminiscent of our ChIP-seq results, quantifications on polytene chromosome immunostainings showed that 46% of Ph bands colocalized with TET against 18% for E(z) (Fig. 3G).

In sum, these data show that TET is present at the sites bound by PcG proteins in particular in active regions and suggest that TET preferentially colocalizes with PRC1.

PRC1 but not PRC2 is required for the catalytic-independent activation of gene expression by TET

To assess the potential functional relationship between TET and PcG, we then focused on TET target genes. Looking for the presence of binding sites for either Ph or E(z) within 2kb of their TSS or in their gene body, we found that 86% and 62% of the genes activated by TET as well as 75% and 48% of the genes repressed by TET were bound by Ph or E(z), respectively (Fig. 4A). As compared to random gene sets, PRC1, PRC2 and PcG recruiters were significantly enriched on TET targets genes which were down-regulated in the absence of TET, but not on those which were up-regulated (Fig. 4B). Consistent with these results, CUT&RUN experiments for H3K27me3 and H2AK118ub in wild type larval CNS showed that the histone marks deposited by PRC2 and PRC1 were present at higher levels among genes down-regulated in the absence of TET as compared to up-regulated ones (Fig. 4C, D). H3K27me3 enrichment was observed both upstream of the promoter and within the transcribed regions (with a sharp drop around the TSS and after the TTS), whereas H2AK118ub enrichment was limited to the transcribed region of the gene. These two marks were also higher in *Tet^{null}* down-regulated genes as compared to *Tet^{CD}* deregulated genes. We thus surmised that PcG proteins could antagonize or favor the catalytic-independent activation of gene expression by TET. Still, a closer examination of the binding profile on the genes activated by TET revealed a colocalization between TET and Ph or TET and E(z) peaks in 76% and 25% of the cases, respectively (Supplementary Figure 7), suggesting a tighter association between TET and PRC1 than with PRC2, and possibly distinct functions for these two complexes in the regulation of TET target genes activation.

To test these hypotheses, we first asked whether PRC1 and/or PRC2 regulated *slit* expression. Indeed, we found that *slit* RNA and protein levels are down-regulated in *Tet^{null}* but

Figure 4. PRC1 but not PRC2 is required for the activation of TET target genes. (L-M) RT-qPCR showing the relative expression of *Abd-B* and *eve*, two targets of PcG-mediated repression (L), and of TET target genes *sli*, *otk*, *Pura*, *tap*, *Dscam3* (M) in the indicated RNAi genotypes. One-way ANOVA test. **: p<0.01; ***: p<0.001.

not in *Tet^{CD}* context (Fig. 1A-D and Supplementary Tables 2 & 3) and we observed TET, Ph and E(z) binding on this gene (Fig. 4E). Moreover, *slit* locus was decorated with PcG-associated marks (H3K27me3 and H2AK118ub) as well as with activating marks (H3K4me1 and H3K4me3). In line with a direct/cell-autonomous regulation of *slit* expression by TET in the ventral midline glial cells, RNAi-mediated knock-down of TET in these cells using the *sim-GAL4* driver led to a decrease in Slit levels (Fig. 4F, G, J). Furthermore, the re-expression of TET in these cells in a *Tet^{null}* background was sufficient to restore Slit expression (Supplementary Figure 8). Strikingly, the knock-down of *ph* in the ventral midline glial cells also caused a reduction in Slit expression whereas *E(z)* knock-down had no effect (Fig. 4H-J), suggesting that PRC1 acts independently of PRC2 and promotes TET-induced gene activation.

To extend our analysis of Ph and E(z) impact on other TET targets in the larval CNS, we then used the ubiquitous *tub-GAL4* driver combined with *tub-GAL80^{ts}* to bypass the early lethality associated with *ph* or *E(z)* loss and inhibit their expression by RNAi only during the larval stages. Under these conditions, we achieved a strong reduction in Ph or E(z) expression in the larval CNS as shown by western blot (Fig. 4K and Supplementary Figure 9). In addition, RT-qPCR analyses showed that *Abdominal-B (Abd-B)* and *even skipped (eve)*, two known targets of PcG-mediated repression, were strongly up-regulated by the knock-down of either *ph* or E(z) (Fig. 4L), indicating that their function was efficiently impaired. Yet, in line with the above results, we still observed a decrease in Slit expression in the ventral midline only upon *ph* knock-down (Supplementary Figure 9). Furthermore, RT-qPCR experiments showed that the expression of genes activated by TET (*slit*, *otk*, *Pura*, *tap* and *Dscam3*) was reduced upon *ph* knock-down but not upon *E(z)* knock-down (Fig. 4M). Actually, *otk* expression was increased in the absence of E(z), suggesting that PRC2 could repress its expression. Therefore, PRC1, but not PRC2, seems required for the activation of TET target genes in the larval CNS.

TET and Ph interact together and cross-control their recruitment to chromatin

Considering the above results, we next asked whether TET interacts with Ph and/or E(z) *in vivo*. Accordingly, we performed co-immunoprecipitation experiments using third instar larval CNS protein extracts. As shown in Fig. 5A-C, an antibody directed against Ph co-precipitated both TET and the PcG recruiter Pho. In contrast, an antibody directed against E(z), still co-precipitated Pho but not TET. Of note, Ph but not E(z) also interacted with TET CD, indicating that the interaction is independent of TET catalytic activity. Furthermore, neither

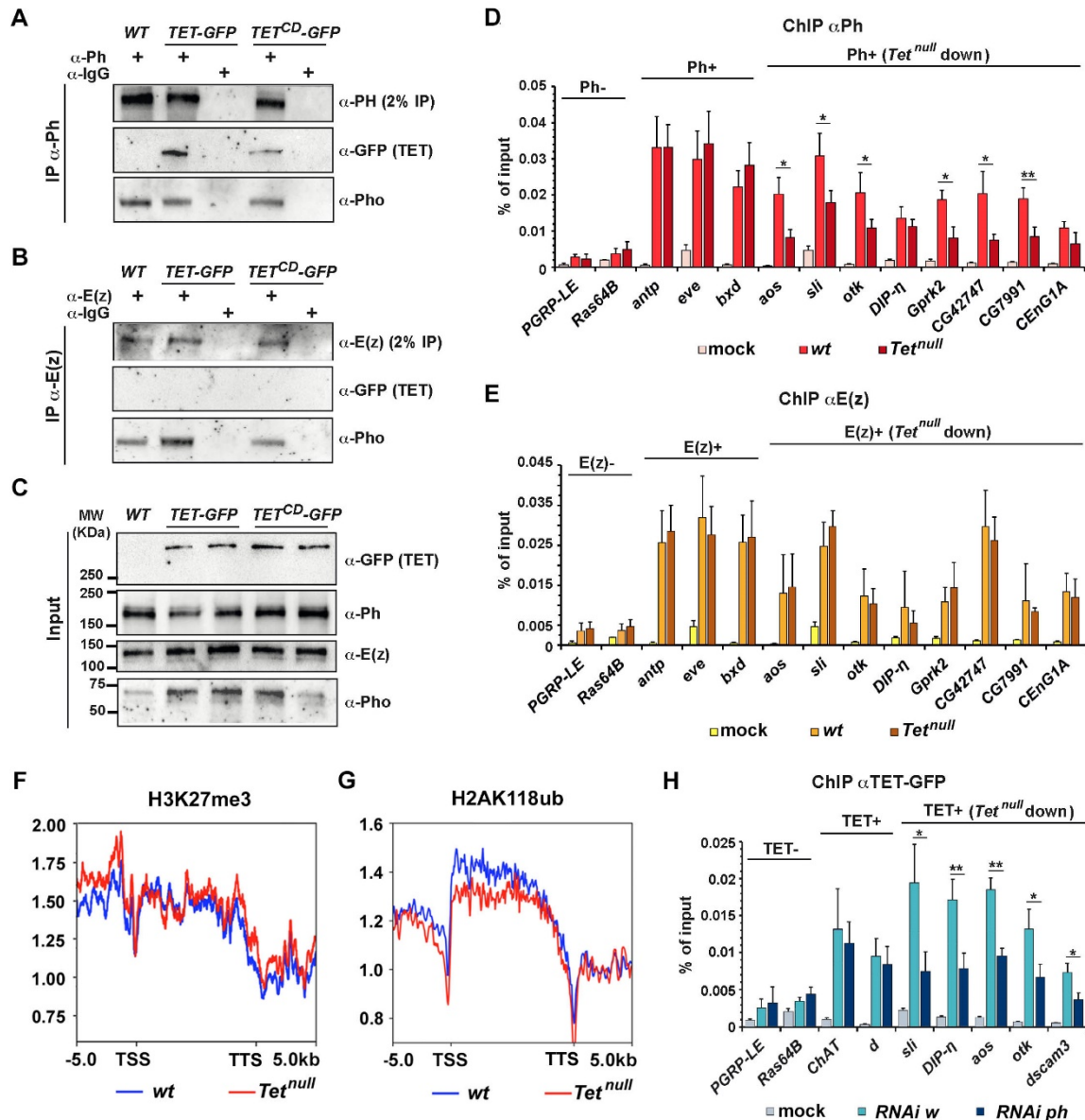


Figure 5. TET and PRC1 interact and promote each other binding to TET target genes. (A, B) Co-immunoprecipitation experiments testing the interaction between Ph (A) or E(z) (B) and TET, TET^{CD} or Pho in larval CNS cell extracts from the indicated genotypes. (C) Western blots showing the inputs used in (A, B). (D, E) ChIP-qPCR for Ph (D) or E(z) (E) showing their recruitment on canonical PREs (*antp*, *eye*, *bxtd*) or on genes activated by TET independently of its enzymatic activity (*aos*, *sli*, *DIP-η*, *otk*, *Gprk2*, *CG42747*, *C7991*, *CenG1A*). *PGRP-LE* and *Ras64B* served as controls without Ph or E(z) binding sites. Mock ChIP were performed with IgGs. Student's t-test between *wt* and *Tet^{null}* conditions, *: $p < 0.01$, **: $p < 0.001$. (F, G) CUT&RUN signals of TET-activated target genes between their TSS and TTS (± 5 kb) for H2AK118ub (F) and H3K27me3 (G) in wild type or in *Tet^{null}* larval CNS.

TET, TET CD or Pho were immunoprecipitated with control IgGs. Hence, these results suggest that TET specifically interacts with PRC1 but not with PRC2.

Accordingly, we hypothesized that TET could promote PRC1 recruitment and the deposition of H2AKub118 at the genes it activates while it would not affect PRC2 binding. To test this possibility, we first performed CHIP-qPCR for Ph and E(z) in wild type or *Tet^{null}* larval CNS to assess their binding to chromatin. We observed enriched binding for Ph and E(z) at canonical PRE in *Antp*, *eve* and *Ubx* (*bx*d PRE), as well as on several genes activated by TET independently of its enzymatic activity, such as *slit*, *otk* or the EGFR negative regulator *argos* (*aos*) (Fig. 5D, E). The binding of E(z) or Ph on PRE, as well as the binding of E(z) on TET targets, were not affected by TET loss. In contrast, and consistent with our hypothesis, Ph binding to TET targets was significantly reduced in 6 out of 8 cases in the absence of TET. Second, we performed CUT&RUN experiments to compare the profile of H2AK118ub and H3K27me3 on TET targets in the CNS of wild type and *Tet^{null}* larvae. In line with our hypothesis, H3K27me3 levels remained unchanged on TET target genes (Fig. 5F and Supplementary Figure 10). In contrast, H2AK118ub levels were slightly decreased on the genes down-regulated in the absence of TET (Fig. 5G), while no change was apparent for up-regulated genes (Supplementary Figure 10). TET thus contributes to Ph recruitment and H2AK118ub deposition on the genes it activates.

Finally, we assessed the impact of Ph loss on TET recruitment (Fig. 5H). We found that TET binding to *Choline acetyltransferase* (*ChAT*) or *dachs* (*d*), which do not contain Ph binding sites and are not regulated by TET, was not affected upon *ph* knock-down. However, on genes activated by TET and harboring a Ph binding site, such as *slit*, *otk* or *aos*, we observed a strong reduction of TET binding. These results indicate that TET and Ph could promote/stabilize each other binding to activate TET target genes.

Altogether, these data strongly support our conclusion that TET specifically interacts with PRC1 but not with PRC2 in the larval CNS and are consistent with a model whereby TET cooperates with PRC1 to induce the transactivation of its target genes independently of its enzymatic activity.

Discussion

Figure 5. TET and PRC1 interact and promote each other binding to TET target genes. (H) ChIP-qPCR for TET-GFP in dissected CNS from *tub-GAL4,tub-GAL80^{ts},TET-GFP* third instar larvae expressing an RNAi against *w* or *ph* since the second larval stage. Analysis of TET recruitment to genes containing a TET binding site which are not regulated by TET (*ChAT*, *d*) or activated by TET independently of its enzymatic activity (*sli*, *DIP-n*, *otk*, *aos*, *otk*, *Dscam3*). *PGRP-LE* and *Ras64B* served as controls that do not contain TET binding sites. Mock ChIP were performed with IgGs. Student's t-test was performed between RNAi *w* and RNAi *ph* conditions. * p<0.01; ** p<0.001.

In contrast to vertebrates and many other species, drosophila genome does not code for 5mC DNA methyltransferase and is largely devoid of this epigenetic mark, suggesting that TET may rather act *via* a non-canonical mode of action in this model organism. In this study, we investigated how drosophila TET regulates gene expression in the larval CNS. Our data show that TET acts mainly in a catalytic-independent manner to ensure the proper development of the larval CNS. At the molecular level, TET largely colocalizes with PcG proteins genome-wide and interacts with the PRC1 component Ph but not with the PRC2 component E(z). Furthermore, our results suggest that TET acts specifically with PRC1 to activate gene expression in a catalytic-independent manner.

Previous works using *Tet* null or hypomorphic alleles as well as RNAi-mediated knock-down showed that TET expression is critical for larval CNS development (Delatte et al., 2016; Frey et al., 2022; Ismail et al., 2019). While antibody-based approaches suggested that TET loss was associated with an increase in 6mA levels in DNA (Frey et al., 2022; Ismail et al., 2019) or a decrease in hm5C levels in RNA (Delatte et al., 2016; Ismail et al., 2019), the functional importance of TET enzymatic activity was not assessed. Our data show that abolishing TET catalytic activity does not recapitulate the CNS phenotypes observed in *Tet null* mutant larvae. Indeed, the large majority of the genes deregulated in *Tet^{null}* was not affected in *Tet^{CD}*, indicating that TET mostly act in an enzymatic-independent manner to control larval CNS development. In particular, several genes implicated in axon guidance were only deregulated in *Tet^{null}*, which is consistent with the axonal projection defects observed specifically in this condition. Similarly, the EGFR pathway, which controls the development of ventral midline glial cells (Gallio et al., 2004; Scholz et al., 1997), was also affected only in *Tet^{null}*. Interestingly too, recent single-cell transcriptomic experiments indicate that *Tet* is enriched in larval and adult astrocytes (Allen et al., 2020; Corrales et al., 2022; Dillon et al., 2022), and several astrocyte markers, such as *Gaba transporter (Gat)*, *heartless (htl)* and *stumps* are down-regulated specifically in *Tet^{null}*, suggesting that TET could control the development of this glial cell population in a catalytic-independent manner. Indeed, the fibroblast growth factor receptor Htl and its adaptor Stumps are required for astrocyte development and the down-regulation of *Gat* or astrocyte ablation leads to crawling and muscular contraction defects (Stork et al., 2014) as observed in *Tet* mutant larvae (Wang et al., 2018). Moreover, astrocytes are required for axon pruning in the brain mushroom bodies during pupariation (Hakim et al., 2014; Tasdemir-Yilmaz and Freeman, 2014) and TET loss is associated with mushroom body

abnormalities in the adult (Yao et al., 2018) (Boulet et al., 2023). Hence, essential processes underlying CNS formation are controlled by TET independently of its enzymatic activity.

Still, a number of genes were deregulated in the CNS of *Tet^{CD}* larvae. We cannot rule out that the HRD to YRA mutation in the TET catalytic domain might cause unexpected alterations, but it does not seem to modify TET recruitment to DNA, consistent with similar analyses on TET1 in mouse ESCs (Chrysanthou et al., 2022). Thus, TET probably exerts some of its functions *via* a catalytic-dependent mechanism. Although one might have expected that most genes deregulated in *Tet^{CD}* were also affected in *Tet^{null}*, there was a limited overlap between the two conditions. This likely reflects that CNS cells in *Tet^{CD}* larvae have followed a different developmental trajectory as compared to the *null* condition. Gene set enrichment analyses showed that this was accompanied by the up-regulation of genes whose function is not directly associated with CNS development or function (tracheal system and cuticle development, chitin metabolism...), except for those implicated in sweet taste perception, which were also up-regulated in *Tet^{null}*. Furthermore, in contrast with *Tet^{null}*, genes down-regulated in *Tet^{CD}* did not exhibit any significant GO enrichment. Hence, the functional importance of TET catalytic activity in the CNS appears more limited.

Based on the current literature, TET catalytic function might be mediated through the oxidation of 6mA DNA, m5C RNA or 5mC DNA. We showed recently that the extremely low levels of 6mA levels present in the larval CNS (~400 methylated adenines per haplogenome) do not increase in the absence of TET and that TET is unable to demethylate 6mA *in vitro* (Boulet et al., 2023). Actually, the capacity of a distant fungal TET homolog to target 6mA requires specific amino acids which are not conserved among metazoan TETs (Mu et al., 2022). It is thus doubtful that TET catalytic function in the larval CNS is mediated by 6mA demethylation. However, it may involve m5C on RNA. Indeed, several publications showed that drosophila and mammalian TETs can oxidize m5C into hm5C and thereby control gene expression at the post-transcriptional level by regulating transcript stability, mRNA translation or tRNA maturation (Basanta-Sanchez et al., 2017; Delatte et al., 2016; Fu et al., 2014; Guallar et al., 2018; He et al., 2021; Lan et al., 2020; Li et al., 2023; Shen et al., 2021; Shen et al., 2018). Of interest, a recent preprint suggested that TET controls *slit* expression in the larval CNS by oxidizing 5mC in its mRNA (Singh et al., 2023). In contrast, our data rather show that TET binds *slit* regulatory regions and directly activates its transcription independently of its enzymatic activity. In particular, we observed no difference in *slit* RNA or protein levels in *Tet^{CD}*, while

both were reduced in *Tet^{null}*. Besides, it remains possible that TET targets 5mC DNA in drosophila, as very low levels of 5mC (0.001 to 0.03%) have been observed in its genome (Boulet et al., 2023; Capuano et al., 2014; Deshmukh et al., 2018; Gowher et al., 2000; Rasmussen et al., 2016; Zhang et al., 2015a). Whereas global levels of 5mC are not increased in the absence of TET (Boulet et al., 2023; Zhang et al., 2015a) and 5hmC levels are extremely low (less than 100 cytosines per genome) (Rasmussen et al., 2016; Zhang et al., 2015a), local differences in 5mC/5hmC repartition might affect gene expression, directly or indirectly. The absence of 5mC DNA methyltransferase and the lack of a defined methylation pattern in drosophila (Raddatz et al., 2013) suggest that cytosine methylation is not an enzyme-regulated process and the impact, if any, of 5mC on drosophila genome biology remains to be established. Finally, TET might target other yet unknown substrates at the DNA, RNA or potentially protein levels. Further experiments beyond the scope of this work will be necessary to decipher TET catalytic mode of action in drosophila.

Focusing on TET enzymatic-independent mode of action, our study highlights an unexpected link between TET and Ph/PRC1. The integration of our RNA-seq and ChIP-seq results indicates that TET binding mostly promotes gene expression. This conclusion agrees with a study in BG3C2 cells and adult brains showing that TET is important for neurodevelopmental gene activation and H3K4me3 accumulation (Yao et al., 2018). At the molecular level, Yao *et al.* proposed that TET interacts with Will die slowly (Wds, WDR5 in mammals), a component of the COMPASS H3K4 methylation complex, to activate transcription and demethylate 6mA in gene bodies to prevent Polycomb recruitment and gene repression (Yao et al., 2018). While Wds might also contribute to TET-induced gene activation in the larval CNS, we found that TET can activate gene expression in an enzymatic-independent manner and that the PcG protein Ph is required in this process. Furthermore, our data show that TET promotes Ph recruitment and the deposition of H2AK118ub at the genes it activates. Conversely, Ph contributes to TET recruitment to DNA, suggesting that these two factors cooperate to regulate gene activation in the larval CNS. Previous works in mammals showed that TET1 interacts with PRC2 to repress transcription (Chrysanthou et al., 2022; Neri et al., 2013; van der Veer et al., 2023; Wu et al., 2011). Larval CNS ChIP-seq data analyses and polytene chromosome immunostainings indicate that TET less frequently colocalizes with the PRC2 component E(z) than with Ph/PRC1. Moreover, contrary to Ph, E(z) did not co-precipitate TET and E(z) knock-down did not affect the expression of TET targets or its recruitment to

chromatin. Conversely, TET loss did not seem to modify E(z) binding nor to affect H3K27me3 deposition. It thus appears that TET does not functionally interact with PRC2 in the larval CNS. The presence of high levels of both H3K27me3 and H2AK118ub at TET-activated targets could reflect CNS cell type heterogeneity, whereby TET and Ph/PRC1 promote gene expression in some cells, whereas E(z)/PRC2 might bind and repress the same genes in other cells. As *E(z)* knock-down was not sufficient to induce an over-expression of the TET targets we tested except for *otk*, other transcriptional regulators are probably required to activate these genes. In sum, we propose that TET interacts specifically with Ph/PRC1 to activate gene expression. Still, a better understanding of TET-mediated transactivation would benefit from the identification of other TET partners and it is anticipated that progress in interactome technologies will be instrumental to unveil the non-canonical mode(s) of gene expression regulation by TET.

Since around 50% of TET peaks colocalized with PRC1 and *Ph* knock-down reduced TET binding, TET is most probably recruited there together with PRC1 by the combinatorial action of PcG recruiters such as GAF or Cg, which are strong PRC1 interactors (Chetverina et al., 2022). However, other determinants could be involved. For instance, interactions with non-coding RNA (ncRNA) might be important for TET/PRC1 recruitment. Along that line, in mammals both TET proteins and PRC1 can interact with ncRNA and are recruited to R-loops (Arab et al., 2019; Cerase and Tartaglia, 2020; Lan et al., 2020; Shukla et al., 2022; Skourti-Stathaki et al., 2019; Zhang et al., 2021). Furthermore, other transcription factors or chromatin features likely contribute to TET recruitment. Notably, we observed consensus binding sites for Tango in ~6% of TET peaks, including in *slit*. As Tango directly activates the expression of *slit* in the ventral midline glia (Sonnenfeld et al., 1997), it could help target TET/PRC1 to this gene. Along that line, Tango is the homolog of hypoxia-inducible factor 1 β (HIF1 β) which dimerizes with HIF1 α , and it was shown that TET1 interacts with and serves as a coactivator for HIF1 α independently of its enzymatic activity in cell culture (Tsai et al., 2014; Yang et al., 2023).

Of note, our data bring further evidence that PRC1 can function independently of PRC2 and contribute to gene activation (Giner-Laguarda and Vidal, 2020). Indeed, besides the typical implication of both complexes in gene repression at PRE and H3K27me3 domains (Blackledge and Klose, 2021; Parreno et al., 2022), PRC1 was shown to bind active genes and promote their transcription independently of PRC2 (Cohen et al., 2019; Loubiere et al., 2016;

Loubiere et al., 2020; Morey et al., 2015; Pherson et al., 2017; Schaaf et al., 2013). Yet, how PRC1 mediates gene activation is still unclear. Notably, it was shown that PRC1 can assist transcription by modulating RNA polymerase II phosphorylation or the pausing-elongation factor Spt5 occupancy (Pherson et al., 2017), and it can contribute to specific chromatin loops favoring promoter/enhancer interactions (Loubiere et al., 2020). It is tempting to speculate that similar mechanisms could underlie the Ph-dependent activation of TET target genes. However, further investigations along those lines are hindered by larval CNS cellular heterogeneity and the accumulation of defects over time. It is anticipated that the development of lineage-restricted chromatin profiling approaches such as NanoDam (Tang et al., 2022) as well as acute depletion techniques based on Auxin Induced Degron (Bence et al., 2017) will be instrumental to gain a finer resolution of TET and PRC1 impact and mode of action *in vivo*.

In conclusion, our work brings strong evidence that TET acts in an enzymatic-independent process to control drosophila CNS development and reveals an unexpected link between TET and PRC1 for gene activation *in vivo*. Given the conservation of these factors across evolution and their multiple roles during normal development and in diseases, it will be interesting to decipher more precisely the molecular mechanisms underlying their mode(s) of cooperation.

Acknowledgements

We thank the Clermont-Ferrand CLIC Imaging platform for assistance with confocal microscopy, S. Viala and Dr. Y. Bidet (Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand) for technical assistance with library preparations. The Drosophila Bloomington Stock Center and Dr. R. Steward (Piscataway) for fly stocks, as well as the Developmental Study Hybridoma Bank, Dr. J. Kassis (Bethesda) and Dr. J. Müller (Martinsried) for antibodies. We are grateful to Dr. R. Margueron and members of the iGrED for helpful discussions. This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR 13-BSV3-08 and 17-CE12-0030-03), i-Site CAP20-25 to LW, from the Association Française contre les Myopathies (AFM) to LV. GG was supported by a PhD fellowship from the Université Clermont-Auvergne and the Ligue Nationale Contre le Cancer. CT was supported by a PhD fellowship from Université Clermont-Auvergne Graduate Track Nutrition Health & Mobility.

Bibliography

Ahmad, K., and Spens, A.E. (2019). Separate Polycomb Response Elements control chromatin state and activation of the vestigial gene. *PLoS Genet* *15*, e1007877.

Allen, A.M., Neville, M.C., Birtles, S., Croset, V., Treiber, C.D., Waddell, S., and Goodwin, S.F. (2020). A single-cell transcriptomic atlas of the adult *Drosophila* ventral nerve cord. *Elife* *9*.

Arab, K., Karaulanov, E., Musheev, M., Trnka, P., Schafer, A., Grummt, I., and Niehrs, C. (2019). GADD45A binds R-loops and recruits TET1 to CpG island promoters. *Nat Genet* *51*, 217-223.

Armstrong, M.J., Jin, Y., Allen, E.G., and Jin, P. (2019). Diverse and dynamic DNA modifications in brain and diseases. *Hum Mol Genet* *28*, R241-R253.

Bachman, M., Uribe-Lewis, S., Yang, X., Williams, M., Murrell, A., and Balasubramanian, S. (2014). 5-Hydroxymethylcytosine is a predominantly stable DNA modification. *Nat Chem* *6*, 1049-1055.

Basanta-Sanchez, M., Wang, R., Liu, Z., Ye, X., Li, M., Shi, X., Agris, P.F., Zhou, Y., Huang, Y., and Sheng, J. (2017). TET1-Mediated Oxidation of 5-Formylcytosine (5fC) to 5-Carboxycytosine (5caC) in RNA. *Chembiochem* *18*, 72-76.

Beck, D.B., Petracovici, A., He, C., Moore, H.W., Louie, R.J., Ansar, M., Douzgou, S., Sithambaram, S., Cottrell, T., Santos-Cortez, R.L.P., *et al.* (2020). Delineation of a Human Mendelian Disorder of the DNA Demethylation Machinery: TET3 Deficiency. *Am J Hum Genet* *106*, 234-245.

Bence, M., Jankovics, F., Lukacsovich, T., and Erdelyi, M. (2017). Combining the auxin-inducible degradation system with CRISPR/Cas9-based genome editing for the conditional depletion of endogenous *Drosophila melanogaster* proteins. *FEBS J* *284*, 1056-1069.

Bewick, A.J., Vogel, K.J., Moore, A.J., and Schmitz, R.J. (2017). Evolution of DNA Methylation across Insects. *Mol Biol Evol* *34*, 654-665.

Bischof, J., Maeda, R.K., Hediger, M., Karch, F., and Basler, K. (2007). An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 3312-3317.

Blackledge, N.P., and Klose, R.J. (2021). The molecular principles of gene regulation by Polycomb repressive complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22, 815-833.

Bossing, T., and Brand, A.H. (2002). Dephrin, a transmembrane ephrin with a unique structure, prevents interneuronal axons from exiting the *Drosophila* embryonic CNS. *Development* 129, 4205-4218.

Boulet, M., Gilbert, G., Renaud, Y., Schmidt-Dengler, M., Plantié, E., Bertrand, R., Nan, X., Jurkowski, T., Helm, M., Vandel, L., *et al.* (2023). Adenine methylation is very scarce in the *Drosophila* genome and not erased by the Ten Eleven Translocation dioxygenase. *bioRxiv*.

Boulias, K., and Greer, E.L. (2022). Means, mechanisms and consequences of adenine methylation in DNA. *Nat Rev Genet*.

Boyle, M., Nighorn, A., and Thomas, J.B. (2006). *Drosophila* Eph receptor guides specific axon branches of mushroom body neurons. *Development* 133, 1845-1854.

Brown, J.L., Sun, M.A., and Kassis, J.A. (2018). Global changes of H3K27me3 domains and Polycomb group protein distribution in the absence of recruiters Spps or Pho. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, E1839-E1848.

Capuano, F., Mulleder, M., Kok, R., Blom, H.J., and Ralser, M. (2014). Cytosine DNA methylation is found in *Drosophila melanogaster* but absent in *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, and other yeast species. *Anal Chem* 86, 3697-3702.

Cerase, A., and Tartaglia, G.G. (2020). Long non-coding RNA-polycomb intimate rendezvous. *Open Biol* 10, 200126.

Chen, Q., Chen, Y., Bian, C., Fujiki, R., and Yu, X. (2013). TET2 promotes histone O-GlcNAcylation during gene transcription. *Nature* 493, 561-564.

Chetverina, D., Vorobyeva, N.E., Mazina, M.Y., Fab, L.V., Lomaev, D., Golovnina, A., Mogila, V., Georgiev, P., Ziganshin, R.H., and Erokhin, M. (2022). Comparative interactome analysis of the PRE DNA-binding factors: purification of the Combgap-, Zeste-, Psq-, and Adf1-associated proteins. *Cell Mol Life Sci* 79, 353.

Chrysanthou, S., Tang, Q., Lee, J., Taylor, S.J., Zhao, Y., Steidl, U., Zheng, D., and Dawlaty, M.M. (2022). The DNA dioxygenase Tet1 regulates H3K27 modification and embryonic stem cell biology independent of its catalytic activity. *Nucleic Acids Res* 50, 3169-3189.

Cochran, J.N., Geier, E.G., Bonham, L.W., Newberry, J.S., Amaral, M.D., Thompson, M.L., Lasseigne, B.N., Karydas, A.M., Roberson, E.D., Cooper, G.M., *et al.* (2020). Non-coding and

Loss-of-Function Coding Variants in TET2 are Associated with Multiple Neurodegenerative Diseases. *Am J Hum Genet* 106, 632-645.

Cohen, I., Zhao, D., Menon, G., Nakayama, M., Koseki, H., Zheng, D., and Ezhkova, E. (2019). PRC1 preserves epidermal tissue integrity independently of PRC2. *Genes Dev* 33, 55-60.

Corrales, M., Cocanougher, B.T., Kohn, A.B., Wittenbach, J.D., Long, X.S., Lemire, A., Cardona, A., Singer, R.H., Moroz, L.L., and Zlatic, M. (2022). A single-cell transcriptomic atlas of complete insect nervous systems across multiple life stages. *Neural Dev* 17, 8.

Cubenas-Potts, C., Rowley, M.J., Lyu, X., Li, G., Lei, E.P., and Corces, V.G. (2017). Different enhancer classes in *Drosophila* bind distinct architectural proteins and mediate unique chromatin interactions and 3D architecture. *Nucleic Acids Res* 45, 1714-1730.

Damal Villivalam, S., You, D., Kim, J., Lim, H.W., Xiao, H., Zushin, P.H., Oguri, Y., Amin, P., and Kang, S. (2020). TET1 is a beige adipocyte-selective epigenetic suppressor of thermogenesis. *Nat Commun* 11, 4313.

Dawlaty, M.M., Breiling, A., Le, T., Raddatz, G., Barrasa, M.I., Cheng, A.W., Gao, Q., Powell, B.E., Li, Z., Xu, M., *et al.* (2013). Combined deficiency of Tet1 and Tet2 causes epigenetic abnormalities but is compatible with postnatal development. *Dev Cell* 24, 310-323.

Delatte, B., Wang, F., Ngoc, L.V., Collignon, E., Bonvin, E., Deplus, R., Calonne, E., Hassabi, B., Putmans, P., Awe, S., *et al.* (2016). RNA biochemistry. Transcriptome-wide distribution and function of RNA hydroxymethylcytosine. *Science* 351, 282-285.

Delhommeau, F., Dupont, S., Della Valle, V., James, C., Trannoy, S., Masse, A., Kosmider, O., Le Couedic, J.P., Robert, F., Alberdi, A., *et al.* (2009). Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med* 360, 2289-2301.

Deplus, R., Delatte, B., Schwinn, M.K., Defrance, M., Mendez, J., Murphy, N., Dawson, M.A., Volkmar, M., Putmans, P., Calonne, E., *et al.* (2013). TET2 and TET3 regulate GlcNAcylation and H3K4 methylation through OGT and SET1/COMPASS. *EMBO J* 32, 645-655.

Deshmukh, S., Ponnaluri, V.C., Dai, N., Pradhan, S., and Deobagkar, D. (2018). Levels of DNA cytosine methylation in the *Drosophila* genome. *PeerJ* 6, e5119.

Dillon, N., Cocanougher, B., Sood, C., Yuan, X., Kohn, A.B., Moroz, L.L., Siegrist, S.E., Zlatic, M., and Doe, C.Q. (2022). Single cell RNA-seq analysis reveals temporally-regulated and quiescence-regulated gene expression in *Drosophila* larval neuroblasts. *Neural Dev* 17, 7.

Duployez, N., Goursaud, L., Fenwarth, L., Bories, C., Marceau-Renaut, A., Boyer, T., Fournier, E., Nibourel, O., Roche-Lestienne, C., Huet, G., *et al.* (2020). Familial myeloid malignancies with germline TET2 mutation. *Leukemia* *34*, 1450-1453.

Ernst, J., and Kellis, M. (2017). Chromatin-state discovery and genome annotation with ChromHMM. *Nat Protoc* *12*, 2478-2492.

Frey, F., Sandakly, J., Ghannam, M., Doueiry, C., Hugosson, F., Berlandi, J., Ismail, J.N., Gayden, T., Hasselblatt, M., Jabado, N., *et al.* (2022). Drosophila Tet Is Required for Maintaining Glial Homeostasis in Developing and Adult Fly Brains. *eNeuro* *9*.

Fu, L., Guerrero, C.R., Zhong, N., Amato, N.J., Liu, Y., Liu, S., Cai, Q., Ji, D., Jin, S.G., Niedernhofer, L.J., *et al.* (2014). Tet-mediated formation of 5-hydroxymethylcytosine in RNA. *J Am Chem Soc* *136*, 11582-11585.

Gallio, M., Englund, C., Kylsten, P., and Samakovlis, C. (2004). Rhomboid 3 orchestrates Slit-independent repulsion of tracheal branches at the CNS midline. *Development* *131*, 3605-3614.

Gambetta, M.C., Oktaba, K., and Muller, J. (2009). Essential role of the glycosyltransferase *sxc/Ogt* in polycomb repression. *Science* *325*, 93-96.

Gao, J., Ma, Y., Fu, H.L., Luo, Q., Wang, Z., Xiao, Y.H., Yang, H., Cui, D.X., and Jin, W.L. (2016). Non-catalytic roles for TET1 protein negatively regulating neuronal differentiation through srGAP3 in neuroblastoma cells. *Protein Cell* *7*, 351-361.

Giner-Laguarda, N., and Vidal, M. (2020). Functions of Polycomb Proteins on Active Targets. *Epigenomes* *4*.

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

Grenningloh, G., Rehm, E.J., and Goodman, C.S. (1991). Genetic analysis of growth cone guidance in *Drosophila*: fasciclin II functions as a neuronal recognition molecule. *Cell* *67*, 45-57.

Grimaud, C., Bantignies, F., Pal-Bhadra, M., Ghana, P., Bhadra, U., and Cavalli, G. (2006). RNAi components are required for nuclear clustering of Polycomb group response elements. *Cell* *124*, 957-971.

Guallar, D., Bi, X., Pardavila, J.A., Huang, X., Saenz, C., Shi, X., Zhou, H., Faiola, F., Ding, J., Haruehanroengra, P., *et al.* (2018). RNA-dependent chromatin targeting of TET2 for endogenous retrovirus control in pluripotent stem cells. *Nat Genet* *50*, 443-451.

Gutierrez-Perez, I., Rowley, M.J., Lyu, X., Valadez-Graham, V., Vallejo, D.M., Ballesta-Illan, E., Lopez-Atalaya, J.P., Kremisky, I., Caparros, E., Corces, V.G., *et al.* (2019). Ecdysone-Induced 3D Chromatin Reorganization Involves Active Enhancers Bound by Pipsqueak and Polycomb. *Cell Rep* 28, 2715-2727 e2715.

Hakim, Y., Yaniv, S.P., and Schuldiner, O. (2014). Astrocytes play a key role in *Drosophila* mushroom body axon pruning. *PLoS One* 9, e86178.

He, C., Bozler, J., Janssen, K.A., Wilusz, J.E., Garcia, B.A., Schorn, A.J., and Bonasio, R. (2021). TET2 chemically modifies tRNAs and regulates tRNA fragment levels. *Nat Struct Mol Biol* 28, 62-70.

He, C., Sidoli, S., Warneford-Thomson, R., Tatomer, D.C., Wilusz, J.E., Garcia, B.A., and Bonasio, R. (2016). High-Resolution Mapping of RNA-Binding Regions in the Nuclear Proteome of Embryonic Stem Cells. *Mol Cell* 64, 416-430.

He, S., Zhang, G., Wang, J., Gao, Y., Sun, R., Cao, Z., Chen, Z., Zheng, X., Yuan, J., Luo, Y., *et al.* (2019). 6mA-DNA-binding factor Jumu controls maternal-to-zygotic transition upstream of *Zelda*. *Nat Commun* 10, 2219.

He, Y.F., Li, B.Z., Li, Z., Liu, P., Wang, Y., Tang, Q., Ding, J., Jia, Y., Chen, Z., Li, L., *et al.* (2011). Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science* 333, 1303-1307.

Hill, K.K., Bedian, V., Juang, J.L., and Hoffmann, F.M. (1995). Genetic interactions between the *Drosophila* Abelson (Abl) tyrosine kinase and failed axon connections (fax), a novel protein in axon bundles. *Genetics* 141, 595-606.

Hu, Y., Comjean, A., Attrill, H., Antonazzo, G., Thurmond, J., Chen, W., Li, F., Chao, T., Mohr, S.E., Brown, N.H., *et al.* (2023). PANGEA: a new gene set enrichment tool for *Drosophila* and common research organisms. *Nucleic Acids Res* 51, W419-W426.

Ismail, J.N., Badini, S., Frey, F., Abou-Kheir, W., and Shirinian, M. (2019). *Drosophila* Tet Is Expressed in Midline Glia and Is Required for Proper Axonal Development. *Front Cell Neurosci* 13, 252.

Ito, K., Lee, J., Chrysanthou, S., Zhao, Y., Josephs, K., Sato, H., Teruya-Feldstein, J., Zheng, D., Dawlaty, M.M., and Ito, K. (2019). Non-catalytic Roles of Tet2 Are Essential to Regulate Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Homeostasis. *Cell Rep* 28, 2480-2490 e2484.

Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S.C., Collins, L.B., Swenberg, J.A., He, C., and Zhang, Y. (2011). Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* 333, 1300-1303.

Iyer, L.M., Abhiman, S., and Aravind, L. (2011). Natural history of eukaryotic DNA methylation systems. *Prog Mol Biol Transl Sci* 101, 25-104.

Iyer, L.M., Tahiliani, M., Rao, A., and Aravind, L. (2009). Prediction of novel families of enzymes involved in oxidative and other complex modifications of bases in nucleic acids. *Cell Cycle* 8, 1698-1710.

Iyer, L.M., Zhang, D., and Aravind, L. (2016). Adenine methylation in eukaryotes: Apprehending the complex evolutionary history and functional potential of an epigenetic modification. *Bioessays* 38, 27-40.

Kaas, G.A., Zhong, C., Eason, D.E., Ross, D.L., Vachhani, R.V., Ming, G.L., King, J.R., Song, H., and Sweatt, J.D. (2013). TET1 controls CNS 5-methylcytosine hydroxylation, active DNA demethylation, gene transcription, and memory formation. *Neuron* 79, 1086-1093.

Kassis, J.A., Kennison, J.A., and Tamkun, J.W. (2017). Polycomb and Trithorax Group Genes in *Drosophila*. *Genetics* 206, 1699-1725.

Lan, J., Rajan, N., Bizet, M., Penning, A., Singh, N.K., Guallar, D., Calonne, E., Li Greci, A., Bonvin, E., Deplus, R., *et al.* (2020). Functional role of Tet-mediated RNA hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nat Commun* 11, 4956.

Langemeijer, S.M., Kuiper, R.P., Berends, M., Knops, R., Aslanyan, M.G., Massop, M., Stevens-Linders, E., van Hoogen, P., van Kessel, A.G., Raymakers, R.A., *et al.* (2009). Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet* 41, 838-842.

Lee, J.E., and Kim, M.Y. (2022). Cancer epigenetics: Past, present and future. *Semin Cancer Biol* 32, 4-14.

Li, Y., Xue, M., Deng, X., Dong, L., Nguyen, L.X.T., Ren, L., Han, L., Li, C., Xue, J., Zhao, Z., *et al.* (2023). TET2-mediated mRNA demethylation regulates leukemia stem cell homing and self-renewal. *Cell Stem Cell* 30, 1072-1090 e1010.

Lio, C.J., Yue, X., Lopez-Moyado, I.F., Tahiliani, M., Aravind, L., and Rao, A. (2020). TET methylcytosine oxidases: new insights from a decade of research. *J Biosci* 45.

Lio, C.J., Yuita, H., and Rao, A. (2019). Dysregulation of the TET family of epigenetic regulators in lymphoid and myeloid malignancies. *Blood* 134, 1487-1497.

Loubiere, V., Delest, A., Schuettengruber, B., Martinez, A.M., and Cavalli, G. (2017). Chromatin Immunoprecipitation Experiments from Whole *Drosophila* Embryos or Larval Imaginal Discs. *Bio Protoc* 7, e2327.

Loubiere, V., Delest, A., Thomas, A., Bonev, B., Schuettengruber, B., Sati, S., Martinez, A.M., and Cavalli, G. (2016). Coordinate redeployment of PRC1 proteins suppresses tumor formation during *Drosophila* development. *Nat Genet* 48, 1436-1442.

Loubiere, V., Papadopoulos, G.L., Szabo, Q., Martinez, A.M., and Cavalli, G. (2020). Widespread activation of developmental gene expression characterized by PRC1-dependent chromatin looping. *Sci Adv* 6, eaax4001.

Lu, F., Liu, Y., Jiang, L., Yamaguchi, S., and Zhang, Y. (2014). Role of Tet proteins in enhancer activity and telomere elongation. *Genes Dev* 28, 2103-2119.

MacArthur, I.C., and Dawlaty, M.M. (2021). TET Enzymes and 5-Hydroxymethylcytosine in Neural Progenitor Cell Biology and Neurodevelopment. *Front Cell Dev Biol* 9, 645335.

Montagner, S., Leoni, C., Emming, S., Della Chiara, G., Balestrieri, C., Barozzi, I., Piccolo, V., Togher, S., Ko, M., Rao, A., *et al.* (2016). TET2 Regulates Mast Cell Differentiation and Proliferation through Catalytic and Non-catalytic Activities. *Cell Rep* 15, 1566-1579.

Morey, L., Santanach, A., Blanco, E., Aloia, L., Nora, E.P., Bruneau, B.G., and Di Croce, L. (2015). Polycomb Regulates Mesoderm Cell Fate-Specification in Embryonic Stem Cells through Activation and Repression Mechanisms. *Cell Stem Cell* 17, 300-315.

Morgan, M.A.J., and Shilatifard, A. (2023). Epigenetic moonlighting: Catalytic-independent functions of histone modifiers in regulating transcription. *Sci Adv* 9, eadg6593.

Mu, Y., Zhang, L., Hu, J., Zhou, J., Lin, H.W., He, C., Chen, H.Z., and Zhang, L. (2022). A fungal dioxygenase CcTet serves as a eukaryotic 6mA demethylase on duplex DNA. *Nat Chem Biol* 18, 733-741.

Neri, F., Incarnato, D., Krepelova, A., Rapelli, S., Pagnani, A., Zecchina, R., Parlato, C., and Oliviero, S. (2013). Genome-wide analysis identifies a functional association of Tet1 and Polycomb repressive complex 2 in mouse embryonic stem cells. *Genome Biol* 14, R91.

Orsi, G.A., Kasinathan, S., Hughes, K.T., Saminadin-Peter, S., Henikoff, S., and Ahmad, K. (2014). High-resolution mapping defines the cooperative architecture of Polycomb response elements. *Genome Res* 24, 809-820.

Parreno, V., Martinez, A.M., and Cavalli, G. (2022). Mechanisms of Polycomb group protein function in cancer. *Cell Res* 32, 231-253.

Pherson, M., Misulovin, Z., Gause, M., Mihindikulasuriya, K., Swain, A., and Dorsett, D. (2017). Polycomb repressive complex 1 modifies transcription of active genes. *Sci Adv* 3, e1700944.

Raddatz, G., Guzzardo, P.M., Olova, N., Fantappie, M.R., Rampp, M., Schaefer, M., Reik, W., Hannon, G.J., and Lyko, F. (2013). Dnmt2-dependent methylomes lack defined DNA methylation patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 8627-8631.

Rasmussen, E.M.K., Vagbo, C.B., Munch, D., Krokan, H.E., Klungland, A., Amdam, G.V., and Dahl, J.A. (2016). DNA base modifications in honey bee and fruit fly genomes suggest an active demethylation machinery with species- and tissue-specific turnover rates. *Biochem Biophys Rep* 6, 9-15.

Ray, P., De, S., Mitra, A., Bezstarosti, K., Demmers, J.A., Pfeifer, K., and Kassis, J.A. (2016). Combgap contributes to recruitment of Polycomb group proteins in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 3826-3831.

Sahafnejad, Z., Ramazi, S., and Allahverdi, A. (2023). An Update of Epigenetic Drugs for the Treatment of Cancers and Brain Diseases: A Comprehensive Review. *Genes (Basel)* 14.

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

Schmitz, R.J., Lewis, Z.A., and Goll, M.G. (2019). DNA Methylation: Shared and Divergent Features across Eukaryotes. *Trends Genet* 35, 818-827.

Scholz, H., Sadlowski, E., Klaes, A., and Klambt, C. (1997). Control of midline glia development in the embryonic *Drosophila* CNS. *Mech Dev* 64, 137-151.

Sexton, T., Yaffe, E., Kenigsberg, E., Bantignies, F., Leblanc, B., Hoichman, M., Parrinello, H., Tanay, A., and Cavalli, G. (2012). Three-dimensional folding and functional organization principles of the *Drosophila* genome. *Cell* 148, 458-472.

Seyama, R., Tsuchida, N., Okada, Y., Sakata, S., Hamada, K., Azuma, Y., Hamanaka, K., Fujita, A., Koshimizu, E., Miyatake, S., *et al.* (2022). Two families with TET3-related disorder showing neurodevelopmental delay with craniofacial dysmorphisms. *J Hum Genet* 67, 157-164.

Shen, H., Ontiveros, R.J., Owens, M.C., Liu, M.Y., Ghanty, U., Kohli, R.M., and Liu, K.F. (2021). TET-mediated 5-methylcytosine oxidation in tRNA promotes translation. *J Biol Chem* 296, 100087.

Shen, Q., Zhang, Q., Shi, Y., Shi, Q., Jiang, Y., Gu, Y., Li, Z., Li, X., Zhao, K., Wang, C., *et al.* (2018). Tet2 promotes pathogen infection-induced myelopoiesis through mRNA oxidation. *Nature* 554, 123-127.

Shukla, V., Samaniego-Castruita, D., Dong, Z., Gonzalez-Avalos, E., Yan, Q., Sarma, K., and Rao, A. (2022). TET deficiency perturbs mature B cell homeostasis and promotes oncogenesis associated with accumulation of G-quadruplex and R-loop structures. *Nat Immunol* 23, 99-108.

Singh, B.N., Tran, H., Kramer, J., Kirichenko, E., Changela, N., Wang, F., Feng, Y., Kumar, D., Tu, M., Lan, J., *et al.* (2023). Tet-dependent 5-hydroxymethyl-Cytosine modification of mRNA regulates axon guidance genes in *Drosophila*. *bioRxiv*.

Skourti-Stathaki, K., Torlai Triglia, E., Warburton, M., Voigt, P., Bird, A., and Pombo, A. (2019). R-Loops Enhance Polycomb Repression at a Subset of Developmental Regulator Genes. *Mol Cell* 73, 930-945 e934.

Sonnenfeld, M., Ward, M., Nystrom, G., Mosher, J., Stahl, S., and Crews, S. (1997). The *Drosophila* tango gene encodes a bHLH-PAS protein that is orthologous to mammalian Arnt and controls CNS midline and tracheal development. *Development* 124, 4571-4582.

Spruijt, C.G., Gnerlich, F., Smits, A.H., Pfaffeneder, T., Jansen, P.W., Bauer, C., Munzel, M., Wagner, M., Muller, M., Khan, F., *et al.* (2013). Dynamic readers for 5-(hydroxy)methylcytosine and its oxidized derivatives. *Cell* 152, 1146-1159.

Stevens, A., and Jacobs, J.R. (2002). Integrins regulate responsiveness to slit repellent signals. *J Neurosci* 22, 4448-4455.

Stolz, P., Mantero, A.S., Tvardovskiy, A., Ugur, E., Wange, L.E., Mulholland, C.B., Cheng, Y., Wierer, M., Enard, W., Schneider, R., *et al.* (2022). TET1 regulates gene expression and repression of endogenous retroviruses independent of DNA demethylation. *Nucleic Acids Res* 50, 8491-8511.

Stork, T., Sheehan, A., Tasdemir-Yilmaz, O.E., and Freeman, M.R. (2014). Neuron-glia interactions through the Heartless FGF receptor signaling pathway mediate morphogenesis of *Drosophila* astrocytes. *Neuron* 83, 388-403.

Stremenova Spegarova, J., Lawless, D., Mohamad, S.M.B., Engelhardt, K.R., Doody, G., Shrimpton, J., Rensing-Ehl, A., Ehl, S., Rieux-Laucat, F., Cargo, C., *et al.* (2020). Germline TET2 loss of function causes childhood immunodeficiency and lymphoma. *Blood* 136, 1055-1066.

Tahiliani, M., Koh, K.P., Shen, Y., Pastor, W.A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L.M., Liu, D.R., Aravind, L., *et al.* (2009). Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324, 930-935.

Tang, J.L.Y., Hakes, A.E., Krautz, R., Suzuki, T., Contreras, E.G., Fox, P.M., and Brand, A.H. (2022). NanoDam identifies Homeobrain (ARX) and Scarecrow (NKX2.1) as conserved temporal factors in the *Drosophila* central brain and visual system. *Dev Cell* 57, 1193-1207 e1197.

Tasdemir-Yilmaz, O.E., and Freeman, M.R. (2014). Astrocytes engage unique molecular programs to engulf pruned neuronal debris from distinct subsets of neurons. *Genes Dev* 28, 20-33.

Tsai, Y.P., Chen, H.F., Chen, S.Y., Cheng, W.C., Wang, H.W., Shen, Z.J., Song, C., Teng, S.C., He, C., and Wu, K.J. (2014). TET1 regulates hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition by acting as a co-activator. *Genome Biol* 15, 513.

Valencia, A.M., and Kadoch, C. (2019). Chromatin regulatory mechanisms and therapeutic opportunities in cancer. *Nat Cell Biol* 21, 152-161.

van der Veer, B.K., Chen, L., Custers, C., Athanasouli, P., Schroiff, M., Cornelis, R., Chui, J.S., Finnell, R.H., Lluís, F., and Koh, K.P. (2023). Dual functions of TET1 in germ layer lineage bifurcation distinguished by genomic context and dependence on 5-methylcytosine oxidation. *Nucleic Acids Res* 51, 5469-5498.

Vella, P., Scelfo, A., Jammula, S., Chiacchiera, F., Williams, K., Cuomo, A., Roberto, A., Christensen, J., Bonaldi, T., Helin, K., *et al.* (2013). Tet proteins connect the O-linked N-acetylglucosamine transferase Ogt to chromatin in embryonic stem cells. *Mol Cell* 49, 645-656.

Villasenor, R., and Baubec, T. (2021). Regulatory mechanisms governing chromatin organization and function. *Curr Opin Cell Biol* 70, 10-17.

Wang, F., Minakhina, S., Tran, H., Changela, N., Kramer, J., and Steward, R. (2018). Tet protein function during *Drosophila* development. *PLoS One* 13, e0190367.

Williams, K., Christensen, J., Pedersen, M.T., Johansen, J.V., Cloos, P.A., Rappsilber, J., and Helin, K. (2011). TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity. *Nature* 473, 343-348.

Winberg, M.L., Tamagnone, L., Bai, J., Comoglio, P.M., Montell, D., and Goodman, C.S. (2001). The transmembrane protein Off-track associates with Plexins and functions downstream of Semaphorin signaling during axon guidance. *Neuron* 32, 53-62.

Wu, H., D'Alessio, A.C., Ito, S., Xia, K., Wang, Z., Cui, K., Zhao, K., Sun, Y.E., and Zhang, Y. (2011). Dual functions of Tet1 in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. *Nature* 473, 389-393.

Xu, G.L., and Bochtler, M. (2020). Reversal of nucleobase methylation by dioxygenases. *Nat Chem Biol* 16, 1160-1169.

Xu, Y., Xu, C., Kato, A., Tempel, W., Abreu, J.G., Bian, C., Hu, Y., Hu, D., Zhao, B., Cerovina, T., *et al.* (2012). Tet3 CXXC domain and dioxygenase activity cooperatively regulate key genes for *Xenopus* eye and neural development. *Cell* 151, 1200-1213.

Yang, J., Bashkenova, N., Zang, R., Huang, X., and Wang, J. (2020). The roles of TET family proteins in development and stem cells. *Development* 147.

Yang, Q., Dang, H., Liu, J., Wang, X., Wang, J., Lan, X., Ji, M., Xing, M., and Hou, P. (2023). Hypoxia switches TET1 from being tumor-suppressive to oncogenic. *Oncogene*.

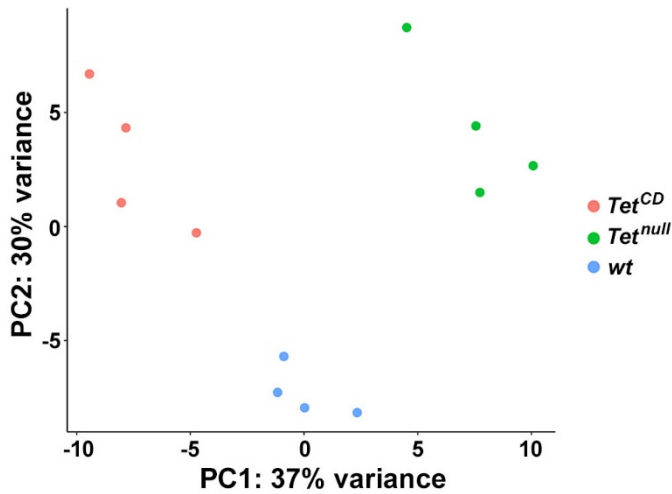
Yao, B., Li, Y., Wang, Z., Chen, L., Poidevin, M., Zhang, C., Lin, L., Wang, F., Bao, H., Jiao, B., *et al.* (2018). Active N(6)-Methyladenine Demethylation by DMAD Regulates Gene Expression by Coordinating with Polycomb Protein in Neurons. *Mol Cell* 71, 848-857 e846.

Zhang, G., Huang, H., Liu, D., Cheng, Y., Liu, X., Zhang, W., Yin, R., Zhang, D., Zhang, P., Liu, J., *et al.* (2015a). N6-methyladenine DNA modification in *Drosophila*. *Cell* 161, 893-906.

Zhang, Q., Zhao, K., Shen, Q., Han, Y., Gu, Y., Li, X., Zhao, D., Liu, Y., Wang, C., Zhang, X., *et al.* (2015b). Tet2 is required to resolve inflammation by recruiting Hdac2 to specifically repress IL-6. *Nature* 525, 389-393.

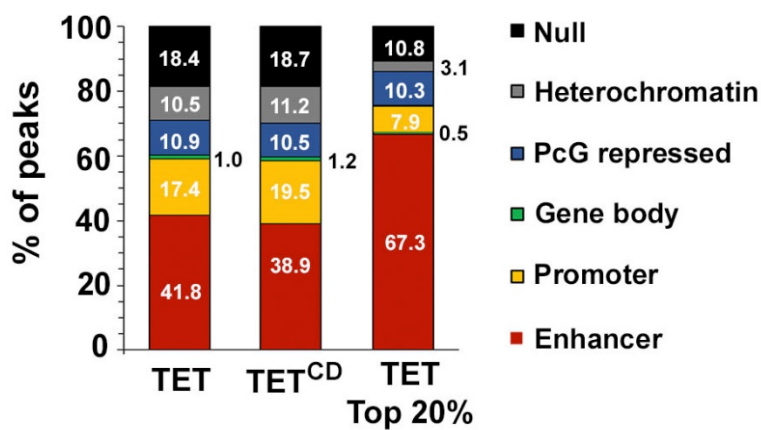
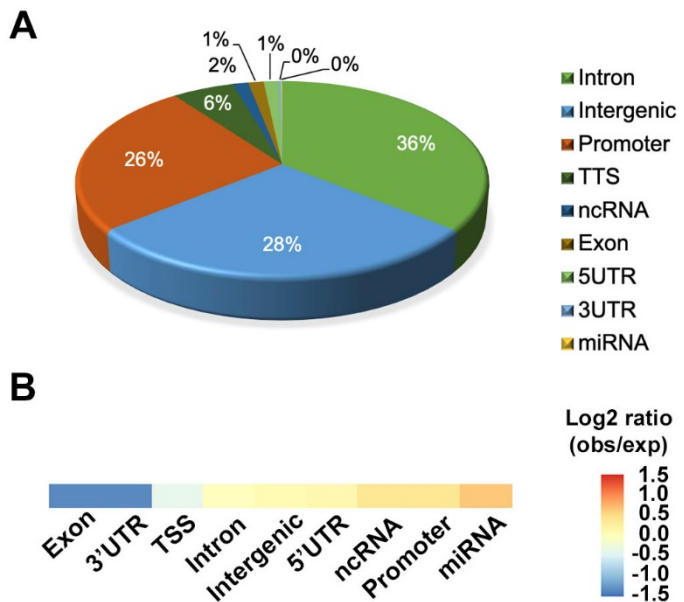
Zhang, Y., Liu, T., Yuan, F., Garcia-Martinez, L., Lee, K.D., Stransky, S., Sidoli, S., Verdun, R.E., Zhang, Y., Wang, Z., *et al.* (2021). The Polycomb protein RING1B enables estrogen-mediated gene expression by promoting enhancer-promoter interaction and R-loop formation. *Nucleic Acids Res* 49, 9768-9782.

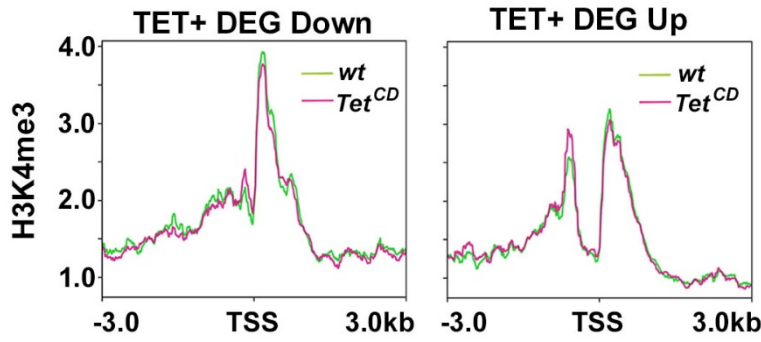
Zink, F., Stacey, S.N., Norddahl, G.L., Frigge, M.L., Magnusson, O.T., Jonsdottir, I., Thorgeirsson, T.E., Sigurdsson, A., Gudjonsson, S.A., Gudmundsson, J., *et al.* (2017). Clonal hematopoiesis, with and without candidate driver mutations, is common in the elderly. *Blood* 130, 742-752.



Supplementary Figure S2.

Analyses of TET^{CD}-GFP ChIP-seq peaks repartition in the drosophila genome. (A) Pie chart of TET^{CD}-GFP peaks distribution according to RefSeq genomic annotations. (B) Heatmap showing TET^{CD}-GFP enrichment according to genomic features.

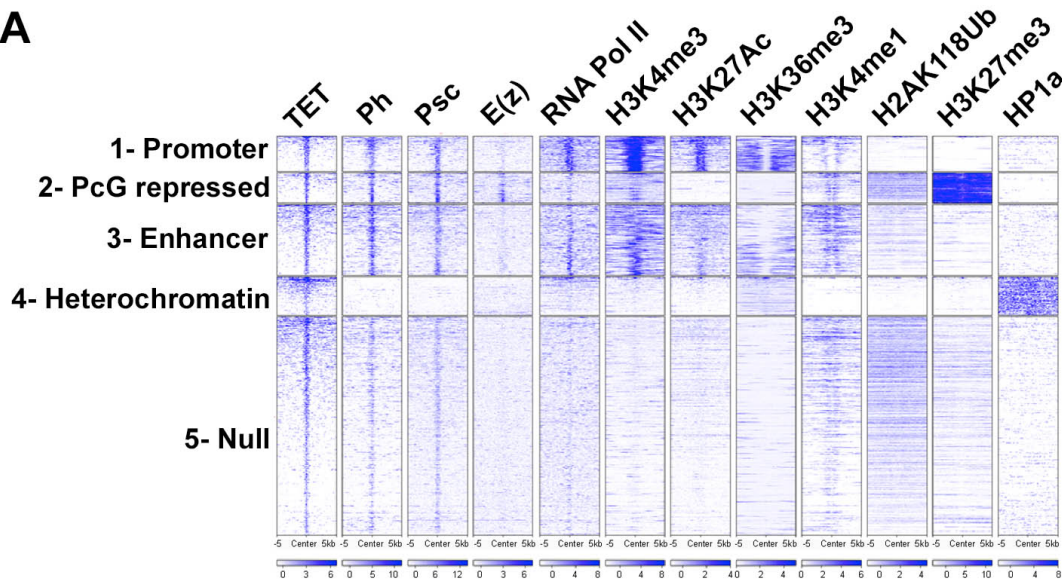




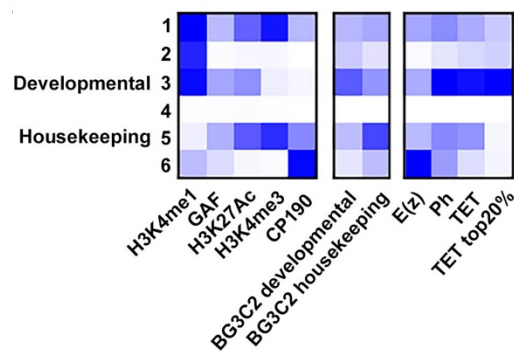
Supplementary Figure S4.

Enrichment of H3K4me3 CUT & RUN signals on differentially expressed (down-regulated: left panel, up-regulated: right panel) TET+ target genes in the CNS of wt (green) or *Tet^{CD}* (pink) larvae. TSS: transcription start site.

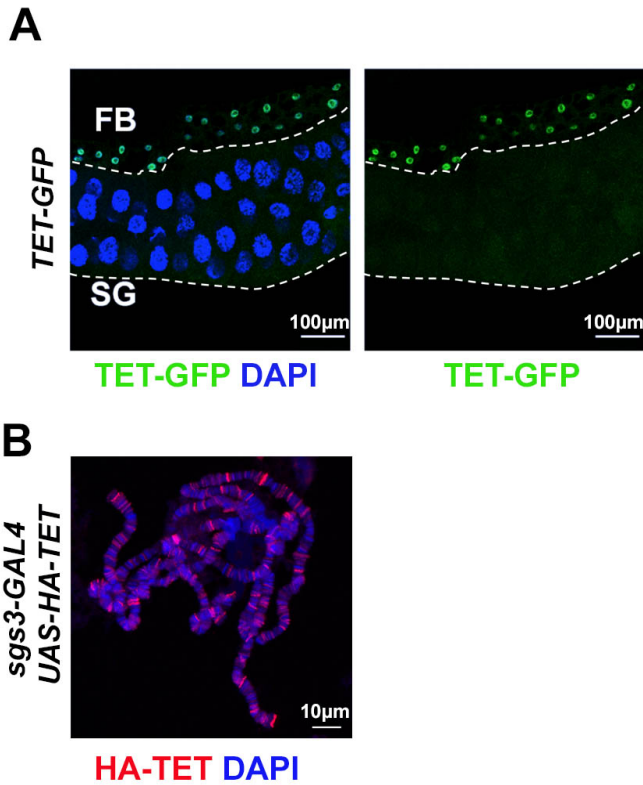
A



B

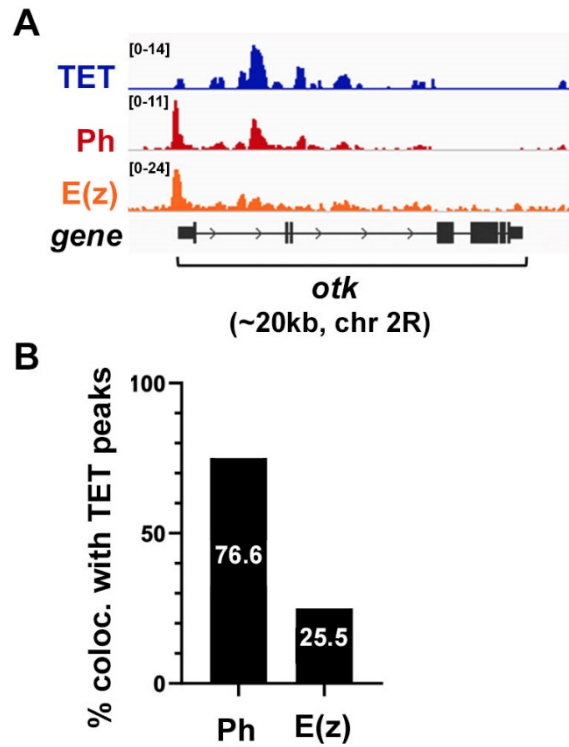


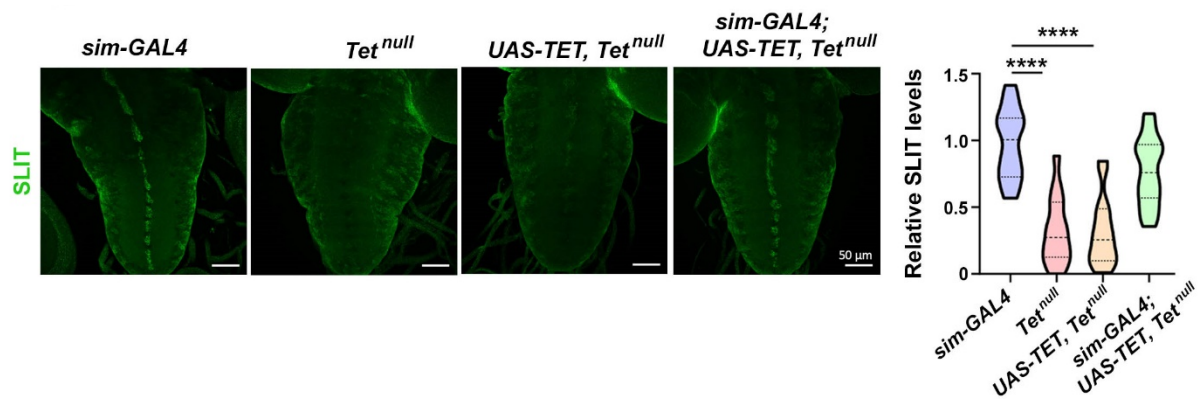
Supplementary Figure S5. (A) Heatmap showing ChIP-seq or CUT&RUN signals for various proteins or histone modifications surrounding TET binding sites ± 5 kb. All ChIP-seq and CUT&RUN signals are from third instar larval CNS. K-mean clustering was performed using histone marks as well as RNA pol II and HP1a signals. (B) Heatmap of the CNS larval chromatin states. Developmental and housekeeping enhancers were identified with the ChromHMM package using ChIP-seq or CUT&RUN signals for H3K4me1, H3K4me3, H3K27Ac, GAF and CP190. States 3 and 5 correspond respectively to developmental or housekeeping enhancers, as confirmed by the projection of the STARR-seq signals from the neuronal cell line BG3-c2 cells for these two categories of enhancers.



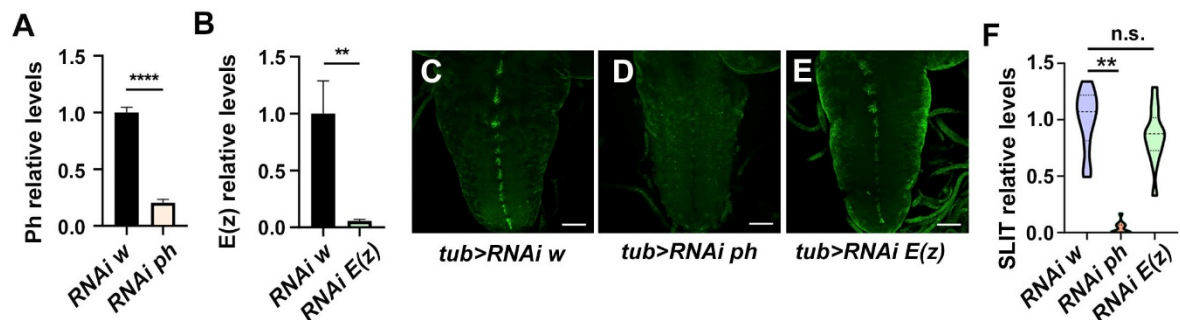
Supplementary Figure S6. (A) Immunostaining against GFP showing the expression of the endogenous TET protein tagged with GFP (*TET-GFP* knock-in) in the larval salivary gland (SG) and surrounding fat body (FB). Left panel: DAPI and GFP. Right panel: GFP only. (B) Immunostaining against HA on salivary gland polytene chromosomes showing the ectopically expressed HA-tagged TET protein (*sgs3-GAL4; UAS-HA-TET*). DNA was stained with DAPI.

Supplementary Figure S7. (A) IGV tracks showing the distinct binding pattern of TET, Ph and E(z) on *otk*. (B) Proportion of TET+ genes down-regulated in *Tet^{null}* larval CNS where at least one Ph or E(z) peak is aligned with TET peaks.

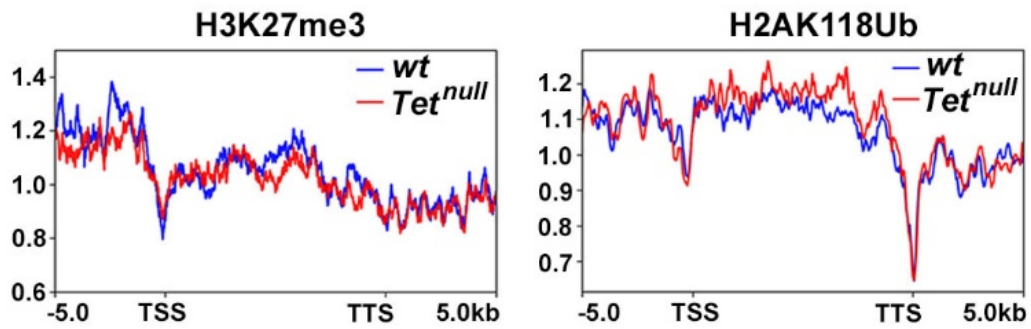




Supplementary Figure S8. Left panels: immunostaining showing Slit expression in the ventral nerve cord of third instar larvae of the indicated genotypes. Scale bar 50 μm . Right panel: quantification of Slit levels. ****: One-way ANOVA $p < 0.0001$. The re-expression of TET in the ventral midline of Tet^{null} larvae using the *sim-GAL4* driver is sufficient to rescue SLIT expression.



Supplementary Figure S9. *tub-GAL4*, *tub-GAL80^{ts}* individuals carrying *UAS-RNAi* transgene directed against *white* (*w*), *ph* or *E(z)* were raised at 18°C for 104 h then switched at 29°C for 48 h and their CNS were dissected. (A, B) Quantifications by western blot of Ph and E(z) relative protein levels in the larval CNS (cf. Fig. 4K). Student's t-test ****: $p < 0.0001$, **: $p < 0.01$. (C-F) Immunostaining showing Slit expression in the ventral nerve cord of third instar larvae of the indicated genotypes (C-E) and corresponding quantifications of Slit levels in the ventral midline (F). Scale bar 50 μm . One-way ANOVA **: $p < 0.01$, n.s. non-significant.



Supplementary Figure S10. Enrichment of H3K27me3 (left panel) and H2AK118ub (right panel) CUT&RUN signals in the CNS from wild type (*wt*, blue) or *Tet^{null}* (red) larvae on TET target genes up-regulated in the absence of TET expression. TSS: transcription start site. TTS: transcription termination site.

Supplementary Table 1. List of primers and antibodies used in this study.

Primers		
RT-qPCR		
Transcript	Forward primer sequence	Reverse Primer sequence
gapdh	AATCAAGGCTAAGGTCGAGGAG	TAACCGAACTCGTTGTCGTACC
sli	GATTCCTCGCAGTGCCAC	ACGCTGGTCAGACTCTTCTC
otk	CTCGTTCTGGTCAAGCCCT	CCAGCAGGAACTGCTTGAGA
ru	CCTTAGCTATGCCCTGTCC	AGCAAGGCGTAAACTCTCC
Pura	GTGGAGGTGGAATCAAGGGG	TGGATGACTCGTCGTTGAA
tap	GTTTCGACGAATGTTCCCT	TGGACTCTGCTGGGGATTA
Dscam3	AATAACAGCAGCAAGGGCT	CAGCGCCTTTCCAGGACTA
eve	CTCGCCAAATGAATGCCTATC	GTGCGATAGCGGCGTAC
abd-b	TTCGAGCAGCAACCAACCAC	CAAGGGTCACTGGTGCATCTTG
qChIP		
Locus	Forward primer sequence	Reverse Primer sequence
pgrp-le	CCTGGTGAATGATAGCTTACTCTG	CTTACTCAAACCGAAGAGATCG
Ras64B	GAGGGATTCTGCTCGTCTTCG	GTCGCACTTGTTACCCACCATC
ChAT	ATCATGCCCATCGACATCCT	GGCGGGGCATAACATTGTC
sli (promoter/Ez qChIP)	AGTTGACTACACACATTG	CTGGTTCAAAGAACCAGTTC
sli (intron/TET-GFP & Ph qChIP)	AGACTTCAGTTAACCCTGTGC	ATCTTACGTCTGGGTCGGG
aos	CCGGTCTCTTTCACAGCTT	CGCGGTTTGTATGCAGGTAA
DIP-eta	TGTTGTTGCTGGCCACATT	TTCACGCGCCCAAAGTATG
antp	TGGCCGAGTTTATATCGAAGCG	CGGCCAACTTGTTGTTGTTTTC
eve	AGATGGCATGTGGCTCTCTCCC	TTTGGGCTGAGGCGGTTCC
bxd	GCCATAACGGCAGAACCAAAG	ATGAGGCCATCTCAGTCGC
otk	TCCTCTGGCTGGGCTTAAC	TGTTCCCTCGTCTCGTATCG
dachs	TACCTCGAACGTCAGACC	ATGCTGTCTCGAACTGGGA
dscam3	TGGCTGAGGTTAAACGTTCC	CGATTCAACAGCTCCGTCT
Gprk2	ATGGGTAGGGCTGTTGGAA	CCATACCAACAGCGACACAG
CenG1A	CGTTGCCAGGACATTCTACC	TTACCTGGACCGAATGCCTG
CG42747	ATTCTGTGAGCCGAACCTC	TGAAGAGAGTGGGGAACGAG
CG7991	GAAGACCTCTGCTCCACT	ATCCTCTGGCCAGATGATG

Antibodies			
Antibody	Ref.	Species	Experiment
anti-GFP	Abcam (ab290)	Rabbit	ChIP (1:200)
anti-GFP	Takara (JL-8)	Mouse	WB (1:1000)
anti-Tub	Sigma (DM1A)	Mouse	WB (1:1000)
anti-Ph	(Grimaud et al., 2006)	Goat	ChIP (1:200) IP (1:200) WB (1:1000) Immunostaining (1:200)
anti-Ez	(Gambetta et al., 2009)	Rabbit	ChIP (1:200) IP (1:200) WB (1:1000) Immunostaining (1:200)
anti-Pho	(Brown et al., 2003)	Rabbit	WB (1:1000)
anti-H3K4me3	Abcam (ab8580)	Rabbit	Cut&Run (1:100)
anti-H3K27ac	Abcam (ab4729)	Rabbit	Cut&Run (1:100)
anti-H3K27me3	Active Motif (39055)	Rabbit	Cut&Run (1:100)
anti-H2AubK118	Cell Signaling (D27C4)	Rabbit	Cut&Run (1:100)
anti-Fas3	DSHB (7G10)	Mouse	Immunostaining (1:100)
anti-SLIT	DSHB (C555.6D)	Mouse	Immunostaining (1:50)
anti-HA	Sigma (#11867423001)	Rat	Immunostaining (1:1000)
anti-IgG Alexa Fluor 488	Invitrogen	Donkey	Immunostaining (1:1000)
anti-IgG Cy3	Jackson ImmunoResearch	Donkey	Immunostaining (1:1000)

Les tableaux suivants sont trop volumineux pour être intégrés au manuscrit et ne sont disponibles qu'en format informatique :

Supplementary Table 2. List of differentially expressed genes between *Tet^{null}* and wild type third instar larval CNS.

Supplementary Table 3. List of differentially expressed genes between *Tet^{CD}* and wild type third instar larval CNS.

Supplementary Table 4. Enriched Gene Ontology terms for differentially expressed genes in the CNS of *Tet^{null}* or *Tet^{CD}* larvae.

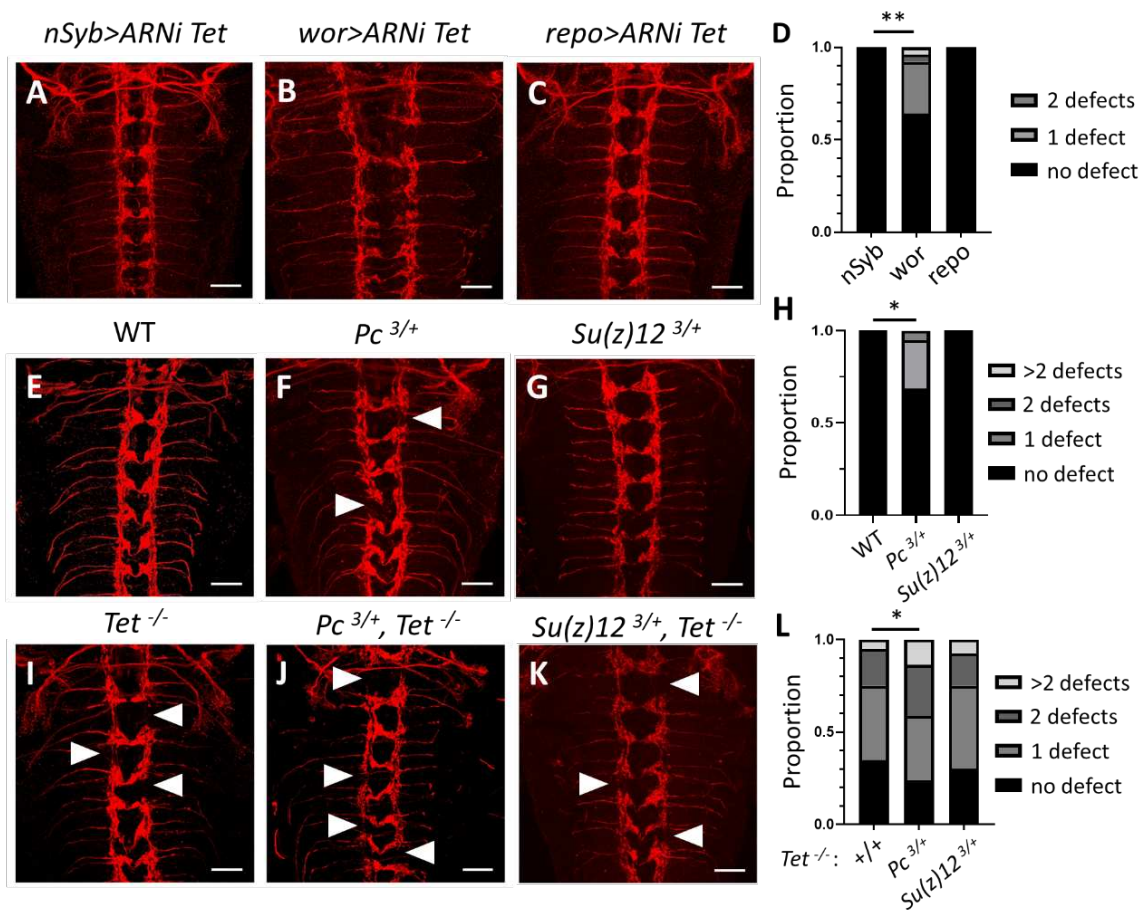
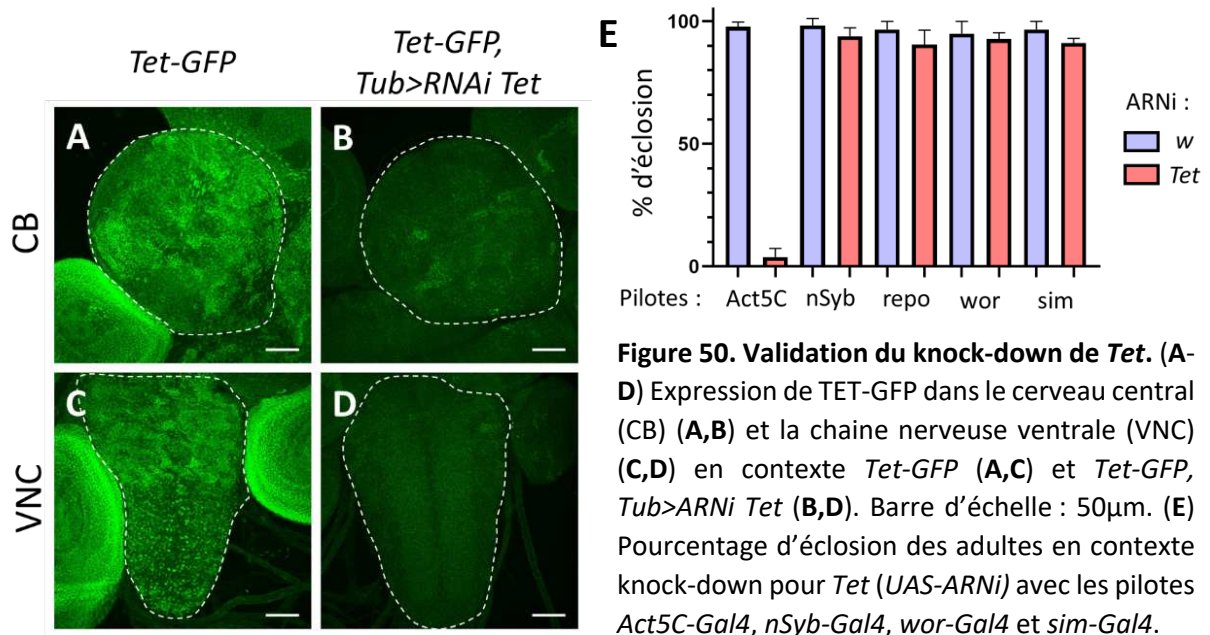


Figure 51. Impact de la perte de *Tet* et Polycomb sur les connexions des neurones Fas3⁺ dans la VNC. Marquage Fas3 dans la VNC de larves knock-down pour *Tet* dans (A) les neurones, (B) les neuroblastes, et (C) les cellules gliales, ou mutantes pour (F,J) *Pc*, (G,K) *Su(z)12*, et/ou (I,J,K) *Tet*. (D,H,L) Quantification des défauts observés. Les flèches blanches indiquent des défauts. Barre d'échelle : 25µm. Test exact de Fisher (D,H) ou d'ajustement du Khi2 (L).

3. Résultats complémentaires

3.1. Rôle de *Tet* dans le système nerveux central larvaire

Des données de scRNA-seq générées en SNC larvaire (Dillon et al. 2022), ainsi que des immunomarquages réalisés à divers stades développementaux montrent que *Tet* est exprimé dans différents types cellulaires au sein du SNC (Delatte et al. 2016; F. Wang et al. 2018; Yao et al. 2018; Ismail et al. 2020; Frey et al. 2022). Pour tester l'importance fonctionnelle de *Tet* dans les différents types cellulaires du SNC larvaire, nous avons utilisé le système UAS/Gal4 couplé à un ARNi dirigé contre *Tet* pour induire un *knock-down* conditionnel. Le *knock-down* constitutif de *Tet* grâce au pilote *Act5C* permet d'abolir l'expression de TET (Fig.50A-D), et induit une létalité au stade pupal (Fig.50E). Ainsi le *knock-down* de *Tet* phénocopie la létalité observée en contexte *Tet null*. En revanche, un *knock-down* conditionnel dans les neurones matures (*nSyb-Gal4*), les cellules gliales (*repo-Gal4*), les NB (*wor-Gal4*) ou les cellules de la ligne médiane (*sim-Gal4*) n'induit aucune létalité (Fig.50E), suggérant que ce phénotype n'est pas dû à une contribution spécifique de *Tet* dans l'un des types cellulaires majeurs du SNC. De plus, un marquage Fas3 dans la VNC en condition *knock-down* pour *Tet* dans les NB révèle des défauts de guidance axonal similaires à ceux observés en contexte *Tet null* (Fig.51A-D). Ces défauts n'ont pas été observés quand l'expression de *Tet* est inhibée spécifiquement dans les neurones ou les cellules gliales. Ce résultat suggère donc que ces défauts sont dus à une contribution spécifique de *Tet* dans les NB.

Afin de tester si, à l'image de *Tet*, le complexe Polycomb est également impliqué dans les connexions des neurones dans la VNC, un immun marquage Fas3 a été réalisé sur des SNC larvaires en contexte *Pc^{3/+}* et *Su(z)12^{3/+}*. Les résultats montrent que seul les mutants *Pc^{3/+}* présentent des défauts de connexion axonal (Fig.51E-H), suggérant que PRC1 est également impliqué dans ce phénomène indépendamment de PRC2. De façon intéressante, les doubles mutants *Pc^{3/+}, Tet^{-/-}* présentent plus de défauts que le mutant *Tet^{-/-}* (Fig.51I-L), suggérant une interaction génétique entre *Tet* et *Pc*. La mutation *Su(z)12³*, elle, ne semble pas aggraver les phénotypes associés à la perte de *Tet*.

Une étude récente montre que dans un contexte déficient pour *Tet*, le nombre de cellules gliales (positives pour le marqueur Repo) dans le cerveau central larvaire est plus important du fait d'une augmentation de la prolifération de ces cellules (Frey et al. 2022). Contrairement à ces résultats, nos données indiquent que le nombre de cellules gliales Repo⁺

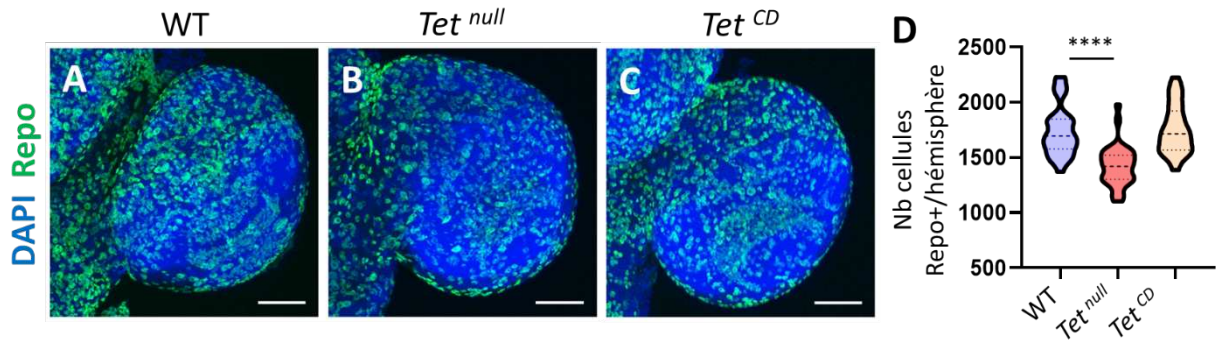


Figure 52. Nombre de cellules gliales dans le CB des mutants *Tet*. Marquage Repo dans le CB en condition (A) WT, (B) *Tet^{null}* et (C) *Tet^{CD}*. Barre d'échelle : 50µm. (D) Quantification par Imaris du nombre de cellules Repo⁺ par hémisphère. Barre d'échelle : 50µm. Test one-way ANOVA **** : $p < 0,0001$.

UAS / Gal4	<i>nSyb</i>	<i>repo</i>	<i>wor</i>	<i>sim</i>	<i>Tub</i>
TET-L	léthal	léthal	viable	viable	léthal
TET-C	viable	viable	viable	viable	léthal

Tableau 1. Viabilité des mouches surexprimant TET-L ou TET-C avec différents pilotes.

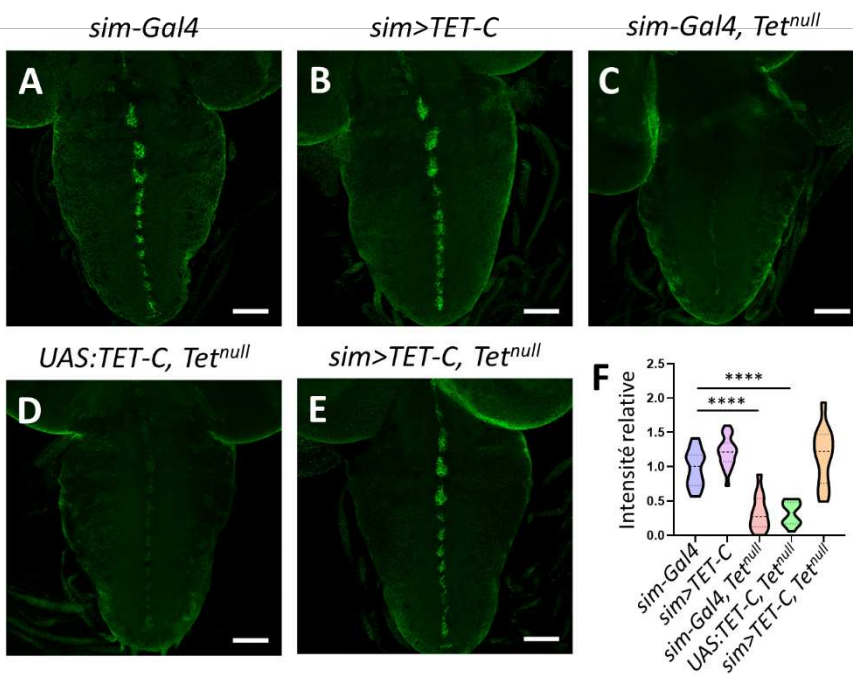


Figure 53. La réexpression de TET-C restaure les niveaux de SLIT dans la VNC. (A-E) Marquage Slit dans la VNC en condition WT ou *Tet^{null}* avec ou sans les transgènes *UAS:TET-C* et *sim-Gal4*. (F) Quantifications correspondantes de Slit pour chaque génotype. Barre d'échelle : 50µm. Test one-way ANOVA. **** : $p < 0.0001$

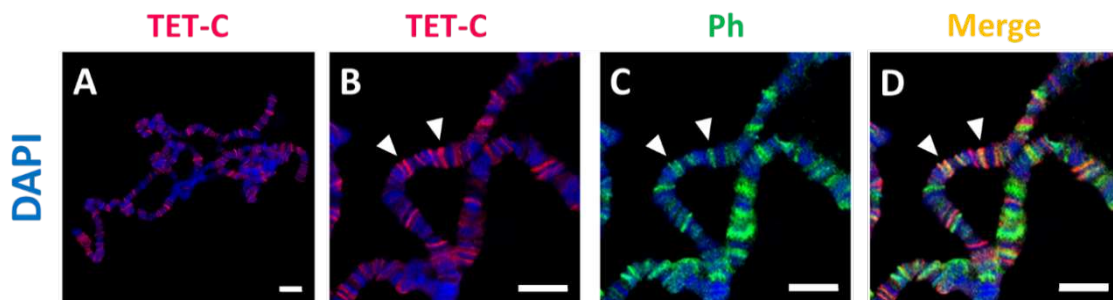


Figure 54. Colocalisation entre TET-C et Ph sur chromosomes polytènes. Marquages HA et Ph sur des chromosomes polytènes de larves *sgs3>HA-TET-C*. Les flèches blanches montrent des *loci* sur lesquels TET-C et Ph colocalisent. Barre d'échelle : 10µm.

diminue significativement en contexte *Tet^{null/null}* (Fig.52). De plus, le nombre de cellules Repo⁺ n'est pas altéré en contexte *Tet^{CD/CD}* (Fig.52), démontrant que *Tet* pourrait contrôler le développement des cellules gliales indépendamment de son activité catalytique.

Le gène *Tet* code pour deux isoformes protéiques. Le premier correspond à une protéine TET « pleine taille » (2921 acides aminés) alors que le second correspond à une protéine plus courte (2056 acides aminés) dépourvue notamment du domaine CXXC. Les domaines d'expression relatifs de ces deux isoformes et leurs fonctions respectives restent encore mal déterminés. Néanmoins, les données de l'équipe et de la littérature (Ismail et al. 2019; Frey et al. 2022) suggèrent que, dans les différents tissus larvaires, l'isoforme longue a un patron d'expression plus restreint que l'isoforme courte, mais qu'elle est fortement exprimée dans le SNC.

Pour tester l'importance fonctionnelle des deux isoformes protéiques de TET dans le SNC, le système UAS/Gal4 a été utilisé pour surexprimer TET-long (TET-L) ou TET-court (TET-C). De manière intéressante, la surexpression de TET-L mais pas celle de TET-C est létale avec les pilotes *nSyb-Gal4* et *repo-Gal4* (Table.1). Cela suggère que des niveaux trop élevés ou ectopiques de TET-L sont toxiques pour les cellules ou induisent des effets délétères au cours du développement, alors que ce n'est pas le cas pour TET-C. D'autre part, nos résultats indiquent que l'expression de TET-L dans les cellules de la ligne médiane du SNC en contexte *Tet null* est suffisante pour restaurer les niveaux de Slit (cf. manuscrit 2, Figure S8). De manière intéressante, l'expression de TET-C dans les cellules médianes en contexte *Tet null* permet également de restaurer les niveaux de Slit (Fig.53), suggérant une redondance fonctionnelle entre les deux isoformes pour la régulation de l'expression de *slit*.

Enfin, l'expression de TET-C dans les glandes salivaires (*sgs3-Gal4*) montre que cette isoforme se fixe également à la chromatine des chromosomes polytènes (Fig.54A) et colocalise avec Ph (Fig.54B-D), comme TET-L (cf. manuscrit 2, Figure 3 et S6). Le domaine CXXC de TET ne semble donc pas nécessaire au recrutement de TET à la chromatine ni à sa colocalisation avec PRC1.

3.2. Rôle de *Tet* dans la structure 3D de l'ADN

Le recrutement du complexe PRC1 a récemment été corrélé avec la formation de boucles d'ADN (*i.e.* des interactions longues distances entre deux positions génomiques), les

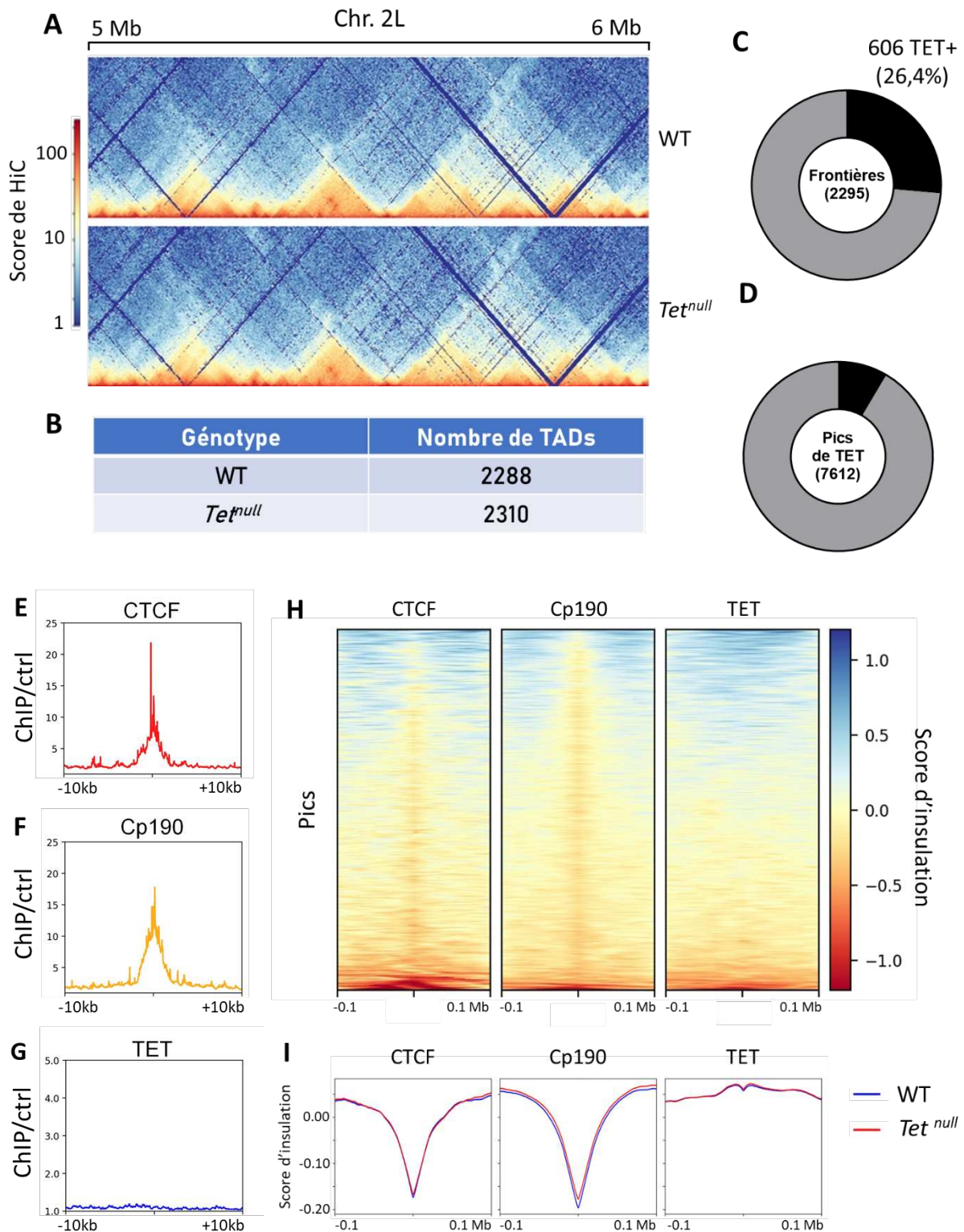


Figure 55. TET n'exerce pas d'effet insulator. (A) Capture de HiC montrant les TADs sur une portion du chromosome 2L. (B) Nombre de TADs en contexte WT et *Tet^{null}*. (C) Nombre de frontières ayant un pic de TET et (D) nombre de pics de TET présents au niveau des frontières entre deux TADs. Enrichissement des facteurs (E) CTCF, (F) CP190 et (G) TET au centre des bordures de TADs +/-10kb. (H) Score d'insulation au niveau des pics de CTCF, CP190 et TET +/-100kb. (I) Comparaison entre les scores d'insulation WT et *Tet^{null}* au niveau des pics de CTCF, CP190 et TET.

différentes sous-unités et recruteurs du complexe PRC1 étant enrichis aux ancres des boucles. Ainsi il a été proposé que le complexe PRC1 pourrait participer à l'activation de gènes développementaux par le rapprochement de séquences régulatrices et de promoteurs lors de transitions développementales (Gutierrez-Perez et al. 2019; Loubiere et al. 2020). De plus, une étude récente montre que la perte des gènes *Tet2* et *3* est associée à des remaniements de contacts longues distances impliquant le facteur *insulator* CTCF dans des kératinocytes de type I (G.-D. Chen et al. 2023).

Pour tester l'implication éventuelle de *Tet* dans l'établissement des structures 3D de l'ADN dans le SNC larvaire chez la Drosophile, nous avons généré, en collaboration avec l'équipe du Dr. G Cavalli (IGH, Montpellier), des données de HiC de haute résolution (2kb) dans ce tissu en condition WT et *Tet^{null}* (en duplicats, 500 millions de reads/échantillon). Premièrement, l'inspection visuelle des cartes de HiC montre que le paysage tridimensionnel de la chromatine n'est pas drastiquement impacté suite à la perte de *Tet* (Fig.55A). En ce sens, 2288 et 2310 TADs ont été respectivement détectés en contexte WT et *Tet^{null}* en utilisant HiCExplorer (Ramírez et al. 2018) (Fig.55B). A noter que le nombre de TADs observé dans nos expériences est cohérent avec celui obtenu dans une étude précédente (2126 TADs dans les cellules Kc (Eagen, Aiden, et Kornberg 2017)). L'intégration des données de CHIP-seq de TET montre que 26,4% des frontières entre TADs sont liées par TET (Fig.55C), néanmoins cela ne représente que 8.5% des peaks de TET (Fig.55D) indiquant que TET est majoritairement localisé à l'intérieur de ces domaines. En ce sens, l'analyse du signal de CHIP montre que TET n'est pas enrichi aux bordures de TADs en comparaison des facteurs *insulators* CTCF et Cp190 (Fig.55E-G), des protéines se liant principalement sur ces frontières (Kaushal et al. 2021; 2022). Enfin, le score d'insulation, qui reflète le nombre d'interactions entre chaque position génomique (Crane et al. 2015), a été calculé sur l'ensemble du génome. Les sites de fixations de TET ne sont pas associés à un enrichissement négatif central du score d'insulation (Fig.55H), et sa perte n'est pas non plus associée à une modification de ce score (Fig.55I), indiquant que *Tet* n'exerce pas d'effet *insulator* au niveau global.

La présence de TET aux sites d'ancrage des boucles Polycomb a aussi été analysée. La détection des boucles d'ADN en utilisant SIP (Rowley et al. 2020) nous a permis de détecter 182 boucles d'ADN montrant un enrichissement central du score de HiC (z-score) (Fig.56A-B) ; un nombre similaire à celui détecté dans d'autres tissus dont le disque d'œil et les cellules S2 (Gutierrez-Perez et al. 2019; Loubiere et al. 2020). Parmi ces boucles, 127 possèdent un site

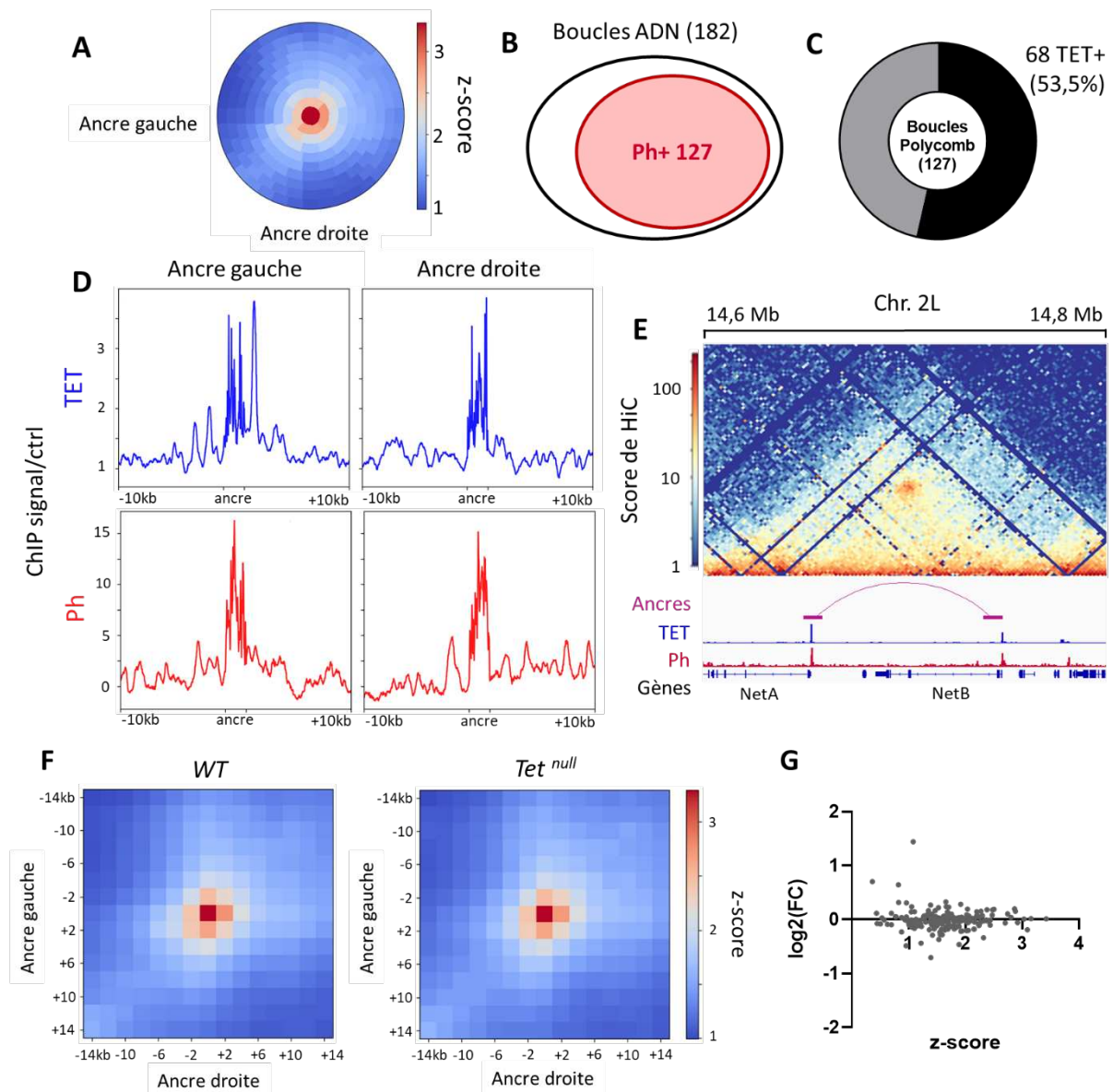


Figure 56. TET se lie aux ancrs des boucles Polycomb. (A) Metaplot représentant le score d'interaction (z-score) aux ancrs des boucles d'ADN détectées par SIP. (B) Nombre de boucle d'ADN présentant un pic de Ph sur les deux ancrs. (C) Nombres de boucles Polycomb liées par TET sur les deux ancrs. (D) Enrichissement de TET et Ph au niveau des ancrs des boucles Polycomb. (E) Capture de HiC montrant une boucle Polycomb liée par TET et reliant les promoteurs des gènes *NetA* et *NetB*. (F) Metaplot représentant le score d'interaction moyen au boucles Polycomb en contexte WT (gauche) et *Tet*^{null} (droite). (G) MA-plot représentant la différence de niveau d'interaction pour chaque boucle Polycomb.

de fixation pour Ph aux deux ancras, et ont donc été définies comme boucles Polycomb (Fig.56B). 53.5% (68) d'entre-elles possèdent un site de fixation pour TET également aux deux ancras (Fig.56C). De plus, TET est enrichi aux ancras gauches et droites des boucles d'ADN (Fig.56D), comme observé sur la boucle reliant les promoteurs des gènes *NetA* et *NetB* (Fig.56E). Ces résultats suggèrent que TET peut être recruté aux boucles Polycomb, mais que cela n'est pas systématique. De plus, la perte de *Tet* n'a pas d'impact global sur la fréquence d'interaction de ces boucles (Fig.56F), et individuellement très peu de boucles ont une fréquence de contact fortement impactée par la perte de *Tet* (Fig.56G), suggérant que *Tet* n'est pas requis pour la stabilité et/ou la mise en place de ces interactions.

Discussion

1. TET ne déméthyle pas la marque 6mA

Nos résultats indiquent par différentes méthodes indépendantes d'anticorps que la perte de *Tet* n'est pas associée à une augmentation des niveaux de 6mA comme précédemment décrit dans différents tissus chez la *Drosophile* (Yao et al. 2018; G. Zhang et al. 2015; Ismail et al. 2019). Cependant, la plupart des études de la marque 6mA chez la *Drosophile* ont eu recours à des approches dépendantes d'anticorps tel que le DIP-seq ou le dot-blot. Comme évoqué dans l'introduction, l'utilisation d'anticorps pose des questions quant à leur spécificité (Bochtler et Fernandes 2021).

En effet, ces anticorps discriminent faiblement (ou pas du tout) les 6mA des m6A, impliquant que des traces d'ARN (sur lesquels la marque m6A est abondante) peut biaiser les niveaux de 6mA détectés. En ce sens, de nombreux ARN sont localisés au niveau de l'ADN comme les R-loops qui sont des hybrides ADN-ARN et peuvent présenter la modification 6mA. De récentes études montrent que TET peut justement être recruté aux sites formant des R-loops (Arab et al. 2019; Sabino et al. 2022) et qu'un nombre important de R-loops ne sont pas résolues en absence de TET (Shukla et al. 2022). Du fait de la faible discrimination entre 6mA et m6A par les anticorps anti-6mA, il est donc imaginable que des variations artéfactuelles des niveaux de 6mA puissent être observées à l'échelle génomique dans des régions retenant des R-loops en absence de TET. De plus, des lectures (« reads ») correspondant à des jonctions exon-exon ont été détectées dans des expériences de DIP-seq au niveau de sites enrichis en 6mA, suggérant que des contaminations ARN peuvent être à l'origine de faux positifs (Douvlataniotis et al. 2020). Bien qu'un traitement avec la RNase A soit préconisé dans ce type d'expérience, cette famille de RNase dégrade préférentiellement les ARN simple brin, et ne permet donc pas une élimination complète des ARN impliqués dans les structures hybrides ARN:ADN telles que les R-loops (Z. Z. Zhang et al. 2015). Ainsi, un traitement complémentaire à la RNase H est nécessaire pour éliminer complètement les ARN présents au niveau des R-loops (Cerritelli, Sakhuja, et Crouch 2022). A noter que ces traitements ne sont pas décrits dans les méthodes des publications ayant détecté un impact de *Tet* sur le niveau et la répartition génomique des 6mA (S. He et al. 2019; Yao et al. 2018; G. Zhang et al. 2015).

Par ailleurs, la reconnaissance des adénines non modifiées par ces anticorps est également préoccupante, puisque pour des taux de 6mA de l'ordre de 10ppm comme ceux communément retrouvés chez les métazoaires, une préférence de 100 000 fois pour la

marque 6mA par rapport à une adénine non méthylée est requise pour détecter correctement la modification. Cependant, une étude montre que les anticorps commerciaux ont une préférence qui n'est que 300 fois supérieure pour la 6mA (Douvlataniotis et al. 2020). Très récemment, il a été montré que les anticorps anti-6mA utilisés ne présentaient qu'une très faible sélectivité pour la marque, limitant leur potentiel d'utilisation chez les eucaryotes (Debo, Mallory, et Stergachis 2023). Néanmoins, cette étude montre que l'un des anticorps commerciaux testés est suffisamment spécifique pour permettre une reconnaissance de la marque jusqu'à des niveaux d'environ 10ppm. L'utilisation de cet anticorps révèle d'une part par Dot-Blot que les niveaux de 6mA sont très faibles dans l'embryon de *Drosophile* à 45min de développement. D'autre part, des expériences de DIP-seq sur ce même tissu et avec ce même anticorps montrent que les enrichissements de 6mA sont rares et aspécifiques (Debo, Mallory, et Stergachis 2023). Chez la *Drosophile*, les niveaux de 6mA ont été estimés entre 6 et 26 ppm notamment dans le cerveau adulte et les ovaires (Yao et al. 2018; G. Zhang et al. 2015). Ces niveaux sont donc trop faibles pour permettre une reconnaissance fiable de la marque par un anticorps anti-6mA.

Une autre méthode qui permet de mesurer les niveaux précis de 6mA dans un échantillon d'ADN est la UHPC-MS/MS. Le principal biais associé à cette technique correspond aux contaminations d'origine bactérienne qui induisent une surestimation des niveaux de 6mA (O'Brown et al. 2019). Une étude récente a ainsi montré que les niveaux « élevés » de 6mA relevés par Zhang et collaborateurs (Yao et al. 2018; G. Zhang et al. 2015) au tout début de l'embryogenèse sont probablement dus à des contaminations bactériennes (Kong et al 2022). Un élément permettant d'expliquer les variations des niveaux de 6mA entre différents fonds génétiques est lié à la quantité de bactéries présentes entre les lignées. L'endosymbiote *Wolbachia* par exemple, est communément retrouvé dans les lignées de *Drosophile*, dans lesquelles cette bactérie intracellulaire colonise les ovaires. Pour pallier ces problèmes, nous avons généré des mouches axéniques (*i.e.* dépourvues de toute contamination bactérienne et entretenues sur un milieu stérile). De plus, afin d'éviter l'apport d'une source potentielle de 6mA *via* le milieu de culture (qui contient notamment de la levure et de la farine de maïs), nous avons élevé ces mouches sur un milieu synthétique (ou « holidique »). Nos résultats ne montrent pas de différence dans les niveaux de 6mA entre milieu classique et synthétique dans le SNC, suggérant que l'apport de 6mA exogène n'est pas un problème majeur au sein de ce tissu. En revanche, la comparaison d'échantillons provenant de mouches élevées en

conditions axéniques ou non montrent des différences notables, avec plus de 6mA en condition non axénique et aussi une plus forte variabilité entre échantillons. Les différentes études ayant attribué à TET un rôle de déméthylation de la marque 6mA n'avaient pas réalisé ce type de contrôles. Il est donc possible que les différences de niveaux de 6mA précédemment rapportées soient en partie dues à une contamination différentielle des lignées utilisées, ou à une contamination exogène apportée au cours de l'expérience.

Comme seconde méthode d'analyse, nous avons eu recours à la technologie de séquençage SMRT-seq (Pacbio) pour à la fois quantifier le niveau de 6mA et déterminer la position exacte des 6mA dans le génome de la Drosophile à partir d'ADN extrait du SNC larvaire. Cette technologie a déjà été employée pour détecter les 6mA dans le génome d'autres métazoaires comme *C. elegans* (Greer et al. 2015) et dans des cellules ES chez la souris (T. P. Wu et al. 2016). Cependant l'utilisation des paramètres standards préconisés par PacBio pour détecter les 6mA (mQV>20 et couverture >25x) indique que les taux de cette marque dans le SNC larvaire seraient respectivement de 0.158% et 0.172% en contexte WT et *Tet^{null}*. Ce résultat n'est pas en accord avec nos données de UHPL-MS/MS qui indiquent des taux d'environ 0.0005% dans ce tissu, et nous avons observé un très faible niveau de réplication de la détection des 6mA entre les triplicats biologiques que nous avons généré, ce qui semble confirmer que la détection de 6mA par SMRT-seq est sujette à de nombreux faux positifs chez des organismes dont les niveaux en 6mA sont très faibles (Douvlataniotis et al. 2020; Kong et al. 2022). L'utilisation de paramètres d'identification des 6mA beaucoup plus stricts (mQV>100) nous a permis d'augmenter le taux de réplication entre nos trois échantillons (~80%) et de diminuer drastiquement le nombre de 6mA détectées. Cependant, même dans des conditions strictes, nos analyses ne révèlent aucune différence significative dans les niveaux de 6mA estimés entre les conditions WT et *Tet^{null}*. Nous avons aussi étudié les caractéristiques génomiques des 6mA identifiées dans ces conditions strictes, mais là encore nos résultats n'ont pas révélé de différence significative entre les conditions WT et *Tet^{null}* (résultats non montrés).

Enfin, il était important de tester directement, *in vitro*, l'activité enzymatique de TET vis à vis des 6mA sur l'ADN. Nos résultats montrent que si le domaine catalytique de TET de Drosophile oxyde très efficacement les 5mC, il est incapable de démétyler les 6mA dans les mêmes conditions expérimentales. Même si on ne peut pas exclure qu'*in vivo* TET puisse avoir une spécificité de substrat différente, l'ensemble de nos résultats nous amène à conclure que

TET n'agit pas chez la Drosophile en déméthylant les 6mA, contrairement au modèle proposé jusqu'ici.

2. TET agit majoritairement *via* un mode d'action non-enzymatique

2.1. Fonction non-enzymatique de *Tet*

Les études précédentes attribuent la fonction de TET à la déméthylation des marques 6mA sur l'ADN ou à l'hydroxylation des m5C sur les ARNm chez la Drosophile. Cependant, les expériences des publications précédentes ont été réalisées avec des allèles mutants « *null* » ou en condition knock-down pour *Tet* et l'importance de l'activité catalytique de TET n'a pas été évaluée directement dans ces études. L'utilisation d'un mutant de *Tet* (*Tet^{CD}*) dépourvu d'activité catalytique nous a permis de montrer que son activité catalytique n'est pas requise pour le développement de la Drosophile. En effet, le mutant *Tet^{CD}* ne récapitule pas les phénotypes observés en contexte *Tet^{null}* (*i.e.* létalité au stade puppe ou péri-éclosion, ovaires atrophiés, défauts de projection des corps pédonculés dans le cerveau, port des ailes « held out »). Au niveau du transcriptome dans le SNC larvaire, seuls ~30% des gènes dérégulés en contexte *Tet^{null}* le sont également en contexte *Tet^{CD}*, suggérant que la majorité des gènes contrôlés par *Tet* le sont par un mode d'action non-catalytique. Les analyses de Gene Ontology montrent que les catégories de gènes le plus en lien avec le développement du SNC sont spécifiquement enrichies pour la liste de gènes négativement régulés en contexte *Tet^{null}*. Parmi ces catégories est retrouvée l'adhésion cellulaire, avec des gènes impliqués par exemple dans la guidance axonale et la reconnaissance synaptique, faisant écho aux défauts de connexion axonale observés seulement chez le mutant *null*. De même, la voie EGFR qui contrôle notamment le développement des cellules de la ligne médiane de la VNC (Gallio et al. 2004) est dérégulée spécifiquement dans ce contexte. Ces résultats argumentent en faveur d'un mode d'action non-enzymatique de TET dans le développement du SNC. Chez les mammifères, plusieurs études ont mis en lumière des fonctions non-catalytiques des enzymes de la famille TET (Q. Chen et al. 2013; K. Ito et al. 2019; Chrysanthou et al. 2022). En ce sens, le mode d'action non-enzymatique proposé est le recrutement et la stabilisation d'autres facteurs à la chromatine comme l'enzyme OGT pour activer la transcription, ou le complexe répresseur Sin3A et PRC2 pour réprimer la transcription. De même, nos travaux montrent que TET agit avec PRC1 pour activer la transcription de ses gènes cibles indépendamment de son

activité catalytique (cf. ci-dessous). A noter que TET agit aussi en bonne partie de façon catalytique indépendante pour réprimer l'expression des gènes dans le SNC, mais nous n'avons pas caractérisé les mécanismes moléculaires sous-jacents. L'identification des partenaires de TET dans ce tissu ou dans des populations de cellules spécifiques pourrait peut-être aider à éclaircir cet aspect.

De manière intéressante, l'enzyme épigénétique TET n'est pas la seule à présenter des fonctions indépendantes de son activité catalytique. Des travaux précédents de l'équipe auxquels j'ai participé démontrent que l'arginine méthyltransférase PRMT5 est nécessaire à la formation des vaisseaux sanguins chez le poisson zèbre indépendamment de son activité catalytique (Annexe.1) (Quillien et al. 2021). Ainsi, de plus en plus d'études se concentrent sur la caractérisation des modes d'action non catalytiques des différentes familles d'enzymes épigénétiques (Morgan et Shilatifard 2023). A titre d'exemple, l'activité acétyltransférase de Nejire (homologue de p300/CBP chez la Drosophile) et de Gcn5 n'est pas requise pour l'activation du génome lors de la transition zygotique chez la Drosophile (Ciabrelli et al. 2023). De même, l'analyse différentielle de cellules ES de souris *LSD1* KO ou *LSD1* CI (catalytique inactif) montre que la perte de l'activité histone déméthylase de LSD1 n'impact que partiellement la transcription des gènes cibles et l'activité des *enhancers* proximaux (Zeng et al. 2023). Ainsi, la mise au point de mutations ou d'inhibiteurs chimiques permettant de spécifiquement abolir l'activité catalytique des enzymes épigénétiques sans altérer leur expression permet de révéler des fonctions non-enzymatiques pour ces enzymes et ainsi d'atteindre un niveau supérieur dans la compréhension des mécanismes alternatifs par lesquels ces facteurs régulent l'expression des gènes.

2.2. Fonction enzymatique de Tet

De manière intéressante, l'incubation du domaine catalytique de TET de Drosophile avec des oligonucléotides contenant une 5mC confirme que ce domaine est fonctionnel, puisque les différents résidus oxydés (5hmC et 5fC ; le 5caC n'a pas été mesuré) produits suite à l'activité des enzymes TET ont été détectés. Curieusement, la perte des DNMT chez les diptères, dont fait partie la Drosophile, ne corrèle pas avec une perte de fonction du domaine catalytique de TET. De plus, les profils transcriptomiques du SNC larvaire en contextes *Tet^{null}* et *Tet^{CD}* montrent que 30% des gènes dérégulés en contexte *Tet^{null}* le sont également en

contexte *Tet^{CD}*. Bien que TET semble réguler l'expression des gènes majoritairement de manière enzymatique-indépendante, l'activité catalytique de TET est néanmoins requise pour réguler l'expression d'un sous-ensemble de gènes. Cependant, la plupart des gènes dérégulés chez le mutant *Tet^{CD}* ne sont pas dérégulés en contexte *Tet^{null}*. Une explication possible serait que des défauts distincts pourraient avoir été accumulés lors du développement des larves *Tet^{CD}* et *Tet^{null}* jusqu'à conduire à cette identité transcriptionnelle particulière. En effet, le mutant *Tet^{CD}* peut être vu comme un mutant « partiel » pour *Tet* : seuls les défauts liés à la perte de l'activité catalytique de TET s'y manifestent, conduisant à un profil distinct par rapport au mutant *Tet^{null}* qui abolit l'ensemble des fonctions de *Tet* (enzymatiques et non-enzymatiques). Les larves *Tet^{CD}* et *Tet^{null}* suivent donc potentiellement deux trajectoires développementales différentes, ce qui se reflète au niveau du transcriptome du SNC larvaire. L'étude de stades plus précoces du développement permettrait sans doute d'avoir une meilleure vision des gènes régulés par TET de façon enzymatique ou non.

Si nos résultats indiquent que l'activité catalytique de TET semble requise pour une partie de sa fonction, l'identité de son substrat reste incertaine. Concernant la méthylation de l'ADN, nos résultats montrent que le domaine catalytique de TET est incapable de déméthyliser des 6mA *in vitro* après 30 minutes d'incubation (alors qu'il oxyde la même quantité de 5mC en moins de 2 minutes). Une incubation plus longue permettrait peut-être de mettre en évidence une activité déméthylase, qui serait alors peu efficace et n'expliquerait pas aisément l'augmentation drastique des niveaux de 6mA rapportée dans les embryons précoces *Tet^{null}* (Zhang et al. 2015). De plus, nos mesures d'UHPL-MS/MS révèlent que la marque 5mC est faiblement détectée dans le SNC larvaire malgré l'absence de méthyltransférase connue pour déposer cette marque chez la Drosophile (Lyko 2018). Bien que le niveau global de 5mC ne semble pas dépendre de *Tet*, il n'est pas à exclure que TET puisse agir localement sur des loci contenant du 5mC et influencer l'activité transcriptionnelle des gènes alentours. Cependant, les niveaux de 5hmC dans le SNC étant sous le seuil de détection (0.00001%), il semble peu probable que l'oxydation des 5mC sous-tende la fonction enzymatique de TET dans ce tissu.

Concernant l'ARN, nous n'avons pas exploré la possibilité que TET soit impliquée dans l'oxydation de la marque m5C. A ce jour deux études menées chez la Drosophile suggèrent que TET participerait à l'oxydation des m5C sur les ARNm. La première montre que les niveaux de hm5C mesurés par dot blot sont réduits en contexte *Tet^{null}*, suggérant que TET est impliquée dans le dépôt de cette marque (Delatte et al. 2016). Cependant ces résultats n'ont

pas été reproduits par Yao et collaborateurs (2018) qui n'observent pas de variation de niveau de m5C ou hm5C en absence de TET par UHPLC-MS/MS. La seconde étude, encore à l'état de preprint, propose que TET participe à l'efficacité de la traduction des transcrits *slit* et *robo2* via le dépôt de hm5C (B. N. Singh et al. 2023). Or, nos résultats indiquent que TET contrôle l'expression de *slit* de manière indépendante de son activité catalytique. En effet, ni le niveau d'ARNm ni le niveau de protéine *slit* ne sont dérégulés en contexte *Tet^{CD}*, alors qu'ils sont fortement réduits en contexte *Tet^{null}*. Dans leur étude Delatte et al. (2016) comme Singh et al. (2023), utilisent un anticorps pour détecter la marque hm5C, ce qui pourrait remettre en cause leurs résultats du fait de sa faible spécificité pour la marque lorsque celle-ci est rare. Néanmoins, si la diminution du niveau de hm5C décrite sur le transcrit *slit* en absence de *Tet* est réelle, la régulation indépendante de l'activité catalytique de TET que nous observons suggère que ce changement n'est pas directement lié à l'activité enzymatique de TET. Chez les mammifères, il a été récemment montré que c'est l'enzyme ALKBH1 qui serait la principale responsable de l'oxydation des m5C sur l'ARN (Arguello et al. 2022). Une dérégulation de l'activité de l'homologue de cette enzyme chez la drosophile en contexte *Tet^{null}* pourrait donc affecter le niveau de hm5C sur l'ARNm *slit*. Il reste concevable aussi que TET régule *slit* à la fois au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel.

D'autre part, il est possible que TET participe à l'oxydation des m5C sur les ARNt chez la Drosophile comme proposé chez les mammifères (C. He et al. 2021; Shen et al. 2021). L'oxydation des m5C présents sur les ARNt modifie leur stabilité et leur maturation en tRFs. Les tRFs ont été décrits comme étant impliqués dans une grande variété de processus biologiques (Su et al. 2020). Par exemple, ces petits ARN peuvent agir comme des ARN interférents, suggérant que *Tet* pourrait indirectement réguler l'expression des gènes à l'échelle post-transcriptionnelle via le contrôle des niveaux de tRFs. De manière générale, l'étude de la méthylation des ARN par des techniques indépendantes d'anticorps comme les techniques de conversions chimiques ou le séquençage Oxford Nanopore permettrait d'avoir une vision plus fiable des modifications qui pourraient être affectées en absence de *Tet*. L'avantage de ces techniques est qu'elles confèrent une information positionnelle à la base près, et permettent de révéler d'éventuels changements très localisés, par opposition à la spectrométrie de masse qui mesure les niveaux globaux d'un échantillon. Il est en effet possible que l'oxydation des m5C par TET soit extrêmement localisée ou rare, expliquant pourquoi aucune variation des niveaux de cette marque n'est observée à l'échelle globale sur

les ARNm par exemple. Enfin il n'est également pas à exclure que TET soit capable d'agir sur un autre substrat encore inconnu à l'échelle de l'ADN, de l'ARN, ou d'autres catégories de molécules.

3. Mécanisme d'activation transcriptionnelle par TET et PRC1

Nos résultats révèlent une relation fonctionnelle inattendue entre TET et le complexe PRC1. En effet ce dernier a historiquement été décrit pour son activité de répression des gènes, plus particulièrement dans les domaines réprimés par Polycomb enrichis en marques H3K27me3 et H2AK118ub (Kassis, Kennison, et Tamkun 2017). Or, nos données indiquent que PRC1 est requis pour l'activation transcriptionnelle de gènes régulés par TET. Bien que le mode d'action reste à élucider, de récentes études montrent que le recrutement du complexe PRC1 corrèle avec l'activation de gènes développementaux et la formation de contacts entre des régions génomiques séparées par plusieurs dizaines de kb (Gutierrez-Perez et al. 2019; Loubiere et al. 2020).

De manière intéressante, la fixation de TET1 sur les promoteurs de gènes actifs et impliqués dans des interactions génomiques de longues distances a été observée dans des cellules de trophoblaste (Senner et al. 2020). De plus, dans des kératinocytes de type I double KO *Tet2/3*, des interactions longues distances avec des gènes *Krt* sont modifiées et corrèlent avec une dérégulation des niveaux des transcrits correspondant (G.-D. Chen et al. 2023). Certaines interactions sont moins fréquentes en contexte double KO, alors que d'autres sont créées. Dans le cas des interactions dont la fréquence est réduite, une diminution du recrutement de CTCF a été décrite, alors que la formation des nouvelles interactions ne corrèle ni avec un recrutement aberrant de CTCF, ni avec celui du complexe Polycomb. Ainsi, bien que cette étude ne décrive pas le rôle de la protéine TET dans la dynamique de ces interactions longues distances, ces données suggèrent que les protéines TET pourraient exercer une action dans le contrôle de l'architecture 3D de la chromatine.

Cependant, si nos données de HiC révèlent que TET se fixe sur une proportion importante de boucles d'ADN liées par PRC1, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'altération de ces structures en absence de TET. Cela suggère que *Tet* n'est pas requis pour l'établissement ou la stabilité de ces structures tridimensionnelles dans le SNC larvaire. De plus, de manière générale *Tet* ne semble pas impliqué dans l'architecture 3D du génome dans

ce tissu chez la Drosophile puisque TET ne colocalise que faiblement avec CTCF et CP190 aux bordures des TADs, et aucun effet sur leur insulation n'a été observé à l'échelle globale. Une possibilité est que TET soit impliquée dans des interactions génomiques plus fines et donc difficile à visualiser et à quantifier. L'analyse des interactions *enhancer*-promoteur à partir de données de HiC reste complexe due à l'absence de standard d'analyse bio-informatique bien référencé. Néanmoins, d'autres techniques de « *Chromatin Conformation Capture* » existent comme le 3C qui permet de détecter de manière plus résolutive les régions interagissant avec un locus donné. La limite de cette technique est qu'elle représente une approche ciblée et non globale. Sinon, le développement du Micro-C a très récemment permis de cartographier les interactions génomiques avec une résolution au nucléosome près (Slobodyanyuk, Cattoglio, et Hsieh 2022). Il est possible que le développement de cette technique permette de révéler des interactions encore plus ponctuelles que celles décrites à ce jour. Une autre limitation majeure de notre analyse HiC vient du fait que le SNC est un tissu complexe ; nous mesurons donc une moyenne d'interactions ADN/ADN dans l'ensemble du tissu. Une analyse spécifique des cellules dans lesquelles le gène d'intérêt est régulé par TET serait nécessaire pour être sûr de pouvoir mesurer l'impact de cette protéine sur l'organisation chromatinienne du locus.

Par ailleurs, le rôle de *Tet* dans l'activation de gènes neuronaux a également été décrit en cellule BG3C2 (Yao et al. 2018). Cette activation résulte du recrutement par TET de la protéine Will Die Slowly (Wds, homologue de WDR5 chez les mammifères), un membre du complexe trithorax COMPASS assurant la méthylation de H3K4. Ce scénario est compatible avec nos données montrant que les niveaux de H3K4me3 sont réduits sur les gènes cibles de TET réprimés en contexte *Tet^{null}*. Une hypothèse attrayante serait d'imaginer que TET, des protéines TrxG, et PRC1 pourraient agir en synergie pour contrôler l'expression de ces gènes. Cependant, Yao et al. (2018) proposent également que la déméthylation des 6mA sur les gènes actifs antagonise la fixation de Pc. Des tests de fixation *in vitro* montrent que Pc se fixe préférentiellement à des oligonucléotides enrichis en 6mA, et que cette fixation dépend majoritairement du domaine C-terminal CBOX. Ce résultat est inattendu puisque ce domaine est impliqué dans des interactions protéine-protéine avec dRING et Psc, et qu'aucun domaine de liaison à l'ADN n'a été identifié dans la séquence de la protéine Pc. A l'inverse, nous proposons que TET et Ph sont co-recrutés sur leurs gènes cibles. Ce recrutement est probablement dû à l'action de recruteurs comme Psq ou GAF, qui interagissent fortement

avec PRC1 (Chetverina et al. 2022). Cependant d'autres facteurs de transcription que ceux décrits comme enrichis aux PREs pourraient participer au recrutement de TET. De manière intéressante, le motif de liaison à l'ADN associé au facteur Tango (Tgo) est enrichi aux sites de liaison de TET et il a été montré que Tgo participe à l'activation directe du gène *slit* dans les cellules de la glie médiane de la VNC (Sonnenfeld et al. 1997). Aussi, son homologue chez les mammifères, HIF1 β , dimérise avec HIF1 α , l'un des partenaires de TET1 (Tsai et al. 2014). L'identification des partenaires protéiques de TET, par des approches de protéomiques par exemple, permettrait de révéler les facteurs capables d'interagir avec TET, et serait informative quant aux différents membres des complexes protéiques impliquant TET.

4. Relation fonctionnelle entre TET et PRC2

TET1 a été montré comme capable d'interagir avec PRC2 et de recruter ce complexe sur les promoteurs des gènes bivalents en cellules ES chez la souris afin de maintenir leur répression de façon indépendante de l'activité enzymatique de TET1 (Chrysanthou et al. 2022). Nos résultats dans le SNC larvaire de *Drosophila* ne mettent en évidence aucune relation fonctionnelle entre TET et PRC2. Des données de CHIP-seq générées pour E(z) dans ce tissu montrent un enrichissement de ce facteur au niveau des sites de fixation de TET, plus particulièrement dans les domaines réprimés par Polycomb. Néanmoins, l'analyse de la colocalisation exacte entre les sites de fixation de TET et de E(z) ne montre qu'un pourcentage limité de sites communs entre les deux facteurs (~10%). En lien avec ces résultats, nos expériences de co-immunoprécipitation n'ont pas permis de mettre en évidence une interaction entre TET et E(z). Ainsi, il est possible que ces deux enzymes se lient sur des sites de fixation très proches mais séparés au sein d'une même cellule, et par conséquent, qu'elles n'appartiennent pas à un même complexe. Une autre hypothèse est que la colocalisation observée en CHIP-seq reflète l'hétérogénéité des types cellulaires du SNC larvaire. Il est même possible qu'il existe une compétition de fixation entre TET et PRC2. Ainsi un locus donné se verra lié par TET dans certaines cellules, et par E(z) dans d'autres. Aussi, malgré la présence de E(z) sur les gènes cibles de TET, le knock-down de E(z) n'augmente pas les niveaux de ces transcrits (sauf dans un des huit cas que nous avons analysés), suggérant que la répression de ces gènes peut être préservée malgré l'absence de E(z), ou que leur activation requière d'autres facteurs. Néanmoins, le seul mode d'action de E(z) décrit chez la *Drosophila* est la

répression transcriptionnelle médiée par le dépôt de la marque H3K27me3 (Jürg Müller et al. 2002; Pengelly et al. 2013). Il est donc improbable que E(z) puisse directement participer à l'activation transcriptionnelle, argumentant en faveur d'une activation de la transcription dépendante de PRC1 et indépendante de PRC2.

Les immunomarquages réalisés sur chromosomes polytènes révèlent qu'une colocalisation « stricte » peut exister *in vivo* entre TET et E(z), bien que moins fréquente que la colocalisation entre TET et Ph. Ces sites pourraient représenter des PRE présents dans des domaines Polycomb (H3K27me3+). Malgré une fixation de TET sur certains PRE présents au sein de ces domaines sur lesquels E(z) est présent, nos résultats de RNA-seq ne montrent aucun effet de TET sur l'expression des gènes présents dans ces domaines. En ce sens, la délétion de facteurs de transcription interagissant avec PcG et se liant sur ces régions n'a un effet que très limité sur le recrutement du complexe Polycomb et sur la transcription (Brown, Sun, et Kassis 2018). Cela est expliqué par une redondance fonctionnelle entre les différents recruteurs. Il est donc possible que la délétion de TET ne soit pas suffisante pour induire une dérégulation des gènes dans ces domaines due à une compensation par d'autres facteurs.

5. Fonctions de TET dans les différents types cellulaires du SNC

Des études précédentes montrent que *Tet* est fortement exprimé dans le SNC larvaire, et que son expression est cruciale pour le développement de ce tissu. De manière intéressante, *Tet* est exprimé dans la majorité des types cellulaires du SNC comme montré par nos immunomarquage ou l'analyse de données de scRNA-seq (Dillon et al. 2022). Ainsi, il est probable que *Tet* soit requis dans différentes cellules du SNC pour assurer son développement, suggérant que *Tet* exerce différentes fonctions propres à chaque type cellulaire. En ce sens, nos résultats indiquent que *Tet* est requis pour l'activation transcriptionnelle de *slit* de manière cellule-autonome dans les cellules de la ligne médiane, et également que le *knock-down* de *Tet* dans les neuroblastes cause des défauts de fasciculation des neurones dans la corde nerveuse ventrale. La caractérisation des phénotypes après *knock-down* conditionnel de *Tet* sera cruciale pour faire la distinction entre les différentes fonctions de *Tet*. Aussi, la cartographie des sites de fixation de TET sur le génome de manière cellule/tissu spécifique, par l'approche DamID (van Steensel et Henikoff 2000) par

exemple, apportera un autre niveau de compréhension dans la spécificité des gènes cibles de TET.

Enfin, la présence d'un promoteur alternatif au sein du gène *Tet* chez la Drosophile conduit à la production de deux isoformes protéiques (F. Wang et al. 2018) : une isoforme pleine taille, ainsi qu'une isoforme dépourvue de la partie N-terminale contenant le domaine CXXC. De manière intéressante, des isoformes plus courtes de TET1 et TET3 manquant la partie N-terminale de la protéine existent également chez les mammifères et assurent des fonctions spécifiques (Melamed et al. 2018). Dans le cas de TET1 par exemple, deux isoformes ont été détectées : un variant pleine taille, exprimé dans l'embryon précoce et les cellules germinales, ainsi qu'un variant sans domaine N-terminal exprimé dans les cellules somatiques. L'isoforme courte présente une affinité réduite pour ses cibles génomiques, ainsi qu'une activité de déméthylation limitée, suggérant que la régulation de l'expression des différentes isoformes de TET est également un moyen de réguler ses fonctions (W. Zhang et al. 2016). Chez la drosophile, la surexpression dans certaines cellules du SNC de l'isoforme TET-L mais pas TET-C est létale. L'isoforme TET-L pourrait donc avoir des propriétés toxiques pour la cellule en cas de surexpression, et ces propriétés dépendent de la partie N-terminale de la protéine. A l'inverse, l'expression dans les cellules médianes de TET-L et TET-C est suffisante pour restaurer les niveaux de SLIT en contexte *Tet^{null}*, démontrant une redondance fonctionnelle entre les deux isoformes. De manière intéressante, il a été montré qu'une isoforme courte de Psq est enrichie aux boucles Polycomb par opposition à la protéine pleine taille qui colocalise préférentiellement avec des facteurs architecturaux tels que Su(Hw) et CP190 (Gutierrez-Perez et al. 2019). De façon similaire, il est imaginable que les différentes isoformes de TET ne se lient pas aux mêmes régions génomiques, et régulent leurs propres sous-ensembles de gènes. La caractérisation des fonctions respectives de ces deux isoformes et l'identification de leurs cibles génomiques permettrait d'avoir une vision plus complète des fonctions et des modes d'action de *Tet*.

Références bibliographiques

- Adams, M. D., S. E. Celniker, R. A. Holt, C. A. Evans, J. D. Gocayne, P. G. Amanatides, S. E. Scherer, et al. 2000. « The Genome Sequence of *Drosophila Melanogaster* ». *Science (New York, N.Y.)* 287 (5461): 2185-95.
<https://doi.org/10.1126/science.287.5461.2185>.
- Akhtar, Junaid, Margot Lugoboni, et Guillaume Junion. 2021. « m6A RNA Modification in Transcription Regulation ». *Transcription* 12 (5): 266-76.
<https://doi.org/10.1080/21541264.2022.2057177>.
- Alfieri, Claudio, Maria Cristina Gambetta, Raquel Matos, Sebastian Glatt, Peter Sehr, Sven Fraterman, Matthias Wilm, Jürg Müller, et Christoph W. Müller. 2013. « Structural basis for targeting the chromatin repressor Sfmtb to Polycomb response elements ». *Genes & Development* 27 (21): 2367-79. <https://doi.org/10.1101/gad.226621.113>.
- Altenhein, Benjamin, Pierre B. Cattenoz, et Angela Giangrande. 2016. « The Early Life of a Fly Glial Cell ». *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology* 5 (1): 67-84.
<https://doi.org/10.1002/wdev.200>.
- An, Woojin, Jaehoon Kim, et Robert G. Roeder. 2004. « Ordered Cooperative Functions of PRMT1, P300, and CARM1 in Transcriptional Activation by P53 ». *Cell* 117 (6): 735-48.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.05.009>.
- Anderson, Aimée E., Umesh C. Karandikar, Kathryn L. Pepple, Zhihong Chen, Andreas Bergmann, et Graeme Mardon. 2011. « The enhancer of trithorax and polycomb gene *Caf1/p55* is essential for cell survival and patterning in *Drosophila* development ». *Development (Cambridge, England)* 138 (10): 1957-66.
<https://doi.org/10.1242/dev.058461>.
- Antunes, Cláudia, Nuno Sousa, Luisa Pinto, et C. Joana Marques. 2019. « TET enzymes in neurophysiology and brain function ». *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 102 (juillet): 337-44. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.05.006>.
- Arab, Khelifa, Emil Karaulanov, Michael Musheev, Philipp Trnka, Andrea Schäfer, Ingrid Grummt, et Christof Niehrs. 2019. « GADD45A Binds R-Loops and Recruits TET1 to CpG Island Promoters ». *Nature Genetics* 51 (2): 217-23.
<https://doi.org/10.1038/s41588-018-0306-6>.
- Arents, G, R W Burlingame, B C Wang, W E Love, et E N Moudrianakis. 1991. « The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (22): 10148-52.
- Arguello, A. Emilia, Ang Li, Xuemeng Sun, Tanner W. Eggert, Elisabeth Mairhofer, et Ralph E. Kleiner. 2022. « Reactivity-Dependent Profiling of RNA 5-Methylcytidine Dioxygenases ». *Nature Communications* 13 (1): 4176.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-31876-2>.
- Audagnotto, Martina, et Matteo Dal Peraro. 2017. « Protein Post-Translational Modifications: In Silico Prediction Tools and Molecular Modeling ». *Computational and Structural Biotechnology Journal* 15 (janvier): 307-19.
<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2017.03.004>.
- Awasaki, Takeshi, Sen-Lin Lai, Kei Ito, et Tzumin Lee. 2008. « Organization and Postembryonic Development of Glial Cells in the Adult Central Brain of *Drosophila* ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 28 (51): 13742-53. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4844-08.2008>.
- Bannister, Andrew J., Robert Schneider, Fiona A. Myers, Alan W. Thorne, Colyn Crane-Robinson, et Tony Kouzarides. 2005. « Spatial Distribution of Di- and Tri-Methyl

- Lysine 36 of Histone H3 at Active Genes ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (18): 17732-36. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500796200>.
- Basanta-Sanchez, Maria, Rui Wang, Zhenzhen Liu, Xiaohan Ye, Minyong Li, Xiaodong Shi, Paul F. Agris, Yubin Zhou, Yun Huang, et Jia Sheng. 2017. « TET1-Mediated Oxidation of 5-Formylcytosine (5fC) to 5-Carboxycytosine (5caC) in RNA ». *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology* 18 (1): 72-76. <https://doi.org/10.1002/cbic.201600328>.
- Baumgardt, Magnus, Daniel Karlsson, Behzad Y. Salmani, Caroline Bivik, Ryan B. MacDonald, Erika Gunnar, et Stefan Thor. 2014. « Global Programmed Switch in Neural Daughter Cell Proliferation Mode Triggered by a Temporal Gene Cascade ». *Developmental Cell* 30 (2): 192-208. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.06.021>.
- Beh, Leslie Y., Galia T. Debelouchina, Derek M. Clay, Robert E. Thompson, Kelsi A. Lindblad, Elizabeth R. Hutton, John R. Bracht, Robert P. Sebra, Tom W. Muir, et Laura F. Landweber. 2019. « Identification of a DNA N6-adenine methyltransferase complex and its impact on chromatin organization ». *Cell* 177 (7): 1781-1796.e25. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.04.028>.
- Bello, Bruno, Niklaus Holbro, et Heinrich Reichert. 2007. « Polycomb group genes are required for neural stem cell survival in postembryonic neurogenesis of Drosophila ». *Development* 134 (6): 1091-99. <https://doi.org/10.1242/dev.02793>.
- Belmont, Andrew S. 2002. « Mitotic Chromosome Scaffold Structure: New Approaches to an Old Controversy ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (25): 15855-57. <https://doi.org/10.1073/pnas.262672799>.
- Bewick, Adam J., Kevin J. Vogel, Allen J. Moore, et Robert J. Schmitz. 2017. « Evolution of DNA Methylation across Insects ». *Molecular Biology and Evolution* 34 (3): 654-65. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw264>.
- Bilen, Julide, et Nancy M. Bonini. 2005. « Drosophila as a Model for Human Neurodegenerative Disease ». *Annual Review of Genetics* 39 (1): 153-71. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.39.110304.095804>.
- Birve, A., A. K. Sengupta, D. Beuchle, J. Larsson, J. A. Kennison, null Rasmuson-Lestander A, et J. Müller. 2001. « Su(z)12, a Novel Drosophila Polycomb Group Gene That Is Conserved in Vertebrates and Plants ». *Development (Cambridge, England)* 128 (17): 3371-79. <https://doi.org/10.1242/dev.128.17.3371>.
- Blackledge, Neil P., Anca M. Farcas, Takashi Kondo, Hamish W. King, Joanna F. McGouran, Lars L. P. Hanssen, Shinsuke Ito, et al. 2014. « Variant PRC1 Complex-Dependent H2A Ubiquitylation Drives PRC2 Recruitment and Polycomb Domain Formation ». *Cell* 157 (6): 1445-59. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.004>.
- Blanc, Roméo S., et Stéphane Richard. 2017. « Arginine Methylation: The Coming of Age ». *Molecular Cell* 65 (1): 8-24. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.11.003>.
- Blaschke, Kathryn, Kevin T. Ebata, Mohammad M. Karimi, Jorge A. Zepeda-Martínez, Preeti Goyal, Sahasransu Mahapatra, Angela Tam, et al. 2013. « Vitamin C Induces Tet-Dependent DNA Demethylation and a Blastocyst-like State in ES Cells ». *Nature* 500 (7461): 222-26. <https://doi.org/10.1038/nature12362>.
- Bochtler, Matthias, et Humberto Fernandes. 2021. « DNA Adenine Methylation in Eukaryotes: Enzymatic Mark or a Form of DNA Damage? ». *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 43 (3): e2000243. <https://doi.org/10.1002/bies.202000243>.

- Boone, Jason Q., et Chris Q. Doe. 2008. « Identification of Drosophila Type II Neuroblast Lineages Containing Transit Amplifying Ganglion Mother Cells ». *Developmental Neurobiology* 68 (9): 1185-95. <https://doi.org/10.1002/dneu.20648>.
- Boulias, Konstantinos, et Eric Lieberman Greer. 2022. « Means, Mechanisms and Consequences of Adenine Methylation in DNA ». *Nature Reviews. Genetics* 23 (7): 411-28. <https://doi.org/10.1038/s41576-022-00456-x>.
- Boyer, Laurie A., Kathrin Plath, Julia Zeitlinger, Tobias Brambrink, Lea A. Medeiros, Tong Ihn Lee, Stuart S. Levine, et al. 2006. « Polycomb Complexes Repress Developmental Regulators in Murine Embryonic Stem Cells ». *Nature* 441 (7091): 349-53. <https://doi.org/10.1038/nature04733>.
- Brien, Gerard L., Guillermo Gambero, David J. O'Connell, Emilia Jerman, Siobhán A. Turner, Chris M. Egan, Eiseart J. Dunne, et al. 2012. « Polycomb PHF19 Binds H3K36me3 and Recruits PRC2 and Demethylase NO66 to Embryonic Stem Cell Genes during Differentiation ». *Nature Structural & Molecular Biology* 19 (12): 1273-81. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2449>.
- Brody, Thomas, et Ward F Odenwald. 2000. « Programmed Transformations in Neuroblast Gene Expression during Drosophila CNS Lineage Development ». *Developmental Biology* 226 (1): 34-44. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9829>.
- Brown, J. Lesley, Cornelia Fritsch, Jürg Mueller, et Judith A. Kassis. 2003. « The Drosophila Pho-like Gene Encodes a YY1-Related DNA Binding Protein That Is Redundant with Pleiohomeotic in Homeotic Gene Silencing ». *Development (Cambridge, England)* 130 (2): 285-94. <https://doi.org/10.1242/dev.00204>.
- Brown, J. Lesley, Ming-An Sun, et Judith A. Kassis. 2018. « Global Changes of H3K27me3 Domains and Polycomb Group Protein Distribution in the Absence of Recruiters Spms or Pho ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (8): E1839-48. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716299115>.
- Brunet Avalos, Clarisse, G Larisa Maier, Rémy Bruggmann, et Simon G Sprecher. 2019. « Single cell transcriptome atlas of the Drosophila larval brain ». Édité par K VijayRaghavan. *eLife* 8 (novembre): e50354. <https://doi.org/10.7554/eLife.50354>.
- Brunk, B. P., E. C. Martin, et P. N. Adler. 1991. « Drosophila Genes Posterior Sex Combs and Suppressor Two of Zeste Encode Proteins with Homology to the Murine Bmi-1 Oncogene ». *Nature* 353 (6342): 351-53. <https://doi.org/10.1038/353351a0>.
- Buszczak, Michael, Shelley Paterno, et Allan C. Spradling. 2009. « Drosophila Stem Cells Share a Common Requirement for the Histone H2B Ubiquitin Protease Scrawny ». *Science (New York, N.Y.)* 323 (5911): 248-51. <https://doi.org/10.1126/science.1165678>.
- Cao, Ru, Liangjun Wang, Hengbin Wang, Li Xia, Hediye Erdjument-Bromage, Paul Tempst, Richard S. Jones, et Yi Zhang. 2002. « Role of Histone H3 Lysine 27 Methylation in Polycomb-Group Silencing ». *Science (New York, N.Y.)* 298 (5595): 1039-43. <https://doi.org/10.1126/science.1076997>.
- Cao, Ru, et Yi Zhang. 2004. « SUZ12 Is Required for Both the Histone Methyltransferase Activity and the Silencing Function of the EED-EZH2 Complex ». *Molecular Cell* 15 (1): 57-67. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.06.020>.
- Capuano, Floriana, Michael Müllleder, Robert Kok, Henk J Blom, et Markus Ralser. 2014. « Cytosine DNA Methylation Is Found in Drosophila melanogaster but Absent in Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, and Other Yeast Species ». *Analytical Chemistry* 86 (8): 3697-3702. <https://doi.org/10.1021/ac500447w>.

- Carella, Antonella, Juan R. Tejedor, María G. García, Rocío G. Urduñigo, Gustavo F. Bayón, Marta Sierra, Virginia López, et al. 2020. « Epigenetic Downregulation of TET3 Reduces Genome-Wide 5hmC Levels and Promotes Glioblastoma Tumorigenesis ». *International Journal of Cancer* 146 (2): 373-87. <https://doi.org/10.1002/ijc.32520>.
- Carlson, S. D., J. L. Juang, S. L. Hilgers, et M. B. Garment. 2000. « Blood Barriers of the Insect ». *Annual Review of Entomology* 45: 151-74. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.45.1.151>.
- Cerritelli, Susana M., Kiran Sakhujia, et Robert J. Crouch. 2022. « RNase H1, the Gold Standard for R-Loop Detection ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 2528: 91-114. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2477-7_7.
- Chan, Steven M., et Ravindra Majeti. 2013. « Role of DNMT3A, TET2, and IDH1/2 Mutations in Pre-Leukemic Stem Cells in Acute Myeloid Leukemia ». *International journal of hematology* 98 (6): 648-57. <https://doi.org/10.1007/s12185-013-1407-8>.
- Chen, Guo-Dong, Iqra Fatima, Qin Xu, Elena Rozhkova, Michael Y. Fessing, Andrei N. Mardaryev, Andrey A. Sharov, Guo-Liang Xu, et Vladimir A. Botchkarev. 2023. « DNA dioxygenases Tet2/3 regulate gene promoter accessibility and chromatin topology in lineage-specific loci to control epithelial differentiation ». *Science Advances* 9 (2): eabo7605. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abo7605>.
- Chen, Qiang, Yibin Chen, Chunjing Bian, Ryoji Fujiki, et Xiaochun Yu. 2013. « TET2 promotes histone O-GlcNAcylation during gene transcription ». *Nature* 493 (7433): 561-64. <https://doi.org/10.1038/nature11742>.
- Chen, Xin, Ang Li, Bao-Fa Sun, Ying Yang, Ya-Nan Han, Xun Yuan, Ri-Xin Chen, et al. 2019. « 5-Methylcytosine Promotes Pathogenesis of Bladder Cancer through Stabilizing mRNAs ». *Nature Cell Biology* 21 (8): 978-90. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0361-y>.
- Chetverina, Darya, Nadezhda E. Vorobyeva, Marina Yu Mazina, Lika V. Fab, Dmitry Lomaev, Alexandra Golovnina, Vladic Mogila, Pavel Georgiev, Rustam H. Ziganshin, et Maksim Erokhin. 2022. « Comparative Interactome Analysis of the PRE DNA-Binding Factors: Purification of the Combgap-, Zeste-, Psq-, and Adf1-Associated Proteins ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 79 (7): 353. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04383-2>.
- Chrysanthou, Stephanie, Qin Tang, Joun Lee, Samuel J. Taylor, Yilin Zhao, Ulrich Steidl, Deyou Zheng, et Meelad M. Dawlaty. 2022. « The DNA Dioxygenase Tet1 Regulates H3K27 Modification and Embryonic Stem Cell Biology Independent of Its Catalytic Activity ». *Nucleic Acids Research* 50 (6): 3169-89. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac089>.
- Ciabrelli, Filippo, Leily Rabbani, Francesco Cardamone, Fides Zenk, Eva Löser, Melanie A. Schächtle, Marina Mazina, Vincent Loubiere, et Nicola Iovino. 2023. « CBP and Gcn5 Drive Zygotic Genome Activation Independently of Their Catalytic Activity ». *Science Advances* 9 (16): eadf2687. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adf2687>.
- Cierpicki, Tomasz, Laurie E. Risner, Jolanta Grembecka, Stephen M. Lukasik, Relja Popovic, Monika Omonkowska, David D. Shultis, Nancy J. Zeleznik-Le, et John H. Bushweller. 2010. « Structure of the MLL CXXC Domain-DNA Complex and Its Functional Role in MLL-AF9 Leukemia ». *Nature Structural & Molecular Biology* 17 (1): 62-68. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1714>.
- Cimmino, Luisa, Meelad M. Dawlaty, Delphine Ndiaye-Lobry, Yoon Sing Yap, Sofia Bakogianni, Yiting Yu, Sanchari Bhattacharyya, et al. 2015. « Tet1 is a tumor

- suppressor of hematopoietic malignancy ». *Nature immunology* 16 (6): 653-62. <https://doi.org/10.1038/ni.3148>.
- Cohen, Idan, Dejian Zhao, Carmit Bar, Victor J. Valdes, Katherine L. Dauber-Decker, Minh Binh Nguyen, Manabu Nakayama, et al. 2018. « PRC1 Fine-Tunes Gene Repression and Activation to Safeguard Skin Development and Stem Cell Specification ». *Cell Stem Cell* 22 (5): 726-739.e7. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.04.005>.
- Cohen, Idan, Dejian Zhao, Gopinathan Menon, Manabu Nakayama, Haruhiko Koseki, Deyou Zheng, et Elena Ezhkova. 2019. « PRC1 Preserves Epidermal Tissue Integrity Independently of PRC2 ». *Genes & Development* 33 (1-2): 55-60. <https://doi.org/10.1101/gad.319939.118>.
- Cosgrove, Michael S. 2012. « Writers and Readers: Deconvoluting the Harmonic Complexity of the Histone Code ». *Nature Structural & Molecular Biology* 19 (8): 739-40. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2350>.
- Costa-Nunes, José A. da, et Daan Noordermeer. 2023. « TADs: Dynamic structures to create stable regulatory functions ». *Current Opinion in Structural Biology* 81 (août): 102622. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2023.102622>.
- Crane, Emily, Qian Bian, Rachel Patton McCord, Bryan R. Lajoie, Bayly S. Wheeler, Edward J. Ralston, Satoru Uzawa, Job Dekker, et Barbara J. Meyer. 2015. « Condensin-Driven Remodelling of X Chromosome Topology during Dosage Compensation ». *Nature* 523 (7559): 240-44. <https://doi.org/10.1038/nature14450>.
- Creppe, Catherine, Anna Palau, Roberto Malinverni, Vanesa Valero, et Marcus Buschbeck. 2014. « A Cbx8-Containing Polycomb Complex Facilitates the Transition to Gene Activation during ES Cell Differentiation ». *PLoS Genetics* 10 (12): e1004851. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004851>.
- Crews, Stephen T. 2010. « Axon-glia interactions at the drosophila CNS midline ». *Cell Adhesion & Migration* 4 (1): 67-71.
- Crews, Stephen T. 2019. « Drosophila Embryonic CNS Development: Neurogenesis, Gliogenesis, Cell Fate, and Differentiation ». *Genetics* 213 (4): 1111-44. <https://doi.org/10.1534/genetics.119.300974>.
- Dai, Hai-Qiang, Bang-An Wang, Lu Yang, Jia-Jia Chen, Guo-Chun Zhu, Mei-Ling Sun, Hao Ge, et al. 2016. « TET-Mediated DNA Demethylation Controls Gastrulation by Regulating Lefty-Nodal Signalling ». *Nature* 538 (7626): 528-32. <https://doi.org/10.1038/nature20095>.
- Dawlaty, Meelad M., Achim Breiling, Thuc Le, M. Inmaculada Barrasa, Günter Raddatz, Qing Gao, Benjamin E. Powell, et al. 2014. « Loss of Tet Enzymes Compromises Proper Differentiation of Embryonic Stem Cells ». *Developmental Cell* 29 (1): 102-11. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.03.003>.
- Dawlaty, Meelad M., Achim Breiling, Thuc Le, Günter Raddatz, M. Inmaculada Barrasa, Albert W. Cheng, Qing Gao, et al. 2013. « Combined Deficiency of Tet1 and Tet2 Causes Epigenetic Abnormalities but Is Compatible with Postnatal Development ». *Developmental Cell* 24 (3): 310-23. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.12.015>.
- Deaton, Aimée M., et Adrian Bird. 2011. « CpG islands and the regulation of transcription ». *Genes & Development* 25 (10): 1010-22. <https://doi.org/10.1101/gad.2037511>.
- Debo, Brian M., Benjamin J. Mallory, et Andrew B. Stergachis. 2023. « Evaluation of N 6-Methyldeoxyadenosine Antibody-Based Genomic Profiling in Eukaryotes ». *Genome Research* 33 (3): 427-34. <https://doi.org/10.1101/gr.276696.122>.

- Delatte, Benjamin, Fei Wang, Long Vo Ngoc, Evelyne Collignon, Elise Bonvin, Rachel Deplus, Emilie Calonne, et al. 2016. « Transcriptome-Wide Distribution and Function of RNA Hydroxymethylcytosine ». *Science (New York, N.Y.)* 351 (6270): 282-85. <https://doi.org/10.1126/science.aac5253>.
- DeNizio, Jamie E., Monica Yun Liu, Emmett M. Leddin, G. Andrés Cisneros, et Rahul M. Kohli. 2019. « Selectivity and Promiscuity in TET-Mediated Oxidation of 5-Methylcytosine in DNA and RNA ». *Biochemistry* 58 (5): 411-21. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00912>.
- Deshmukh, Saniya, VK Chaithanya Ponnaluri, Nan Dai, Sriharsa Pradhan, et Deepti Deobagkar. 2018. « Levels of DNA cytosine methylation in the Drosophila genome ». *PeerJ* 6 (juillet): e5119. <https://doi.org/10.7717/peerj.5119>.
- Dickson, Barry J., et Giorgio F. Gilestro. 2006. « Regulation of Commissural Axon Pathfinding by Slit and Its Robo Receptors ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 22: 651-75. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.090704.151234>.
- Dillon, Noah, Ben Cocanougher, Chhavi Sood, Xin Yuan, Andrea B. Kohn, Leonid L. Moroz, Sarah E. Siegrist, Marta Zlatic, et Chris Q. Doe. 2022. « Single Cell RNA-Seq Analysis Reveals Temporally-Regulated and Quiescence-Regulated Gene Expression in Drosophila Larval Neuroblasts ». *Neural Development* 17 (1): 7. <https://doi.org/10.1186/s13064-022-00163-7>.
- Dixon, Jesse R., Siddarth Selvaraj, Feng Yue, Audrey Kim, Yan Li, Yin Shen, Ming Hu, Jun S. Liu, et Bing Ren. 2012. « Topological Domains in Mammalian Genomes Identified by Analysis of Chromatin Interactions ». *Nature* 485 (7398): 376-80. <https://doi.org/10.1038/nature11082>.
- Doe, C. Q. 1992. « Molecular Markers for Identified Neuroblasts and Ganglion Mother Cells in the Drosophila Central Nervous System ». *Development (Cambridge, England)* 116 (4): 855-63. <https://doi.org/10.1242/dev.116.4.855>.
- Dominissini, Dan, Sharon Moshitch-Moshkovitz, Schraga Schwartz, Mali Salmon-Divon, Lior Ungar, Sivan Osenberg, Karen Cesarkas, et al. 2012. « Topology of the Human and Mouse m6A RNA Methylomes Revealed by m6A-Seq ». *Nature* 485 (7397): 201-6. <https://doi.org/10.1038/nature11112>.
- Douvlataniotis, Karolos, Maike Bensberg, Antonio Lentini, Björn Gylemo, et Colm E. Nestor. 2020. « No evidence for DNA N6-methyladenine in mammals ». *Science Advances* 6 (12): eaay3335. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aay3335>.
- Dumstrei, Karin, Fay Wang, et Volker Hartenstein. 2003. « Role of DE-Cadherin in Neuroblast Proliferation, Neural Morphogenesis, and Axon Tract Formation in Drosophila Larval Brain Development ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 23 (8): 3325-35. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-08-03325.2003>.
- Dunn, D. B., et J. D. Smith. 1958. « The Occurrence of 6-Methylaminopurine in Deoxyribonucleic Acids ». *The Biochemical Journal* 68 (4): 627-36. <https://doi.org/10.1042/bj0680627>.
- Dunwell, Thomas L., Liam J. McGuffin, Jim M. Dunwell, et Gerd P. Pfeifer. 2013. « The Mysterious Presence of a 5-Methylcytosine Oxidase in the Drosophila Genome: Possible Explanations ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 12 (21): 3357-65. <https://doi.org/10.4161/cc.26540>.
- Eagen, Kyle P., Erez Lieberman Aiden, et Roger D. Kornberg. 2017. « Polycomb-Mediated Chromatin Loops Revealed by a Subkilobase-Resolution Chromatin Interaction

- Map ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (33): 8764-69. <https://doi.org/10.1073/pnas.1701291114>.
- Edupuganti, Raghu R., Simon Geiger, Rik G. H. Lindeboom, Hailing Shi, Phillip J. Hsu, Zhike Lu, Shuang-Yin Wang, et al. 2017. « N6-Methyladenosine (m6A) Recruits and Repels Proteins to Regulate mRNA Homeostasis ». *Nature Structural & Molecular Biology* 24 (10): 870-78. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3462>.
- Endoh, Mitsuhiro, Takaho A. Endo, Tamie Endoh, Yu-ichi Fujimura, Osamu Ohara, Tetsuro Toyoda, Arie P. Otte, et al. 2008. « Polycomb Group Proteins Ring1A/B Are Functionally Linked to the Core Transcriptional Regulatory Circuitry to Maintain ES Cell Identity ». *Development (Cambridge, England)* 135 (8): 1513-24. <https://doi.org/10.1242/dev.014340>.
- Engelhardt, Jan, Oliver Scheer, Peter F. Stadler, et Sonja J. Prohaska. 2022. « Evolution of DNA Methylation Across Ecdysozoa ». *Journal of Molecular Evolution* 90 (1): 56-72. <https://doi.org/10.1007/s00239-021-10042-0>.
- Erceg, Jelena, Tibor Pakozdi, Raquel Marco-Ferrerres, Yad Ghavi-Helm, Charles Girardot, Adrian P. Bracken, et Eileen E. M. Furlong. 2017. « Dual Functionality of Cis-Regulatory Elements as Developmental Enhancers and Polycomb Response Elements ». *Genes & Development* 31 (6): 590-602. <https://doi.org/10.1101/gad.292870.116>.
- Erokhin, Maksim, Pavel Georgiev, et Darya Chetverina. 2018. « Drosophila DNA-Binding Proteins in Polycomb Repression ». *Epigenomes* 2 (1): 1. <https://doi.org/10.3390/epigenomes2010001>.
- Estes, Patricia, Eric Fulkerson, et Yi Zhang. 2008. « Identification of Motifs That Are Conserved in 12 Drosophila Species and Regulate Midline Glia vs. Neuron Expression ». *Genetics* 178 (2): 787-99. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.080440>.
- Fasolino, Maria, et Zhaolan Zhou. 2017. « The Crucial Role of DNA Methylation and MeCP2 in Neuronal Function ». *Genes* 8 (5): 141. <https://doi.org/10.3390/genes8050141>.
- Feng, Suhua, Shawn J. Cokus, Xiaoyu Zhang, Pao-Yang Chen, Magnolia Bostick, Mary G. Goll, Jonathan Hetzel, et al. 2010. « Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (19): 8689-94. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002720107>.
- Feng, Yimei, Xiaoping Li, Kaniel Cassady, Zhongmin Zou, et Xi Zhang. 2019. « TET2 Function in Hematopoietic Malignancies, Immune Regulation, and DNA Repair ». *Frontiers in Oncology* 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2019.00210>.
- Flores, Julio C., Kyoko Ito, Cheng-Yen Huang, Qin Tang, Chie Yanase, Keisuke Ito, et Meelad M. Dawlaty. 2023. « Comparative Analysis of Tet2 Catalytic-Deficient and Knockout Bone Marrow over Time ». *Experimental Hematology* 124 (août): 45-55.e2. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2023.05.004>.
- Flusberg, Benjamin A., Dale Webster, Jessa Lee, Kevin Travers, Eric Olivares, Tyson A. Clark, Jonas Korlach, et Stephen W. Turner. 2010. « Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing ». *Nature methods* 7 (6): 461-65. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1459>.
- Francis, Nicole J., Andrew J. Saurin, Zhaohui Shao, et Robert E. Kingston. 2001. « Reconstitution of a Functional Core Polycomb Repressive Complex ». *Molecular Cell* 8 (3): 545-56. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00316-1](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00316-1).

- Freeman, Marc R. 2015. « Drosophila Central Nervous System Glia ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7 (11): a020552.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020552>.
- Freeman, Marc R., Jeffrey Delrow, Junhyong Kim, Eric Johnson, et Chris Q. Doe. 2003. « Unwrapping Glial Biology: Gcm Target Genes Regulating Glial Development, Diversification, and Function ». *Neuron* 38 (4): 567-80.
[https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00289-7](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00289-7).
- Frey, Felice, Jawdat Sandakly, Mirna Ghannam, Caren Doueiry, Fredrik Hugosson, Johannes Berlandi, Joy N. Ismail, et al. 2022. « Drosophila Tet Is Required for Maintaining Glial Homeostasis in Developing and Adult Fly Brains ». *eNeuro* 9 (2): ENEURO.0418-21.2022. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0418-21.2022>.
- Fritsch, Cornelia, Dirk Beuchle, et Jürg Müller. 2003. « Molecular and Genetic Analysis of the Polycomb Group Gene Sex Combs Extra/Ring in Drosophila ». *Mechanisms of Development* 120 (8): 949-54. [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(03\)00083-2](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(03)00083-2).
- Frye, Michaela, et Fiona M. Watt. 2006. « The RNA Methyltransferase Misu (NSun2) Mediates Myc-Induced Proliferation and Is Upregulated in Tumors ». *Current Biology: CB* 16 (10): 971-81. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.04.027>.
- Fu, Lijuan, Candace R. Guerrero, Na Zhong, Nicholas J. Amato, Yunhua Liu, Shuo Liu, Qian Cai, et al. 2014. « Tet-Mediated Formation of 5-Hydroxymethylcytosine in RNA ». *Journal of the American Chemical Society* 136 (33): 11582-85.
<https://doi.org/10.1021/ja505305z>.
- Fu, Ye, Guan-Zheng Luo, Kai Chen, Xin Deng, Miao Yu, Dali Han, Ziyang Hao, et al. 2015. « N6-Methyldeoxyadenosine Marks Active Transcription Start Sites in Chlamydomonas ». *Cell* 161 (4): 879-92. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.010>.
- Gallio, Marco, Camilla Englund, Per Kylsten, et Christos Samakovlis. 2004. « Rhomboid 3 orchestrates Slit-independent repulsion of tracheal branches at the CNS midline ». *Development* 131 (15): 3605-14. <https://doi.org/10.1242/dev.01242>.
- Gao, Zhonghua, Pedro Lee, James M. Stafford, Melanie von Schimmelmann, Anne Schaefer, et Danny Reinberg. 2014. « An AUTS2-Polycomb Complex Activates Gene Expression in the CNS ». *Nature* 516 (7531): 349-54. <https://doi.org/10.1038/nature13921>.
- Gao, Zhonghua, Jin Zhang, Roberto Bonasio, Francesco Strino, Ayana Sawai, Fabio Parisi, Yuval Kluger, et Danny Reinberg. 2012. « PCGF Homologs, CBX Proteins, and RYBP Define Functionally Distinct PRC1 Family Complexes ». *Molecular Cell* 45 (3): 344-56.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.01.002>.
- Garbe, David S., et Greg J. Bashaw. 2004. « Axon Guidance at the Midline: From Mutants to Mechanisms ». *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 39 (5-6): 319-41. <https://doi.org/10.1080/10409230490906797>.
- Gates, Leah A., Jiejun Shi, Aarti D. Rohira, Qin Feng, Bokai Zhu, Mark T. Bedford, Cari A. Sagum, et al. 2017. « Acetylation on histone H3 lysine 9 mediates a switch from transcription initiation to elongation ». *The Journal of Biological Chemistry* 292 (35): 14456-72. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.802074>.
- Gaytán de Ayala Alonso, Andrés, Luis Gutiérrez, Cornelia Fritsch, Bernadett Papp, Dirk Beuchle, et Jürg Müller. 2007. « A Genetic Screen Identifies Novel Polycomb Group Genes in Drosophila ». *Genetics* 176 (4): 2099-2108.
<https://doi.org/10.1534/genetics.107.075739>.
- Gearhart, Micah D., Connie M. Corcoran, Joseph A. Wamstad, et Vivian J. Bardwell. 2006. « Polycomb Group and SCF Ubiquitin Ligases Are Found in a Novel BCOR Complex

- That Is Recruited to BCL6 Targets ». *Molecular and Cellular Biology* 26 (18): 6880-89. <https://doi.org/10.1128/MCB.00630-06>.
- Gehani, Simmi Suman, Shuchi Agrawal-Singh, Nikolaj Dietrich, Nicolaj Strøyer Christophersen, Kristian Helin, et Klaus Hansen. 2010. « Polycomb Group Protein Displacement and Gene Activation through MSK-Dependent H3K27me3S28 Phosphorylation ». *Molecular Cell* 39 (6): 886-900. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.08.020>.
- Gilbert, Wendy V., et Sigrid Nachtergaele. 2023. « mRNA Regulation by RNA Modifications ». *Annual Review of Biochemistry* 92 (juin): 175-98. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-052521-035949>.
- Giner-Laguarda, Natalia, et Miguel Vidal. 2020. « Functions of Polycomb Proteins on Active Targets ». *Epigenomes* 4 (3): 17. <https://doi.org/10.3390/epigenomes4030017>.
- Goll, Mary Grace, Finn Kirpekar, Keith A. Maggert, Jeffrey A. Yoder, Chih-Lin Hsieh, Xiaoyu Zhang, Kent G. Golic, Steven E. Jacobsen, et Timothy H. Bestor. 2006. « Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA Methyltransferase Homolog Dnmt2 ». *Science (New York, N.Y.)* 311 (5759): 395-98. <https://doi.org/10.1126/science.1120976>.
- Goodrich, J. A., G. Cutler, et R. Tjian. 1996. « Contacts in Context: Promoter Specificity and Macromolecular Interactions in Transcription ». *Cell* 84 (6): 825-30. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81061-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81061-2).
- Gopalakrishnan, Suhasni, Beth A. Sullivan, Stefania Trazzi, Giuliano Della Valle, et Keith D. Robertson. 2009. « DNMT3B interacts with constitutive centromere protein CENP-C to modulate DNA methylation and the histone code at centromeric regions ». *Human Molecular Genetics* 18 (17): 3178-93. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp256>.
- Gowher, Humaira, et Albert Jeltsch. 2018. « Mammalian DNA Methyltransferases: New Discoveries and Open Questions ». *Biochemical Society Transactions* 46 (5): 1191-1202. <https://doi.org/10.1042/BST20170574>.
- Greer, Eric Lieberman, Mario Andres Blanco, Lei Gu, Erdem Sendinc, Jianzhao Liu, David Aristizábal-Corrales, Chih-Hung Hsu, L. Aravind, Chuan He, et Yang Shi. 2015. « DNA Methylation on N6-Adenine in *C. Elegans* ». *Cell* 161 (4): 868-78. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.005>.
- Grewal, Shiv I. S. 2023. « The Molecular Basis of Heterochromatin Assembly and Epigenetic Inheritance ». *Molecular Cell* 83 (11): 1767-85. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.04.020>.
- Grimaud, Charlotte, Nicolas Nègre, et Giacomo Cavalli. 2006. « From Genetics to Epigenetics: The Tale of Polycomb Group and Trithorax Group Genes ». *Chromosome Research* 14 (4): 363-75. <https://doi.org/10.1007/s10577-006-1069-y>.
- Gu, Tian-Peng, Fan Guo, Hui Yang, Hai-Ping Wu, Gui-Fang Xu, Wei Liu, Zhi-Guo Xie, et al. 2011. « The Role of Tet3 DNA Dioxygenase in Epigenetic Reprogramming by Oocytes ». *Nature* 477 (7366): 606-10. <https://doi.org/10.1038/nature10443>.
- Guccione, Ernesto, Christian Bassi, Fabio Casadio, Francesca Martinato, Matteo Cesaroni, Henning Schuchlantz, Bernhard Lüscher, et Bruno Amati. 2007. « Methylation of Histone H3R2 by PRMT6 and H3K4 by an MLL Complex Are Mutually Exclusive ». *Nature* 449 (7164): 933-37. <https://doi.org/10.1038/nature06166>.
- Guilhamon, Paul, Malihe Eskandarpour, Dina Halai, Gareth A. Wilson, Andrew Feber, Andrew E. Teschendorff, Valenti Gomez, et al. 2013. « Meta-Analysis of IDH-Mutant Cancers Identifies EBF1 as an Interaction Partner for TET2 ». *Nature Communications* 4: 2166. <https://doi.org/10.1038/ncomms3166>.

- Gutiérrez, Luis, Katarzyna Oktaba, Johanna C. Scheuermann, Maria Cristina Gambetta, Nga Ly-Hartig, et Jürg Müller. 2012. « The Role of the Histone H2A Ubiquitinase Sce in Polycomb Repression ». *Development (Cambridge, England)* 139 (1): 117-27. <https://doi.org/10.1242/dev.074450>.
- Gutierrez-Perez, Irene, M. Jordan Rowley, Xiaowen Lyu, Viviana Valadez-Graham, Diana M. Vallejo, Esther Ballesta-Illan, Jose P. Lopez-Atalaya, et al. 2019. « Ecdysone-Induced 3D Chromatin Reorganization Involves Active Enhancers Bound by Pipsqueak and Polycomb ». *Cell Reports* 28 (10): 2715-2727.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.07.096>.
- Hajirnis, Nikhil, et Rakesh K. Mishra. 2021. « Homeotic Genes: Clustering, Modularity, and Diversity ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9 (août): 718308. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.718308>.
- Hao, Ziyang, Tong Wu, Xiaolong Cui, Pingping Zhu, Caiping Tan, Xiaoyang Dou, Kai-Wen Hsu, et al. 2020. « N6-Deoxyadenosine Methylation in Mammalian Mitochondrial DNA ». *Molecular Cell* 78 (3): 382-395.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.02.018>.
- Hartenstein, Volker. 2011. « Morphological Diversity and Development of Glia in *Drosophila* ». *Glia* 59 (9): 1237-52. <https://doi.org/10.1002/glia.21162>.
- Hashimoto, Hideharu, Dongxue Wang, John R. Horton, Xing Zhang, Victor G. Corces, et Xiaodong Cheng. 2017. « Structural basis for the versatile and methylation-dependent binding of CTCF to DNA ». *Molecular cell* 66 (5): 711-720.e3. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.004>.
- Hauri, Simon, Federico Comoglio, Makiko Seimiya, Moritz Gerstung, Timo Glatter, Klaus Hansen, Ruedi Aebersold, Renato Paro, Matthias Gstaiger, et Christian Beisel. 2016. « A High-Density Map for Navigating the Human Polycomb Complexome ». *Cell Reports* 17 (2): 583-95. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.096>.
- He, Chongsheng, Julianna Bozler, Kevin A. Janssen, Jeremy E. Wilusz, Benjamin A. Garcia, Andrea J. Schorn, et Roberto Bonasio. 2021. « TET2 Chemically Modifies tRNAs and Regulates tRNA Fragment Levels ». *Nature Structural & Molecular Biology* 28 (1): 62-70. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-00526-w>.
- He, Shunmin, Guoqiang Zhang, Jiajia Wang, Yajie Gao, Ruidi Sun, Zhijie Cao, Zhenping Chen, et al. 2019. « 6mA-DNA-Binding Factor Jumu Controls Maternal-to-Zygotic Transition Upstream of *Zelda* ». *Nature Communications* 10 (1): 2219. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10202-3>.
- He, Yu-Fei, Bin-Zhong Li, Zheng Li, Peng Liu, Yang Wang, Qingyu Tang, Jianping Ding, et al. 2011. « Tet-Mediated Formation of 5-Carboxylcytosine and Its Excision by TDG in Mammalian DNA ». *Science (New York, N.Y.)* 333 (6047): 1303-7. <https://doi.org/10.1126/science.1210944>.
- Heintzman, Nathaniel D., et Bing Ren. 2009. « Finding Distal Regulatory Elements in the Human Genome ». *Current Opinion in Genetics & Development* 19 (6): 541-49. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.09.006>.
- Heintzman, Nathaniel D., Rhona K. Stuart, Gary Hon, Yutao Fu, Christina W. Ching, R. David Hawkins, Leah O. Barrera, et al. 2007. « Distinct and Predictive Chromatin Signatures of Transcriptional Promoters and Enhancers in the Human Genome ». *Nature Genetics* 39 (3): 311-18. <https://doi.org/10.1038/ng1966>.
- Hewes, Randall S., Dongkook Park, Sebastien A. Gauthier, Anneliese M. Schaefer, et Paul H. Taghert. 2003. « The bHLH Protein Dimmed Controls Neuroendocrine Cell

- Differentiation in *Drosophila* ». *Development (Cambridge, England)* 130 (9): 1771-81. <https://doi.org/10.1242/dev.00404>.
- Hirota, Toru, Jesse J. Lipp, Ban-Hock Toh, et Jan-Michael Peters. 2005. « Histone H3 Serine 10 Phosphorylation by Aurora B Causes HP1 Dissociation from Heterochromatin ». *Nature* 438 (7071): 1176-80. <https://doi.org/10.1038/nature04254>.
- Hodges, Amelia J., Nicholas O. Hudson, et Bethany A. Buck-Koehntop. 2020. « Cys2His2 Zinc Finger Methyl-CpG Binding Proteins: Getting a Handle on Methylated DNA ». *Journal of Molecular Biology, Reading DNA Modifications*, 432 (6): 1640-60. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.09.012>.
- Hodgson, J. W., B. Argiropoulos, et H. W. Brock. 2001. « Site-Specific Recognition of a 70-Base-Pair Element Containing d(GA)(n) Repeats Mediates Bithoraxoid Polycomb Group Response Element-Dependent Silencing ». *Molecular and Cellular Biology* 21 (14): 4528-43. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.14.4528-4543.2001>.
- Holoch, Daniel, Michel Wassef, Cecilia Lövkvist, Dina Zielinski, Setareh Aflaki, Bérangère Lombard, Tiphaine Héry, Damaris Loew, Martin Howard, et Raphaël Margueron. 2021. « A Cis-Acting Mechanism Mediates Transcriptional Memory at Polycomb Target Genes in Mammals ». *Nature Genetics* 53 (12): 1686-97. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00964-2>.
- Homem, Catarina C. F., Marko Repic, et Jürgen A. Knoblich. 2015. « Proliferation Control in Neural Stem and Progenitor Cells ». *Nature Reviews. Neuroscience* 16 (11): 647-59. <https://doi.org/10.1038/nrn4021>.
- Hon, Gary C., Chun-Xiao Song, Tingting Du, Fulai Jin, Siddarth Selvaraj, Ah Young Lee, Chia-An Yen, et al. 2014. « 5mC Oxidation by Tet2 Modulates Enhancer Activity and Timing of Transcriptome Reprogramming during Differentiation ». *Molecular Cell* 56 (2): 286-97. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.08.026>.
- Hosoya, T., K. Takizawa, K. Nitta, et Y. Hotta. 1995. « Glial Cells Missing: A Binary Switch between Neuronal and Glial Determination in *Drosophila* ». *Cell* 82 (6): 1025-36. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90281-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90281-3).
- Hotchkiss, R. D. 1948. « The Quantitative Separation of Purines, Pyrimidines, and Nucleosides by Paper Chromatography ». *The Journal of Biological Chemistry* 175 (1): 315-32.
- Hu, Lulu, Ze Li, Jingdong Cheng, Qinhui Rao, Wei Gong, Mengjie Liu, Yujiang Geno Shi, Jiayu Zhu, Ping Wang, et Yanhui Xu. 2013. « Crystal Structure of TET2-DNA Complex: Insight into TET-Mediated 5mC Oxidation ». *Cell* 155 (7): 1545-55. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.020>.
- Huang, Wei, Jun Xiong, Ying Yang, Song-Mei Liu, Bi-Feng Yuan, et Yu-Qi Feng. 2015. « Determination of DNA Adenine Methylation in Genomes of Mammals and Plants by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry ». *RSC Advances* 5 (79): 64046-54. <https://doi.org/10.1039/C5RA05307B>.
- Huber, Sabrina M., Pieter van Delft, Lee Mendil, Martin Bachman, Katherine Smollett, Finn Werner, Eric A. Miska, et Shankar Balasubramanian. 2015. « Formation and Abundance of 5-Hydroxymethylcytosine in RNA ». *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology* 16 (5): 752-55. <https://doi.org/10.1002/cbic.201500013>.
- Ismail, Joy N., Shireen Badini, Felice Frey, Wassim Abou-Kheir, et Margret Shirinian. 2019. « *Drosophila* Tet Is Expressed in Midline Glia and Is Required for Proper Axonal Development ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 13 (juin): 252. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00252>.

- Ismail, Joy N., Mirna Ghannam, Amani Al Outa, Felice Frey, et Margret Shirinian. 2020. « Ten-Eleven Translocation Proteins and Their Role beyond DNA Demethylation - What We Can Learn from the Fly ». *Epigenetics* 15 (11): 1139-50.
<https://doi.org/10.1080/15592294.2020.1767323>.
- Isshiki, Takako, Bret Pearson, Scott Holbrook, et Chris Q. Doe. 2001. « Drosophila Neuroblasts Sequentially Express Transcription Factors which Specify the Temporal Identity of Their Neuronal Progeny ». *Cell* 106 (4): 511-21.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00465-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00465-2).
- Ito, Kyoko, Joun Lee, Stephanie Chrysanthou, Yilin Zhao, Katherine Josephs, Hiroyo Sato, Julie Teruya-Feldstein, Deyou Zheng, Meelad M. Dawlaty, et Keisuke Ito. 2019. « Non-Catalytic Roles of Tet2 Are Essential to Regulate Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Homeostasis ». *Cell Reports* 28 (10): 2480-2490.e4.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.07.094>.
- Ito, Shinsuke, Li Shen, Qing Dai, Susan C. Wu, Leonard B. Collins, James A. Swenberg, Chuan He, et Yi Zhang. 2011. « Tet Proteins Can Convert 5-Methylcytosine to 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine ». *Science (New York, N.Y.)* 333 (6047): 1300-1303. <https://doi.org/10.1126/science.1210597>.
- Iurlaro, Mario, Gabriella Ficz, David Oxley, Eun-Ang Raiber, Martin Bachman, Michael J. Booth, Simon Andrews, Shankar Balasubramanian, et Wolf Reik. 2013. « A Screen for Hydroxymethylcytosine and Formylcytosine Binding Proteins Suggests Functions in Transcription and Chromatin Regulation ». *Genome Biology* 14 (10): R119.
<https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-10-r119>.
- Jan, Max, Thomas M. Snyder, M. Ryan Corces-Zimmerman, Paresh Vyas, Irving L. Weissman, Stephen R. Quake, et Ravindra Majeti. 2012. « Clonal Evolution of Pre-Leukemic Hematopoietic Stem Cells Precedes Human Acute Myeloid Leukemia ». *Science translational medicine* 4 (149): 149ra118.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004315>.
- Jansz, Natasha. 2019. « DNA Methylation Dynamics at Transposable Elements in Mammals ». *Essays in Biochemistry* 63 (6): 677-89. <https://doi.org/10.1042/EBC20190039>.
- Jia, Baolei, Ke Tang, Byung Hee Chun, et Che Ok Jeon. 2017. « Large-scale examination of functional and sequence diversity of 2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent oxygenases in Metazoa ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1861 (11, Part A): 2922-33. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.08.019>.
- Jia, Guifang, Ye Fu, Xu Zhao, Qing Dai, Guanqun Zheng, Ying Yang, Chengqi Yi, et al. 2011. « N6-Methyladenosine in Nuclear RNA Is a Major Substrate of the Obesity-Associated FTO ». *Nature Chemical Biology* 7 (12): 885-87.
<https://doi.org/10.1038/nchembio.687>.
- Jones, B. W., R. D. Fetter, G. Tear, et C. S. Goodman. 1995. « Glial Cells Missing: A Genetic Switch That Controls Glial versus Neuronal Fate ». *Cell* 82 (6): 1013-23.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90280-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90280-5).
- Jones, P. L., G. J. Veenstra, P. A. Wade, D. Vermaak, S. U. Kass, N. Landsberger, J. Strouboulis, et A. P. Wolffe. 1998. « Methylated DNA and MeCP2 Recruit Histone Deacetylase to Repress Transcription ». *Nature Genetics* 19 (2): 187-91.
<https://doi.org/10.1038/561>.
- Jones, R. S., et W. M. Gelbart. 1990. « Genetic Analysis of the Enhancer of Zeste Locus and Its Role in Gene Regulation in *Drosophila Melanogaster* ». *Genetics* 126 (1): 185-99.
<https://doi.org/10.1093/genetics/126.1.185>.

- Joshi, Kanak, Shanhui Liu, Peter Breslin S J, et Jiwang Zhang. 2022. « Mechanisms That Regulate the Activities of TET Proteins ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 79 (7): 363. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04396-x>.
- Junco, Sarah E., Renjing Wang, John C. Gaipa, Alexander B. Taylor, Virgil Schirf, Micah D. Gearhart, Vivian J. Bardwell, Borries Demeler, P. John Hart, et Chongwoo A. Kim. 2013. « Structure of the Polycomb Group Protein PCGF1 in Complex with BCOR Reveals Basis for Binding Selectivity of PCGF Homologs ». *Structure (London, England: 1993)* 21 (4): 665-71. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.02.013>.
- Kaas, Garrett A., Chun Zhong, Dawn E. Eason, Daniel L. Ross, Raj V. Vachhani, Guo-Li Ming, Jennifer R. King, Hongjun Song, et J. David Sweatt. 2013. « TET1 Controls CNS 5-Methylcytosine Hydroxylation, Active DNA Demethylation, Gene Transcription, and Memory Formation ». *Neuron* 79 (6): 1086-93. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.08.032>.
- Kang, Jinsuk, Matthias Lienhard, William A. Pastor, Ashu Chawla, Mark Novotny, Ageliki Tsagaratou, Roger S. Lasken, et al. 2015. « Simultaneous Deletion of the Methylcytosine Oxidases Tet1 and Tet3 Increases Transcriptome Variability in Early Embryogenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (31): E4236-4245. <https://doi.org/10.1073/pnas.1510510112>.
- Kang, Kyung Hwa, et Heinrich Reichert. 2015. « Control of Neural Stem Cell Self-Renewal and Differentiation in Drosophila ». *Cell and Tissue Research* 359 (1): 33-45. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1914-9>.
- Kao, Cheng-Fu, Cory Hillyer, Toyoko Tsukuda, Karl Henry, Shelley Berger, et Mary Ann Osley. 2004. « Rad6 plays a role in transcriptional activation through ubiquitylation of histone H2B ». *Genes & Development* 18 (2): 184-95. <https://doi.org/10.1101/gad.1149604>.
- Kassis, Judith A., et J. Lesley Brown. 2013. « Polycomb Group Response Elements in Drosophila and Vertebrates ». *Advances in genetics* 81: 83-118. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407677-8.00003-8>.
- Kassis, Judith A., James A. Kennison, et John W. Tamkun. 2017. « Polycomb and Trithorax Group Genes in Drosophila ». *Genetics* 206 (4): 1699-1725. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.185116>.
- Kaushal, Anjali, Julien Dorier, Bihan Wang, Giriram Mohana, Michael Taschner, Pascal Cousin, Patrice Waridel, et al. 2022. « Essential Role of Cp190 in Physical and Regulatory Boundary Formation ». *Science Advances* 8 (19): eabl8834. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abl8834>.
- Kaushal, Anjali, Giriram Mohana, Julien Dorier, Isa Özdemir, Arina Omer, Pascal Cousin, Anastasiia Semenova, et al. 2021. « CTCF Loss Has Limited Effects on Global Genome Architecture in Drosophila despite Critical Regulatory Functions ». *Nature Communications* 12 (1): 1011. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21366-2>.
- Kim, Jongmin J., et Robert E. Kingston. 2022. « Context-Specific Polycomb Mechanisms in Development ». *Nature Reviews. Genetics* 23 (11): 680-95. <https://doi.org/10.1038/s41576-022-00499-0>.
- Kind, Jop, Juan M. Vaquerizas, Philipp Gebhardt, Marc Gentzel, Nicholas M. Luscombe, Paul Bertone, et Asifa Akhtar. 2008. « Genome-Wide Analysis Reveals MOF as a Key Regulator of Dosage Compensation and Gene Expression in Drosophila ». *Cell* 133 (5): 813-28. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.04.036>.

- Klauke, Karin, Višnja Radulović, Mathilde Broekhuis, Ellen Weersing, Erik Zwart, Sandra Olthof, Martha Ritsema, et al. 2013. « Polycomb Cbx Family Members Mediate the Balance between Haematopoietic Stem Cell Self-Renewal and Differentiation ». *Nature Cell Biology* 15 (4): 353-62. <https://doi.org/10.1038/ncb2701>.
- Klymenko, Tetyana, Bernadett Papp, Wolfgang Fischle, Thomas Köcher, Malgorzata Schelder, Cornelia Fritsch, Brigitte Wild, Matthias Wilm, et Jürg Müller. 2006. « A Polycomb Group Protein Complex with Sequence-Specific DNA-Binding and Selective Methyl-Lysine-Binding Activities ». *Genes & Development* 20 (9): 1110-22. <https://doi.org/10.1101/gad.377406>.
- Ko, Myunggon, Jungeun An, Hozefa S. Bandukwala, Lukas Chavez, Tarmo Aijö, William A. Pastor, Matthew F. Segal, et al. 2013. « Modulation of TET2 Expression and 5-Methylcytosine Oxidation by the CXXC Domain Protein IDAX ». *Nature* 497 (7447): 122-26. <https://doi.org/10.1038/nature12052>.
- Ko, Myunggon, Hozefa S. Bandukwala, Jungeun An, Edward D. Lamperti, Elizabeth C. Thompson, Ryan Hastie, Angeliki Tsangaratou, Klaus Rajewsky, Sergei B. Koralov, et Anjana Rao. 2011. « Ten-Eleven-Translocation 2 (TET2) Negatively Regulates Homeostasis and Differentiation of Hematopoietic Stem Cells in Mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (35): 14566-71. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112317108>.
- Kolovos, Petros, Tobias A. Knoch, Frank G. Grosveld, Peter R. Cook, et Argyris Papantonis. 2012. « Enhancers and silencers: an integrated and simple model for their function ». *Epigenetics & Chromatin* 5 (1): 1. <https://doi.org/10.1186/1756-8935-5-1>.
- Kondo, Takashi, Shinsuke Ito, et Haruhiko Koseki. 2016. « Polycomb in Transcriptional Phase Transition of Developmental Genes ». *Trends in Biochemical Sciences* 41 (1): 9-19. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.11.005>.
- Kong, Yimeng, Lei Cao, Gintaras Deikus, Yu Fan, Edward A. Mead, Weiyi Lai, Yizhou Zhang, et al. 2022. « Critical Assessment of DNA Adenine Methylation in Eukaryotes Using Quantitative Deconvolution ». *Science (New York, N.Y.)* 375 (6580): 515-22. <https://doi.org/10.1126/science.abe7489>.
- Kriaucionis, Skirmantas, et Nathaniel Heintz. 2009. « The nuclear DNA base, 5-hydroxymethylcytosine is present in brain and enriched in Purkinje neurons ». *Science (New York, N.y.)* 324 (5929): 929-30. <https://doi.org/10.1126/science.1169786>.
- Kuroda, Mitzi I., Hyuckjoon Kang, Sandip De, et Judith A. Kassiss. 2020. « Dynamic Competition of Polycomb and Trithorax in Transcriptional Programming ». *Annual Review of Biochemistry* 89 (juin): 235-53. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-120219-103641>.
- Kurzahls, Rebeccah L., Feng Tie, Carl A. Stratton, et Peter J. Harte. 2008. « Drosophila ESC-like Can Substitute for ESC and Becomes Required for Polycomb Silencing If ESC Is Absent ». *Developmental Biology* 313 (1): 293-306. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.10.025>.
- Kweon, Soo-Mi, Yibu Chen, Eugene Moon, Kotryna Kvederaviciute, Saulius Klimasauskas, et Douglas E. Feldman. 2019. « An Adversarial DNA N6-Methyladenine-Sensor Network Preserves Polycomb Silencing ». *Molecular Cell* 74 (6): 1138-1147.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.03.018>.
- Lagarou, Anna, Adone Mohd-Sarip, Yuri M. Moshkin, Gillian E. Chalkley, Karel Bezstarosti, Jeroen A.A. Demmers, et C. Peter Verrijzer. 2008. « dKDM2 couples histone H2A

- ubiquitylation to histone H3 demethylation during Polycomb group silencing ». *Genes & Development* 22 (20): 2799-2810. <https://doi.org/10.1101/gad.484208>.
- Lan, Jie, Nicholas Rajan, Martin Bizet, Audrey Penning, Nitesh K. Singh, Diana Guallar, Emilie Calonne, et al. 2020. « Functional Role of Tet-Mediated RNA Hydroxymethylcytosine in Mouse ES Cells and during Differentiation ». *Nature Communications* 11 (1): 4956. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18729-6>.
- Layden, Michael J., Joanne P. Odden, Aloisia Schmid, Alain Garces, Stefan Thor, et Chris Q. Doe. 2006. « Zfh1, a Somatic Motor Neuron Transcription Factor, Regulates Axon Exit from the CNS ». *Developmental Biology* 291 (2): 253-63. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.12.009>.
- Le, Thuc, Kee-Pyo Kim, Guoping Fan, et Kym F. Faull. 2011. « A sensitive mass-spectrometry method for simultaneous quantification of DNA methylation and hydroxymethylation levels in biological samples ». *Analytical biochemistry* 412 (2): 203-9. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.01.026>.
- Lee, William, Sewit Teckie, Thomas Wiesner, Leili Ran, Carlos N. Prieto Granada, Mingyan Lin, Sinan Zhu, et al. 2014. « PRC2 Is Recurrently Inactivated through EED or SUZ12 Loss in Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors ». *Nature Genetics* 46 (11): 1227-32. <https://doi.org/10.1038/ng.3095>.
- Legrand, Carine, Francesca Tuorto, Mark Hartmann, Reinhard Liebers, Dominik Jacob, Mark Helm, et Frank Lyko. 2017. « Statistically robust methylation calling for whole-transcriptome bisulfite sequencing reveals distinct methylation patterns for mouse RNAs ». *Genome Research* 27 (9): 1589-96. <https://doi.org/10.1101/gr.210666.116>.
- Lewis, E. B. 1978. « A Gene Complex Controlling Segmentation in Drosophila ». *Nature* 276 (5688): 565-70. <https://doi.org/10.1038/276565a0>.
- Lewis, R. A., B. T. Wakimoto, R. E. Denell, et T. C. Kaufman. 1980. « Genetic Analysis of the Antennapedia Gene Complex (Ant-C) and Adjacent Chromosomal Regions of DROSOPHILA MELANOGASTER. II. Polytene Chromosome Segments 84A-84B1,2 ». *Genetics* 95 (2): 383-97. <https://doi.org/10.1093/genetics/95.2.383>.
- Li, En, et Yi Zhang. 2014. « DNA Methylation in Mammals ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6 (5): a019133. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019133>.
- Li, Jiaojiao, Chunxiao Sun, Wenwen Cai, Jing Li, Barry P. Rosen, et Jian Chen. 2021. « Insights into S-Adenosyl-L-Methionine (SAM)-Dependent Methyltransferase Related Diseases and Genetic Polymorphisms ». *Mutation Research. Reviews in Mutation Research* 788: 108396. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2021.108396>.
- Li, Shizhao, et Trygve O. Tollefsbol. 2021. « DNA methylation methods: global DNA methylation and methylomic analyses. » *Methods (San Diego, Calif.)* 187 (mars): 28-43. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2020.10.002>.
- Li, Ting, Dehua Yang, Jia Li, Yu Tang, Juan Yang, et Weidong Le. 2015. « Critical Role of Tet3 in Neural Progenitor Cell Maintenance and Terminal Differentiation ». *Molecular Neurobiology* 51 (1): 142-54. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8734-5>.
- Li, Xiang, Xiaojing Yue, William A. Pastor, Lizhu Lin, Romain Georges, Lukas Chavez, Sylvia M. Evans, et Anjana Rao. 2016. « Tet Proteins Influence the Balance between Neuroectodermal and Mesodermal Fate Choice by Inhibiting Wnt Signaling ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (51): E8267-76. <https://doi.org/10.1073/pnas.1617802113>.
- Li, Xuekun, Bing Yao, Li Chen, Yunhee Kang, Yujing Li, Ying Cheng, Liping Li, et al. 2017. « Ten-Eleven Translocation 2 Interacts with Forkhead Box O3 and Regulates Adult

- Neurogenesis ». *Nature Communications* 8 (juin): 15903.
<https://doi.org/10.1038/ncomms15903>.
- Li, Xuwen, Shiyuan Guo, Yan Cui, Zijian Zhang, Xinlong Luo, Margarita T. Angelova, Laura F. Landweber, Yinsheng Wang, et Tao P. Wu. 2022. « NT-Seq: A Chemical-Based Sequencing Method for Genomic Methylome Profiling ». *Genome Biology* 23 (1): 122.
<https://doi.org/10.1186/s13059-022-02689-9>.
- Li, Zheng, Shuai Zhao, Raman V. Nelakanti, Kaixuan Lin, Tao P. Wu, Myles H. Alderman, Cheng Guo, et al. 2020. « N(6)-methyladenine in DNA antagonizes SATB1 in early development ». *Nature* 583 (7817): 625-30. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2500-9>.
- Liang, Zhe, Lisha Shen, Xuean Cui, Shengjie Bao, Yuke Geng, Guoliang Yu, Fan Liang, et al. 2018. « DNA N6-Adenine Methylation in Arabidopsis Thaliana ». *Developmental Cell* 45 (3): 406-416.e3. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.03.012>.
- Lio, Chan-Wang J., Xiaojing Yue, Isaac F. Lopez-Moyado, Mamta Tahiliani, L. Aravind, et Anjana Rao. 2020. « TET Methylcytosine Oxidases: New Insights from a Decade of Research ». *Journal of Biosciences* 45: 21.
- Lister, Ryan, Eran A. Mukamel, Joseph R. Nery, Mark Urich, Clare A. Puddifoot, Nicholas D. Johnson, Jacinta Lucero, et al. 2013. « Global Epigenomic Reconfiguration during Mammalian Brain Development ». *Science (New York, N.Y.)* 341 (6146): 1237905.
<https://doi.org/10.1126/science.1237905>.
- Liu, Jianzhao, Yanan Yue, Dali Han, Xiao Wang, Ye Fu, Liang Zhang, Guifang Jia, et al. 2014. « A METTL3-METTL14 Complex Mediates Mammalian Nuclear RNA N6-Adenosine Methylation ». *Nature Chemical Biology* 10 (2): 93-95.
<https://doi.org/10.1038/nchembio.1432>.
- Liu, Jing, Mujahid Ali, et Qi Zhou. 2020. « Establishment and Evolution of Heterochromatin ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1476 (1): 59-77.
<https://doi.org/10.1111/nyas.14303>.
- Liu, Ke, et Jinrong Min. 2020. « Structural Basis for the Recognition of Non-Methylated DNA by the CXXC Domain ». *Journal of Molecular Biology* 432 (6): 1674-86.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.09.025>.
- Loenen, Wil A. M., David T. F. Dryden, Elisabeth A. Raleigh, Geoffrey G. Wilson, et Noreen E. Murray. 2014. « Highlights of the DNA cutters: a short history of the restriction enzymes ». *Nucleic Acids Research* 42 (1): 3-19. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt990>.
- Lorsbach, R. B., J. Moore, S. Mathew, S. C. Raimondi, S. T. Mukatira, et J. R. Downing. 2003. « TET1, a Member of a Novel Protein Family, Is Fused to MLL in Acute Myeloid Leukemia Containing the t(10;11)(Q22;Q23) ». *Leukemia* 17 (3): 637-41.
<https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402834>.
- Loubiere, V., G. L. Papadopoulos, Q. Szabo, A.-M. Martinez, et G. Cavalli. 2020. « Widespread Activation of Developmental Gene Expression Characterized by PRC1-Dependent Chromatin Looping ». *Science Advances* 6 (2): eaax4001.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.aax4001>.
- Loubière, Vincent, Anna Delest, Aubin Thomas, Boyan Bonev, Bernd Schuettengruber, Satish Sati, Anne-Marie Martinez, et Giacomo Cavalli. 2016. « Coordinate Redeployment of PRC1 Proteins Suppresses Tumor Formation during Drosophila Development ». *Nature Genetics* 48 (11): 1436-42. <https://doi.org/10.1038/ng.3671>.

- Love, Sierra L., Joseph D. Emerson, Kazunori Koide, et Aaron A. Hoskins. 2023. « Pre-mRNA Splicing-Associated Diseases and Therapies ». *RNA Biology* 20 (1): 525-38. <https://doi.org/10.1080/15476286.2023.2239601>.
- Luger, Karolin, Armin W. Mäder, Robin K. Richmond, David F. Sargent, et Timothy J. Richmond. 1997. « Crystal Structure of the Nucleosome Core Particle at 2.8 Å Resolution ». *Nature* 389 (6648): 251-60. <https://doi.org/10.1038/38444>.
- Lyko, Frank. 2018. « The DNA Methyltransferase Family: A Versatile Toolkit for Epigenetic Regulation ». *Nature Reviews. Genetics* 19 (2): 81-92. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.80>.
- Mahé, Elise A., Thierry Madigou, Aurélien A. Sérandour, Maud Bizot, Stéphane Avner, Frédéric Chalmel, Gaëlle Paliarne, Raphaël Métivier, et Gilles Salbert. 2017. « Cytosine modifications modulate the chromatin architecture of transcriptional enhancers ». *Genome Research* 27 (6): 947-58. <https://doi.org/10.1101/gr.211466.116>.
- Margueron, Raphaël, Neil Justin, Katsuhito Ohno, Miriam L. Sharpe, Jinsook Son, William J. Drury, Philipp Voigt, et al. 2009. « Role of the Polycomb Protein EED in the Propagation of Repressive Histone Marks ». *Nature* 461 (7265): 762-67. <https://doi.org/10.1038/nature08398>.
- Margueron, Raphaël, Guohong Li, Kavitha Sarma, Alexandre Blais, Jiri Zavadil, Christopher L. Woodcock, Brian D. Dynlacht, et Danny Reinberg. 2008. « Ezh1 and Ezh2 Maintain Repressive Chromatin through Different Mechanisms ». *Molecular Cell* 32 (4): 503-18. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.11.004>.
- Margueron, Raphaël, et Danny Reinberg. 2011. « The Polycomb Complex PRC2 and Its Mark in Life ». *Nature* 469 (7330): 343-49. <https://doi.org/10.1038/nature09784>.
- Maunakea, Alike K., Raman P. Nagarajan, Mikhail Bilenky, Tracy J. Ballinger, Cletus D'Souza, Shaun D. Fouse, Brett E. Johnson, et al. 2010. « Conserved Role of Intragenic DNA Methylation in Regulating Alternative Promoters ». *Nature* 466 (7303): 253-57. <https://doi.org/10.1038/nature09165>.
- Maurange, Cédric. 2020. « Temporal Patterning in Neural Progenitors: From Drosophila Development to Childhood Cancers ». *Disease Models & Mechanisms* 13 (7): dmm044883. <https://doi.org/10.1242/dmm.044883>.
- Melamed, Philippa, Yahav Yosefzon, Cfir David, Anna Tsukerman, et Lilach Pnueli. 2018. « Tet Enzymes, Variants, and Differential Effects on Function ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 6: 22. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00022>.
- Messerschmidt, Daniel M., Barbara B. Knowles, et Davor Solter. 2014. « DNA Methylation Dynamics during Epigenetic Reprogramming in the Germline and Preimplantation Embryos ». *Genes & Development* 28 (8): 812-28. <https://doi.org/10.1101/gad.234294.113>.
- Millán-Zambrano, Gonzalo, Adam Burton, Andrew J. Bannister, et Robert Schneider. 2022. « Histone Post-Translational Modifications - Cause and Consequence of Genome Function ». *Nature Reviews. Genetics* 23 (9): 563-80. <https://doi.org/10.1038/s41576-022-00468-7>.
- Mohanta, Tapan Kumar, Awdhesh Kumar Mishra, et Ahmed Al-Harrasi. 2021. « The 3D Genome: From Structure to Function ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (21): 11585. <https://doi.org/10.3390/ijms222111585>.
- Mondo, Stephen J., Richard O. Dannebaum, Rita C. Kuo, Katherine B. Louie, Adam J. Bewick, Kurt LaButti, Sajeet Haridas, et al. 2017. « Widespread Adenine N6-Methylation of

- Active Genes in Fungi ». *Nature Genetics* 49 (6): 964-68.
<https://doi.org/10.1038/ng.3859>.
- Montalbán-Loro, Raquel, Anna Lozano-Ureña, Mitsuteru Ito, Christel Krueger, Wolf Reik, Anne C. Ferguson-Smith, et Sacri R. Ferrón. 2019. « TET3 Prevents Terminal Differentiation of Adult NSCs by a Non-Catalytic Action at Snrpn ». *Nature Communications* 10 (1): 1726. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09665-1>.
- Montibus, Bertille, Jil Cercy, Tristan Bouschet, Amandine Charras, Stéphanie Maupetit-Méhouas, David Nury, Céline Gonthier-Guéret, et al. 2021. « TET3 Controls the Expression of the H3K27me3 Demethylase Kdm6b during Neural Commitment ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 78 (2): 757-68.
<https://doi.org/10.1007/s00018-020-03541-8>.
- Moran-Crusio, Kelly, Linsey Reavie, Alan Shih, Omar Abdel-Wahab, Delphine Ndiaye-Lobry, Camille Lobry, Maria E. Figueroa, et al. 2011. « Tet2 Loss Leads to Increased Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal and Myeloid Transformation ». *Cancer Cell* 20 (1): 11-24. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.06.001>.
- Morey, Lluís, Luigi Aloia, Luca Cozzuto, Salvador Aznar Benitah, et Luciano Di Croce. 2013. « RYBP and Cbx7 Define Specific Biological Functions of Polycomb Complexes in Mouse Embryonic Stem Cells ». *Cell Reports* 3 (1): 60-69.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.11.026>.
- Morey, Lluís, Alexandra Santanach, Enrique Blanco, Luigi Aloia, Elphège P. Nora, Benoit G. Bruneau, et Luciano Di Croce. 2015. « Polycomb Regulates Mesoderm Cell Fate-Specification in Embryonic Stem Cells through Activation and Repression Mechanisms ». *Cell Stem Cell* 17 (3): 300-315.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.08.009>.
- Morgan, Marc A. J., et Ali Shilatifard. 2020. « Reevaluating the Roles of Histone-Modifying Enzymes and Their Associated Chromatin Modifications in Transcriptional Regulation ». *Nature Genetics* 52 (12): 1271-81. <https://doi.org/10.1038/s41588-020-00736-4>.
- Morgan, Marc A. J., et Ali Shilatifard. 2023. « Epigenetic Moonlighting: Catalytic-Independent Functions of Histone Modifiers in Regulating Transcription ». *Science Advances* 9 (16): eadg6593. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adg6593>.
- Morin, Ryan D., Nathalie A. Johnson, Tesa M. Severson, Andrew J. Mungall, Jianghong An, Rodrigo Goya, Jessica E. Paul, et al. 2010. « Somatic Mutations Altering EZH2 (Tyr641) in Follicular and Diffuse Large B-Cell Lymphomas of Germinal-Center Origin ». *Nature Genetics* 42 (2): 181-85. <https://doi.org/10.1038/ng.518>.
- Müller, J. 1995. « Transcriptional silencing by the Polycomb protein in Drosophila embryos. » *The EMBO Journal* 14 (6): 1209-20.
- Müller, Jürg, Craig M. Hart, Nicole J. Francis, Marcus L. Vargas, Aditya Sengupta, Brigitte Wild, Ellen L. Miller, Michael B. O'Connor, Robert E. Kingston, et Jeffrey A. Simon. 2002. « Histone Methyltransferase Activity of a Drosophila Polycomb Group Repressor Complex ». *Cell* 111 (2): 197-208. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00976-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00976-5).
- Münzel, Martin, Daniel Globisch, Tobias Brückl, Mirko Wagner, Veronika Welzmler, Stylianos Michalakis, Markus Müller, Martin Biel, et Thomas Carell. 2010. « Quantification of the Sixth DNA Base Hydroxymethylcytosine in the Brain ». *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 49 (31): 5375-77.
<https://doi.org/10.1002/anie.201002033>.

- Musheev, Michael U., Anne Baumgärtner, Laura Krebs, et Christof Niehrs. 2020. « The Origin of Genomic N6-Methyl-Deoxyadenosine in Mammalian Cells ». *Nature Chemical Biology* 16 (6): 630-34. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-0504-2>.
- Nakagawa, Tadashi, Lei Lv, Makiko Nakagawa, Yanbao Yu, Chao Yu, Ana C. D'Alessio, Keiko Nakayama, Heng-Yu Fan, Xian Chen, et Yue Xiong. 2015. « CRL4(VprBP) E3 Ligase Promotes Monoubiquitylation and Chromatin Binding of TET Dioxygenases ». *Molecular Cell* 57 (2): 247-60. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.12.002>.
- Nambu, J. R., J. O. Lewis, K. A. Wharton, et S. T. Crews. 1991. « The Drosophila Single-Minded Gene Encodes a Helix-Loop-Helix Protein That Acts as a Master Regulator of CNS Midline Development ». *Cell* 67 (6): 1157-67. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90292-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90292-7).
- Nanan, Kyster K., David M. Sturgill, Maria F. Prigge, Morgan Thenoz, Allissa A. Dillman, Mariana D. Mandler, et Shalini Oberdoerffer. 2019. « TET-Catalyzed 5-Carboxylcytosine Promotes CTCF Binding to Suboptimal Sequences Genome-Wide ». *iScience* 19 (septembre): 326-39. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.07.041>.
- Nekrasov, Maxim, Tetyana Klymenko, Sven Fraterman, Bernadett Papp, Katarzyna Oktaba, Thomas Köcher, Adrian Cohen, Hendrik G Stunnenberg, Matthias Wilm, et Jürg Müller. 2007. « Pcl-PRC2 is needed to generate high levels of H3-K27 trimethylation at Polycomb target genes ». *The EMBO Journal* 26 (18): 4078-88. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601837>.
- Nekrasov, Maxim, Brigitte Wild, et Jürg Müller. 2005. « Nucleosome Binding and Histone Methyltransferase Activity of Drosophila PRC2 ». *EMBO Reports* 6 (4): 348-53. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400376>.
- Ng, Huck Hui, Qin Feng, Hengbin Wang, Hediye Erdjument-Bromage, Paul Tempst, Yi Zhang, et Kevin Struhl. 2002. « Lysine Methylation within the Globular Domain of Histone H3 by Dot1 Is Important for Telomeric Silencing and Sir Protein Association ». *Genes & Development* 16 (12): 1518-27. <https://doi.org/10.1101/gad.1001502>.
- Nickel, B. E., C. D. Allis, et J. R. Davie. 1989. « Ubiquitinated Histone H2B Is Preferentially Located in Transcriptionally Active Chromatin ». *Biochemistry* 28 (3): 958-63. <https://doi.org/10.1021/bi00429a006>.
- Nowak, Scott J., et Victor G. Corces. 2004. « Phosphorylation of Histone H3: A Balancing Act between Chromosome Condensation and Transcriptional Activation ». *Trends in Genetics: TIG* 20 (4): 214-20. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2004.02.007>.
- O'Brown, Zach K., Konstantinos Boulias, Jie Wang, Simon Yuan Wang, Natasha M. O'Brown, Ziyang Hao, Hiroki Shibuya, et al. 2019. « Sources of artifact in measurements of 6mA and 4mC abundance in eukaryotic genomic DNA ». *BMC Genomics* 20 (1): 445. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5754-6>.
- O'Connell, S., L. Wang, S. Robert, C. A. Jones, R. Saint, et R. S. Jones. 2001. « Polycomblike PHD Fingers Mediate Conserved Interaction with Enhancer of Zeste Protein ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (46): 43065-73. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104294200>.
- Oermann, Eric K., Jing Wu, Kun-Liang Guan, et Yue Xiong. 2012. « Alterations of Metabolic Genes and Metabolites in Cancer ». *Seminars in cell & developmental biology* 23 (4): 370-80. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.01.013>.
- Ogiyama, Yuki, Bernd Schuettengruber, Giorgio L. Papadopoulos, Jia-Ming Chang, et Giacomo Cavalli. 2018. « Polycomb-Dependent Chromatin Looping Contributes to

- Gene Silencing during Drosophila Development ». *Molecular Cell* 71 (1): 73-88.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.05.032>.
- Okano, M., S. Xie, et E. Li. 1998. « Dnmt2 Is Not Required for de Novo and Maintenance Methylation of Viral DNA in Embryonic Stem Cells ». *Nucleic Acids Research* 26 (11): 2536-40. <https://doi.org/10.1093/nar/26.11.2536>.
- O’Loughlen, Ana, Ana M. Muñoz-Cabello, Alexandre Gaspar-Maia, Hsan-Au Wu, Ana Banito, Natalia Kunowska, Tomas Racek, et al. 2012. « MicroRNA Regulation of Cbx7 Mediates a Switch of Polycomb Orthologs during ESC Differentiation ». *Cell Stem Cell* 10 (1): 33-46. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.12.004>.
- Oudet, P., M. Gross-Bellard, et P. Chambon. 1975. « Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit ». *Cell* 4 (4): 281-300. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(75\)90149-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(75)90149-X).
- Park, Jong-Whi, et Şevin Turcan. 2019. « Epigenetic Reprogramming for Targeting IDH-Mutant Malignant Gliomas ». *Cancers* 11 (10): 1616. <https://doi.org/10.3390/cancers11101616>.
- Park, Su H., Ka-Wing Fong, Ezinne Mong, M. Cynthia Martin, Gary E. Schiltz, et Jindan Yu. 2021. « Going beyond Polycomb: EZH2 Functions in Prostate Cancer ». *Oncogene* 40 (39): 5788-98. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-01982-4>.
- Parreno, Victoria, Anne-Marie Martinez, et Giacomo Cavalli. 2022. « Mechanisms of Polycomb Group Protein Function in Cancer ». *Cell Research* 32 (3): 231-53. <https://doi.org/10.1038/s41422-021-00606-6>.
- Paull, T. T., E. P. Rogakou, V. Yamazaki, C. U. Kirchgessner, M. Gellert, et W. M. Bonner. 2000. « A Critical Role for Histone H2AX in Recruitment of Repair Factors to Nuclear Foci after DNA Damage ». *Current Biology: CB* 10 (15): 886-95. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(00\)00610-2](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(00)00610-2).
- Pedersen, Marianne Terndrup, et Kristian Helin. 2010. « Histone Demethylases in Development and Disease ». *Trends in Cell Biology* 20 (11): 662-71. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.08.011>.
- Pemberton, Helen, Emma Anderton, Harshil Patel, Sharon Brookes, Hollie Chandler, Richard Palermo, Julie Stock, et al. 2014. « Genome-Wide Co-Localization of Polycomb Orthologs and Their Effects on Gene Expression in Human Fibroblasts ». *Genome Biology* 15 (2): R23. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-2-r23>.
- Pengelly, Ana Raquel, Ömer Copur, Herbert Jäckle, Alf Herzig, et Jürg Müller. 2013. « A Histone Mutant Reproduces the Phenotype Caused by Loss of Histone-Modifying Factor Polycomb ». *Science (New York, N.Y.)* 339 (6120): 698-99. <https://doi.org/10.1126/science.1231382>.
- Pengelly, Ana Raquel, Reinhard Kalb, Katja Finkl, et Jürg Müller. 2015. « Transcriptional Repression by PRC1 in the Absence of H2A Monoubiquitylation ». *Genes & Development* 29 (14): 1487-92. <https://doi.org/10.1101/gad.265439.115>.
- Peterson, A. J., M. Kyba, D. Bornemann, K. Morgan, H. W. Brock, et J. Simon. 1997. « A Domain Shared by the Polycomb Group Proteins Scm and Ph Mediates Heterotypic and Homotypic Interactions ». *Molecular and Cellular Biology* 17 (11): 6683-92. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.11.6683>.
- Petryk, Nataliya, Sebastian Bultmann, Till Bartke, et Pierre-Antoine Defossez. 2020. « Staying true to yourself: mechanisms of DNA methylation maintenance in mammals ». *Nucleic Acids Research* 49 (6): 3020-32. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1154>.

- Pherson, Michelle, Ziva Misulovin, Maria Gause, Kathie Mihindukulasuriya, Amanda Swain, et Dale Dorsett. 2017. « Polycomb Repressive Complex 1 Modifies Transcription of Active Genes ». *Science Advances* 3 (8): e1700944. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700944>.
- Pickart, Cecile M., et Michael J. Eddins. 2004. « Ubiquitin: Structures, Functions, Mechanisms ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1695 (1-3): 55-72. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.09.019>.
- Quillien, Aurélie, Gueric Gilbert, Manon Boulet, Séverine Ethuin, Lucas Waltzer, et Laurence Vandel. 2021. « Prmt5 Promotes Vascular Morphogenesis Independently of Its Methyltransferase Activity ». *PLoS Genetics* 17 (6): e1009641. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009641>.
- Ramírez, Fidel, Vivek Bhardwaj, Laura Arrigoni, Kin Chung Lam, Björn A. Grüning, José Villaveces, Bianca Habermann, Asifa Akhtar, et Thomas Manke. 2018. « High-Resolution TADs Reveal DNA Sequences Underlying Genome Organization in Flies ». *Nature Communications* 9 (1): 189. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02525-w>.
- Rampal, Raajit, Altuna Alkalin, Jozef Madzo, Aparna Vasanthakumar, Elodie Pronier, Jay Patel, Yushan Li, et al. 2014. « DNA Hydroxymethylation Profiling Reveals That WT1 Mutations Result in Loss of TET2 Function in Acute Myeloid Leukemia ». *Cell Reports* 9 (5): 1841-55. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.11.004>.
- Rasmussen, Erik M. K., Cathrine B. Vågbø, Daniel Münch, Hans E. Krokan, Arne Klungland, Gro V. Amdam, et John Arne Dahl. 2016. « DNA base modifications in honey bee and fruit fly genomes suggest an active demethylation machinery with species- and tissue-specific turnover rates ». *Biochemistry and Biophysics Reports* 6 (juillet): 9-15. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2016.02.011>.
- Rasmussen, Kasper Dindler, et Kristian Helin. 2016. « Role of TET Enzymes in DNA Methylation, Development, and Cancer ». *Genes & Development* 30 (7): 733-50. <https://doi.org/10.1101/gad.276568.115>.
- Rival, Thomas, Laurent Soustelle, Colette Strambi, Marie-Thérèse Besson, Magali Iché, et Serge Birman. 2004. « Decreasing Glutamate Buffering Capacity Triggers Oxidative Stress and Neuropil Degeneration in the Drosophila Brain ». *Current Biology: CB* 14 (7): 599-605. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.03.039>.
- Roberts, R. J. 1980. « Restriction and Modification Enzymes and Their Recognition Sequences ». *Gene* 8 (4): 329-43. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(80\)90040-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(80)90040-2).
- Robinson, Philip J. J., Louise Fairall, Van A. T. Huynh, et Daniela Rhodes. 2006. « EM Measurements Define the Dimensions of the “30-Nm” Chromatin Fiber: Evidence for a Compact, Interdigitated Structure ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (17): 6506-11. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601212103>.
- Rowley, M. Jordan, Axel Poulet, Michael Nichols, Brianna Bixler, Adrian Sanborn, Elizabeth Brouhard, Karen Hermetz, et al. 2020. « Analysis of Hi-C Data Using SIP Effectively Identifies Loops in Organisms from C. Elegans to Mammals ». *Genome Research*, mars, gr.257832.119. <https://doi.org/10.1101/gr.257832.119>.
- Sabino, João C., Madalena R. de Almeida, Patrícia L. Abreu, Ana M. Ferreira, Paulo Caldas, Marco M. Domingues, Nuno C. Santos, Claus M. Azzalin, Ana Rita Grosso, et Sérgio Fernandes de Almeida. 2022. « Epigenetic Reprogramming by TET Enzymes Impacts Co-Transcriptional R-Loops ». *eLife* 11 (février): e69476. <https://doi.org/10.7554/eLife.69476>.

- Santiago, Mafalda, Claudia Antunes, Marta Guedes, Michelina Iacovino, Michael Kyba, Wolf Reik, Nuno Sousa, Luísa Pinto, Miguel R. Branco, et C. Joana Marques. 2020. « Tet3 Regulates Cellular Identity and DNA Methylation in Neural Progenitor Cells ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 77 (14): 2871-83. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03335-7>.
- Sanulli, Serena, Neil Justin, Aurélie Teissandier, Katia Ancelin, Manuela Portoso, Matthieu Caron, Audrey Michaud, et al. 2015. « Jarid2 Methylation via the PRC2 Complex Regulates H3K27me3 Deposition during Cell Differentiation ». *Molecular Cell* 57 (5): 769-83. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.12.020>.
- Sarkar, Sibaji, Ana L. Abujamra, Jenny E. Loew, Lora W. Forman, Susan P. Perrine, et Douglas V. Faller. 2011. « Histone Deacetylase Inhibitors Reverse CpG Methylation by Regulating DNMT1 through ERK Signaling ». *Anticancer Research* 31 (9): 2723-32.
- Sasaki, Masahiro, Jason Anast, William Bassett, Toshifumi Kawakami, Noriaki Sakuragi, et Rajvir Dahiya. 2003. « Bisulfite Conversion-Specific and Methylation-Specific PCR: A Sensitive Technique for Accurate Evaluation of CpG Methylation ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 309 (2): 305-9. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.08.005>.
- Schaaf, Cheri A., Ziva Misulovin, Maria Gause, Amanda Koenig, David W. Gohara, Audrey Watson, et Dale Dorsett. 2013. « Cohesin and Polycomb Proteins Functionally Interact to Control Transcription at Silenced and Active Genes ». *PLoS Genetics* 9 (6): e1003560. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003560>.
- Schaefer, Matthias, Tim Pollex, Katharina Hanna, Francesca Tuorto, Madeleine Meusburger, Mark Helm, et Frank Lyko. 2010. « RNA Methylation by Dnmt2 Protects Transfer RNAs against Stress-Induced Cleavage ». *Genes & Development* 24 (15): 1590-95. <https://doi.org/10.1101/gad.586710>.
- Scheuermann, Johanna C., Luis Gutiérrez, et Jürg Müller. 2012. « Histone H2A Monoubiquitination and Polycomb Repression: The Missing Pieces of the Puzzle ». *Fly* 6 (3): 162-68. <https://doi.org/10.4161/fly.20986>.
- Schiffers, Sarah, Charlotte Ebert, René Rahimoff, Olesea Kosmatchev, Jessica Steinbacher, Alexandra-Viola Bohne, Fabio Spada, et al. 2017. « Quantitative LC-MS Provides No Evidence for M6 dA or M4 dC in the Genome of Mouse Embryonic Stem Cells and Tissues ». *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 56 (37): 11268-71. <https://doi.org/10.1002/anie.201700424>.
- Schuettengruber, Bernd, Henri-Marc Bourbon, Luciano Di Croce, et Giacomo Cavalli. 2017. « Genome Regulation by Polycomb and Trithorax: 70 Years and Counting ». *Cell* 171 (1): 34-57. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.002>.
- Schuettengruber, Bernd, Mythily Ganapathi, Benjamin Leblanc, Manuela Portoso, Rami Jaschek, Bas Tolhuis, Maarten van Lohuizen, Amos Tanay, et Giacomo Cavalli. 2009. « Functional Anatomy of Polycomb and Trithorax Chromatin Landscapes in Drosophila Embryos ». *PLoS Biology* 7 (1): e1000013. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000013>.
- Schumann, Ulrike, He-Na Zhang, Tennille Sibbritt, Anyu Pan, Attila Horvath, Simon Gross, Susan J. Clark, Li Yang, et Thomas Preiss. 2020. « Multiple links between 5-methylcytosine content of mRNA and translation ». *BMC Biology* 18 (1): 40. <https://doi.org/10.1186/s12915-020-00769-5>.

- Scourzic, Laurianne, Enguerran Mouly, et Olivier A. Bernard. 2015. « TET proteins and the control of cytosine demethylation in cancer ». *Genome Medicine* 7 (1): 9. <https://doi.org/10.1186/s13073-015-0134-6>.
- Sekine, Shun-Ichi, Haruhiko Ehara, Tomoya Kujirai, et Hitoshi Kurumizaka. 2023. « Structural Perspectives on Transcription in Chromatin ». *Trends in Cell Biology*, août, S0962-8924(23)00155-1. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2023.07.011>.
- Senner, Claire E., Stephanie Chrysanthou, Sarah Burge, Hai-Yan Lin, Miguel R. Branco, et Myriam Hemberger. 2020. « TET1 and 5-Hydroxymethylation Preserve the Stem Cell State of Mouse Trophoblast ». *Stem Cell Reports* 15 (6): 1301-16. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.04.009>.
- Seo, Kyung W., et Ralph E. Kleiner. 2021. « Mechanisms of Epitranscriptomic Gene Regulation ». *Biopolymers* 112 (1): e23403. <https://doi.org/10.1002/bip.23403>.
- Sérandour, Aurélien A., Stéphane Avner, Frédéric Oger, Maud Bizot, Frédéric Percevault, Céline Lucchetti-Miganeh, Gaëlle Palierne, et al. 2012. « Dynamic hydroxymethylation of deoxyribonucleic acid marks differentiation-associated enhancers ». *Nucleic Acids Research* 40 (17): 8255-65. <https://doi.org/10.1093/nar/gks595>.
- Shao, Z., F. Raible, R. Mollaaghababa, J. R. Guyon, C. T. Wu, W. Bender, et R. E. Kingston. 1999. « Stabilization of Chromatin Structure by PRC1, a Polycomb Complex ». *Cell* 98 (1): 37-46. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80604-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80604-2).
- Sharma, Sunny, et Karl-Dieter Entian. 2022. « Chemical Modifications of Ribosomal RNA. » *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.j.)* 2533: 149-66. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2501-9_9.
- Shen, Hui, Robert Jordan Ontiveros, Michael C. Owens, Monica Yun Liu, Uday Ghanty, Rahul M. Kohli, et Kathy Fange Liu. 2021. « TET-Mediated 5-Methylcytosine Oxidation in tRNA Promotes Translation ». *The Journal of Biological Chemistry* 296: 100087. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.014226>.
- Shukla, Vipul, Daniela Samaniego-Castruita, Zhen Dong, Edahí González-Avalos, Qingqing Yan, Kavitha Sarma, et Anjana Rao. 2022. « TET Deficiency Perturbs Mature B Cell Homeostasis and Promotes Oncogenesis Associated with Accumulation of G-Quadruplex and R-Loop Structures ». *Nature Immunology* 23 (1): 99-108. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-01087-w>.
- Simpson, Jared T., Rachael E. Workman, P. C. Zuzarte, Matei David, L. J. Dursi, et Winston Timp. 2017. « Detecting DNA Cytosine Methylation Using Nanopore Sequencing ». *Nature Methods* 14 (4): 407-10. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4184>.
- Singh, Aditi, Daniel A. Rappolee, et Douglas M. Ruden. 2023. « Epigenetic Reprogramming in Mice and Humans: From Fertilization to Primordial Germ Cell Development ». *Cells* 12 (14): 1874. <https://doi.org/10.3390/cells12141874>.
- Singh, Badri Nath, Hiep Tran, Joseph Kramer, Elmira Kirichenko, Neha Changela, Fei Wang, Yaping Feng, et al. 2023. « Tet-Dependent 5-Hydroxymethyl-Cytosine Modification of mRNA Regulates Axon Guidance Genes in Drosophila ». *bioRxiv: The Preprint Server for Biology*, août, 2023.01.03.522592. <https://doi.org/10.1101/2023.01.03.522592>.
- Skvortsova, Ksenia, Clare Stirzaker, et Philippa Taberlay. 2019. « The DNA Methylation Landscape in Cancer ». *Essays in Biochemistry* 63 (6): 797-811. <https://doi.org/10.1042/EBC20190037>.

- Slobodyanyuk, Elena, Claudia Cattoglio, et Tsung-Han S. Hsieh. 2022. « Mapping Mammalian 3D Genomes by Micro-C ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 2532: 51-71. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2497-5_4.
- Sneeringer, Christopher J., Margaret Porter Scott, Kevin W. Kuntz, Sarah K. Knutson, Roy M. Pollock, Victoria M. Richon, et Robert A. Copeland. 2010. « Coordinated Activities of Wild-Type plus Mutant EZH2 Drive Tumor-Associated Hypertrimethylation of Lysine 27 on Histone H3 (H3K27) in Human B-Cell Lymphomas ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (49): 20980-85. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012525107>.
- Son, Jinsook, Steven S. Shen, Raphael Margueron, et Danny Reinberg. 2013. « Nucleosome-Binding Activities within JARID2 and EZH1 Regulate the Function of PRC2 on Chromatin ». *Genes & Development* 27 (24): 2663-77. <https://doi.org/10.1101/gad.225888.113>.
- Song, Jikui, Olga Rechkoblit, Timothy H. Bestor, et Dinshaw J. Patel. 2011. « Structure of DNMT1-DNA Complex Reveals a Role for Autoinhibition in Maintenance DNA Methylation ». *Science (New York, N.Y.)* 331 (6020): 1036-40. <https://doi.org/10.1126/science.1195380>.
- Song, Jinghui, et Chengqi Yi. 2020. « Reading Chemical Modifications in the Transcriptome ». *Journal of Molecular Biology* 432 (6): 1824-39. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.10.006>.
- Sonnenfeld, M., M. Ward, G. Nystrom, J. Mosher, S. Stahl, et S. Crews. 1997. « The Drosophila Tango Gene Encodes a bHLH-PAS Protein That Is Orthologous to Mammalian Arnt and Controls CNS Midline and Tracheal Development ». *Development (Cambridge, England)* 124 (22): 4571-82. <https://doi.org/10.1242/dev.124.22.4571>.
- Spana, E. P., et C. Q. Doe. 1996. « Numb Antagonizes Notch Signaling to Specify Sibling Neuron Cell Fates ». *Neuron* 17 (1): 21-26. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80277-9](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80277-9).
- Spruijt, Cornelia G., Felix Gnerlich, Arne H. Smits, Toni Pfaffeneder, Pascal W. T. C. Jansen, Christina Bauer, Martin Münzel, et al. 2013. « Dynamic Readers for 5-(Hydroxy)methylcytosine and Its Oxidized Derivatives ». *Cell* 152 (5): 1146-59. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.004>.
- Squires, Jeffrey E., Hardip R. Patel, Marco Nusch, Tennille Sibbritt, David T. Humphreys, Brian J. Parker, Catherine M. Suter, et Thomas Preiss. 2012. « Widespread Occurrence of 5-Methylcytosine in Human Coding and Non-Coding RNA ». *Nucleic Acids Research* 40 (11): 5023-33. <https://doi.org/10.1093/nar/gks144>.
- Steensel, B. van, et S. Henikoff. 2000. « Identification of in Vivo DNA Targets of Chromatin Proteins Using Tethered Dam Methyltransferase ». *Nature Biotechnology* 18 (4): 424-28. <https://doi.org/10.1038/74487>.
- Stork, Tobias, Amy Sheehan, Ozge E. Tasdemir-Yilmaz, et Marc R. Freeman. 2014. « Neuron-Glia Interactions through the Heartless FGF Receptor Signaling Pathway Mediate Morphogenesis of Drosophila Astrocytes ». *Neuron* 83 (2): 388-403. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.06.026>.
- Su, Zhangli, Briana Wilson, Pankaj Kumar, et Anindya Dutta. 2020. « Noncanonical Roles of tRNAs: tRNA Fragments and Beyond ». *Annual Review of Genetics* 54 (novembre): 47-69. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-022620-101840>.

- Suzuki, Tsutomu. 2021. « The Expanding World of tRNA Modifications and Their Disease Relevance ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 22 (6): 375-92. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00342-0>.
- Tahiliani, Mamta, Kian Peng Koh, Yinghua Shen, William A. Pastor, Hozefa Bandukwala, Yevgeny Brudno, Suneet Agarwal, et al. 2009. « Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1 ». *Science (New York, N.Y.)* 324 (5929): 930-35. <https://doi.org/10.1126/science.1170116>.
- Tavares, Lígia, Emilia Dimitrova, David Oxley, Judith Webster, Raymond Poot, Jeroen Demmers, Karel Bezstarosti, et al. 2012. « RYBP-PRC1 Complexes Mediate H2A Ubiquitylation at Polycomb Target Sites Independently of PRC2 and H3K27me3 ». *Cell* 148 (4): 664-78. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.12.029>.
- Trewick, Sarah C., Timothy F. Henshaw, Robert P. Hausinger, Tomas Lindahl, et Barbara Sedgwick. 2002. « Oxidative Demethylation by Escherichia Coli AlkB Directly Reverts DNA Base Damage ». *Nature* 419 (6903): 174-78. <https://doi.org/10.1038/nature00908>.
- Trojer, Patrick, et Danny Reinberg. 2007. « Facultative Heterochromatin: Is There a Distinctive Molecular Signature? ». *Molecular Cell* 28 (1): 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.09.011>.
- Tsagaratou, Ageliki, Tarmo Äijö, Chan-Wang J. Lio, Xiaojing Yue, Yun Huang, Steven E. Jacobsen, Harri Lähdesmäki, et Anjana Rao. 2014. « Dissecting the Dynamic Changes of 5-Hydroxymethylcytosine in T-Cell Development and Differentiation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (32): E3306-3315. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412327111>.
- Tsai, Ya-Ping, Hsiao-Fan Chen, Sung-Yuan Chen, Wei-Chung Cheng, Hsei-Wei Wang, Zih-Jie Shen, Chunxiao Song, Shu-Chun Teng, Chuan He, et Kou-Juey Wu. 2014. « TET1 regulates hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition by acting as a co-activator ». *Genome Biology* 15 (12): 513. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0513-0>.
- Valinluck, Victoria, et Lawrence C. Sowers. 2007. « Endogenous Cytosine Damage Products Alter the Site Selectivity of Human DNA Maintenance Methyltransferase DNMT1 ». *Cancer Research* 67 (3): 946-50. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3123>.
- Van Deuren, V., S. Plessers, et J. Robben. 2020. « Structural Determinants of Nucleobase Modification Recognition in the AlkB Family of Dioxygenases ». *DNA Repair* 96 (décembre): 102995. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102995>.
- Varley, Katherine E., Jason Gertz, Kevin M. Bowling, Stephanie L. Parker, Timothy E. Reddy, Florencia Pauli-Behn, Marie K. Cross, et al. 2013. « Dynamic DNA methylation across diverse human cell lines and tissues ». *Genome Research* 23 (3): 555-67. <https://doi.org/10.1101/gr.147942.112>.
- Verheyen, Esther M. 2022. « The Power of Drosophila in Modeling Human Disease Mechanisms ». *Disease Models & Mechanisms* 15 (3): dmm049549. <https://doi.org/10.1242/dmm.049549>.
- Verma, Nipun, Heng Pan, Louis C. Doré, Abhijit Shukla, Qing V. Li, Bobbie Pelham-Webb, Virginia Teijeiro, et al. 2018. « TET Proteins Safeguard Bivalent Promoters from de Novo Methylation in Human Embryonic Stem Cells ». *Nature Genetics* 50 (1): 83-95. <https://doi.org/10.1038/s41588-017-0002-y>.

- Vincent, S., J. L. Vonesch, et A. Giangrande. 1996. « Glide Directs Glial Fate Commitment and Cell Fate Switch between Neurones and Glia ». *Development (Cambridge, England)* 122 (1): 131-39. <https://doi.org/10.1242/dev.122.1.131>.
- Wang, Fei, Svetlana Minakhina, Hiep Tran, Neha Changel, Joseph Kramer, et Ruth Steward. 2018. « Tet Protein Function during Drosophila Development ». *PLoS One* 13 (1): e0190367. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190367>.
- Wang, Hengbin, Liangjun Wang, Hediye Erdjument-Bromage, Miguel Vidal, Paul Tempst, Richard S. Jones, et Yi Zhang. 2004. « Role of Histone H2A Ubiquitination in Polycomb Silencing ». *Nature* 431 (7010): 873-78. <https://doi.org/10.1038/nature02985>.
- Wang, Lanfeng, Yu Zhou, Liang Xu, Rui Xiao, Xingyu Lu, Liang Chen, Jenny Chong, et al. 2015. « Molecular Basis for 5-Carboxycytosine Recognition by RNA Polymerase II Elongation Complex ». *Nature* 523 (7562): 621-25. <https://doi.org/10.1038/nature14482>.
- Watts, Ryan J., Oren Schuldiner, John Perrino, Camilla Larsen, et Liqun Luo. 2004. « Glia Engulf Degenerating Axons during Developmental Axon Pruning ». *Current Biology: CB* 14 (8): 678-84. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.03.035>.
- Wheeler, Scott R., Joseph B. Kearney, Amaris R. Guardiola, et Stephen T. Crews. 2006. « Single-Cell Mapping of Neural and Glial Gene Expression in the Developing Drosophila CNS Midline Cells ». *Developmental Biology* 294 (2): 509-24. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.03.016>.
- Wheeler, Scott R., Stephanie B. Stagg, et Stephen T. Crews. 2008. « Multiple Notch Signaling Events Control Drosophila CNS Midline Neurogenesis, Gliogenesis and Neuronal Identity ». *Development (Cambridge, England)* 135 (18): 3071-79. <https://doi.org/10.1242/dev.022343>.
- Williams, Kristine, Jesper Christensen, Marianne Terndrup Pedersen, Jens V. Johansen, Paul A. C. Cloos, Juri Rappsilber, et Kristian Helin. 2011. « TET1 and Hydroxymethylcytosine in Transcription and DNA Methylation Fidelity ». *Nature* 473 (7347): 343-48. <https://doi.org/10.1038/nature10066>.
- Wion, Didier, et Josep Casadesús. 2006. « N6-methyl-adenine: an epigenetic signal for DNA-protein interactions ». *Nature Reviews. Microbiology* 4 (3): 183-92. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1350>.
- Wood, Adam, Nevan J Krogan, Jim Dover, Jessica Schneider, Jonathan Heidt, Marry Ann Boateng, Kimberly Dean, et al. 2003. « Bre1, an E3 Ubiquitin Ligase Required for Recruitment and Substrate Selection of Rad6 at a Promoter ». *Molecular Cell* 11 (1): 267-74. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00802-X](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00802-X).
- Woods, Brittany A., et Ross L. Levine. 2015. « The Role of Mutations in Epigenetic Regulators in Myeloid Malignancies ». *Immunological Reviews* 263 (1): 22-35. <https://doi.org/10.1111/imr.12246>.
- Wu, Hao, Ana C. D'Alessio, Shinsuke Ito, Kai Xia, Zhibin Wang, Kairong Cui, Keji Zhao, Yi Eve Sun, et Yi Zhang. 2011. « Dual functions of Tet1 in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells ». *Nature* 473 (7347): 389-93. <https://doi.org/10.1038/nature09934>.
- Wu, Tao P., Tao Wang, Matthew G. Seetin, Yongquan Lai, Shijia Zhu, Kaixuan Lin, Yifei Liu, et al. 2016. « DNA Methylation on N(6)-Adenine in Mammalian Embryonic Stem Cells ». *Nature* 532 (7599): 329-33. <https://doi.org/10.1038/nature17640>.
- Wu, Xiaoji, et Yi Zhang. 2017. « TET-Mediated Active DNA Demethylation: Mechanism, Function and Beyond ». *Nature Reviews. Genetics* 18 (9): 517-34. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.33>.

- Wyatt, G. R., et S. S. Cohen. 1953. « The Bases of the Nucleic Acids of Some Bacterial and Animal Viruses: The Occurrence of 5-Hydroxymethylcytosine ». *The Biochemical Journal* 55 (5): 774-82. <https://doi.org/10.1042/bj0550774>.
- Xiao, Bing, Jonathan R. Wilson, et Steven J. Gamblin. 2003. « SET Domains and Histone Methylation ». *Current Opinion in Structural Biology* 13 (6): 699-705. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2003.10.003>.
- Xiao, Chuan-Le, Song Zhu, Minghui He, De Chen, Qian Zhang, Ying Chen, Guoliang Yu, et al. 2018. « N6-Methyladenine DNA Modification in the Human Genome ». *Molecular Cell* 71 (2): 306-318.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.06.015>.
- Xu, Yufei, Feizhen Wu, Li Tan, Lingchun Kong, Lijun Xiong, Jie Deng, Andrew J. Barbera, et al. 2011. « Genome-Wide Regulation of 5hmC, 5mC, and Gene Expression by Tet1 Hydroxylase in Mouse Embryonic Stem Cells ». *Molecular Cell* 42 (4): 451-64. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.04.005>.
- Yang, Jihong, Nazym Bashkenova, Ruge Zang, Xin Huang, et Jianlong Wang. 2020. « The roles of TET family proteins in development and stem cells ». *Development (Cambridge, England)* 147 (2): dev183129. <https://doi.org/10.1242/dev.183129>.
- Yang, Lu, Zhiliang Chen, Elizabeth S. Stout, Fabien Delerue, Lars M. Ittner, Marc R. Wilkins, Kate G. R. Quinlan, et Merlin Crossley. 2020. « Methylation of a CGATA Element Inhibits Binding and Regulation by GATA-1 ». *Nature Communications* 11 (1): 2560. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16388-1>.
- Yang, Xiaojuan, Lu Xu, et Li Yang. 2023. « Recent Advances in EZH2-Based Dual Inhibitors in the Treatment of Cancers ». *European Journal of Medicinal Chemistry* 256 (août): 115461. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115461>.
- Yang, Xin, Ying Yang, Bao-Fa Sun, Yu-Sheng Chen, Jia-Wei Xu, Wei-Yi Lai, Ang Li, et al. 2017. « 5-methylcytosine promotes mRNA export — NSUN2 as the methyltransferase and ALYREF as an m5C reader ». *Cell Research* 27 (5): 606-25. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.55>.
- Yao, Bing, Ying Cheng, Zhiqin Wang, Yujing Li, Li Chen, Luoxiu Huang, Wenxin Zhang, et al. 2017. « DNA N6-Methyladenine Is Dynamically Regulated in the Mouse Brain Following Environmental Stress ». *Nature Communications* 8 (1): 1122. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01195-y>.
- Yao, Bing, Yujing Li, Zhiqin Wang, Li Chen, Mickael Poidevin, Can Zhang, Li Lin, et al. 2018. « Active N6-Methyladenine Demethylation by DMAD Regulates Gene Expression by Coordinating with Polycomb Protein in Neurons ». *Molecular Cell* 71 (5): 848-857.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.07.005>.
- Yin, Yimeng, Ekaterina Morgunova, Arttu Jolma, Eevi Kaasinen, Biswajyoti Sahu, Syed Khund-Sayeed, Pratyush K. Das, et al. 2017. « Impact of Cytosine Methylation on DNA Binding Specificities of Human Transcription Factors ». *Science (New York, N.Y.)* 356 (6337): eaaj2239. <https://doi.org/10.1126/science.aaj2239>.
- Zarin, Aref Arzan, Jamshid Asadzadeh, Karsten Hokamp, Daniel McCartney, Long Yang, Greg J. Bashaw, et Juan-Pablo Labrador. 2014. « A Transcription Factor Network Coordinates Attraction, Repulsion, and Adhesion Combinatorially to Control Motor Axon Pathway Selection ». *Neuron* 81 (6): 1297-1311. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.01.038>.
- Zeng, Cheng, Jiwei Chen, Emmalee W. Cooke, Arijita Subuddhi, Eliana T. Roodman, Fei Xavier Chen, et Kaixiang Cao. 2023. « Demethylase-independent roles of LSD1 in regulating

- enhancers and cell fate transition ». *Nature Communications* 14 (août): 4944.
<https://doi.org/10.1038/s41467-023-40606-1>.
- Zentner, Gabriel E., et Steven Henikoff. 2013. « Regulation of Nucleosome Dynamics by Histone Modifications ». *Nature Structural & Molecular Biology* 20 (3): 259-66.
<https://doi.org/10.1038/nsmb.2470>.
- Zhang, Guoqiang, Hua Huang, Di Liu, Ying Cheng, Xiaoling Liu, Wenxin Zhang, Ruichuan Yin, et al. 2015. « N6-Methyladenine DNA Modification in Drosophila ». *Cell* 161 (4): 893-906. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.018>.
- Zhang, Qian, Zhe Liang, Xuean Cui, Changmian Ji, Yun Li, Pingxian Zhang, Jingrong Liu, et al. 2018. « N6-Methyladenine DNA Methylation in Japonica and Indica Rice Genomes and Its Association with Gene Expression, Plant Development, and Stress Responses ». *Molecular Plant* 11 (12): 1492-1508.
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.11.005>.
- Zhang, Wenhao, Weikun Xia, Qiujun Wang, Aaron J Towers, Jiayu Chen, Rui Gao, Yu Zhang, et al. 2016. « Isoform Switch of TET1 Regulates DNA Demethylation and Mouse Development ». *Molecular Cell* 64 (6): 1062-73.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.10.030>.
- Zhang, Xinchao, Yue Zhang, Chaofu Wang, et Xu Wang. 2023. « TET (Ten-Eleven Translocation) Family Proteins: Structure, Biological Functions and Applications ». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 8 (1): 297.
<https://doi.org/10.1038/s41392-023-01537-x>.
- Zhang, Yang W., Zhihong Wang, Wenbing Xie, Yi Cai, Limin Xia, Hariharan Easwaran, Jianjun Luo, Ray-Whay Chiu Yen, Yana Li, et Stephen B. Baylin. 2017. « Acetylation Enhances TET2 Function in Protecting against Abnormal DNA Methylation during Oxidative Stress ». *Molecular Cell* 65 (2): 323-35. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.12.013>.
- Zhang, Zheng Z., Nicholas R. Pannunzio, Chih-Lin Hsieh, Kefei Yu, et Michael R. Lieber. 2015. « Complexities Due to Single-Stranded RNA during Antibody Detection of Genomic Rna:Dna Hybrids ». *BMC Research Notes* 8 (avril): 127.
<https://doi.org/10.1186/s13104-015-1092-1>.
- Zhao, Xianghui, Jinxiang Dai, Yue Ma, Yajing Mi, Daxiang Cui, Gong Ju, Wendy B. Macklin, et Weilin Jin. 2014. « Dynamics of Ten-Eleven Translocation Hydroxylase Family Proteins and 5-Hydroxymethylcytosine in Oligodendrocyte Differentiation ». *Glia* 62 (6): 914-26. <https://doi.org/10.1002/glia.22649>.
- Zheng, Guanqun, John Arne Dahl, Yamei Niu, Peter Fedorcsak, Chun-Min Huang, Charles J. Li, Cathrine B. Vågbo, et al. 2013. « ALKBH5 Is a Mammalian RNA Demethylase That Impacts RNA Metabolism and Mouse Fertility ». *Molecular Cell* 49 (1): 18-29.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.015>.
- Zhou, Chao, Changshi Wang, Hongbo Liu, Qiangwei Zhou, Qian Liu, Yan Guo, Ting Peng, et al. 2018. « Identification and Analysis of Adenine N6-Methylation Sites in the Rice Genome ». *Nature Plants* 4 (8): 554-63. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0214-x>.

Annexes

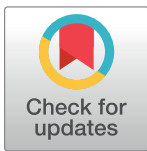
RESEARCH ARTICLE

Prmt5 promotes vascular morphogenesis independently of its methyltransferase activity

Aurélie Quillien^{1,2*}, Gueric Gilbert³, Manon Boulet^{1,3}, Séverine Ethuin¹, Lucas Waltzer³, Laurence Vandel^{1,3*}

1 Centre de Biologie du Développement (CBD), Centre de Biologie Intégrative (CBI), Université de Toulouse, CNRS, UPS, Toulouse, France, **2** RESTORE, INSERM UMR1301, CNRS UMR5070, Université Paul Sabatier, Université de Toulouse, Toulouse, France, **3** Université Clermont Auvergne, CNRS, INSERM, iGRéD, Clermont-Ferrand, France

* aurelie.quillien@gmail.com (AQ); laurence.vandel@uca.fr (LV)



OPEN ACCESS

Citation: Quillien A, Gilbert G, Boulet M, Ethuin S, Waltzer L, Vandel L (2021) Prmt5 promotes vascular morphogenesis independently of its methyltransferase activity. *PLoS Genet* 17(6): e1009641. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009641>

Editor: Marisa S. Bartolomei, University of Pennsylvania, UNITED STATES

Received: November 26, 2020

Accepted: June 2, 2021

Published: June 21, 2021

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009641>

Copyright: © 2021 Quillien et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its [Supporting Information](#) files.

Abstract

During development, the vertebrate vasculature undergoes major growth and remodeling. While the transcriptional cascade underlying blood vessel formation starts to be better characterized, little is known concerning the role and mode of action of epigenetic enzymes during this process. Here, we explored the role of the Protein Arginine Methyl Transferase Prmt5 in blood vessel formation as well as hematopoiesis using zebrafish as a model system. Through the combination of different *prmt5* loss-of-function approaches we highlighted a key role of Prmt5 in both processes. Notably, we showed that Prmt5 promotes vascular morphogenesis through the transcriptional control of ETS transcription factors and adhesion proteins in endothelial cells. Interestingly, using a catalytic dead mutant of Prmt5 and a specific drug inhibitor, we found that while Prmt5 methyltransferase activity was required for blood cell formation, it was dispensable for vessel formation. Analyses of chromatin architecture impact on reporter genes expression and chromatin immunoprecipitation experiments led us to propose that Prmt5 regulates transcription by acting as a scaffold protein that facilitates chromatin looping to promote vascular morphogenesis.

Author summary

Blood vessel formation is an essential developmental process required for the survival of all vertebrates. The vascular anatomy and the mechanisms involved in vessel formation are highly conserved among vertebrates. Hence, we used zebrafish as a model, to decipher the role and the mode of action of Prmt5, an enzyme known to regulate gene expression, in vascular morphogenesis and in blood cell formation *in vivo*. Using different approaches, we highlighted a key role of Prmt5 during both processes. However, we found that while blood cell formation required Prmt5 enzymatic activity, vascular morphogenesis was independent on its activity. Prmt5 has been proposed as a therapeutic target in many diseases, including cancer. Yet, we show here that Prmt5 acts at least in part independently of its methyltransferase activity to regulate vascular morphogenesis. By

Funding: This work was supported by the French Muscular Dystrophy Association <https://www.afm-telethon.fr> (grant 20102) and from the Fondation ARC pour la Recherche Contre le Cancer <https://www.fondation-arc.org> (grant SFI20121205590) to LV; By the Agence Nationale pour la Recherche (ANR) <https://www.anr.fr> (grant ANR-17-CE12-0030-03) and the Fondation ARC (grant PJA20171206371) to LW. AQ was the recipient of a post-doctoral fellowship from the Fondation ARC (grant PDF20140601073) and GG got a PhD fellowship from the University Clermont-Auvergne <https://www.uca.fr>. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

shedding light on a mechanism of action of Prmt5 that will be insensitive to enzymatic inhibitors, our data calls forth the design of alternative drugs. In addition, this non-canonical function of Prmt5 may have a more pervasive role than previously thought in physiological conditions, *i.e.* during development, but also in pathological situations such as in tumor angiogenesis and certainly deserves more attention in the future.

Introduction

Blood vessel formation is an essential developmental process required for the survival of all vertebrates and much effort has been devoted to reveal the underlying molecular pathways and to identify key molecules that regulate different aspects of this process. The vascular anatomy and the mechanisms involved in vessel formation are highly conserved among vertebrates (for a review, [1]). Hence, in the past two decades, zebrafish has been proven to be a useful model to study vascular morphogenesis and blood cell formation *in vivo* [2–5].

In vertebrates, blood cell formation is tightly associated with the development of the vascular system. Hematopoietic Stem Cells (HSC), which give rise to the different blood cell lineages, emerge directly from the ventral part of the dorsal aorta, an area referred to as the hemogenic endothelium. Notably, the ETS transcription factor ETV2 functions as a master regulator for the formation of endothelial and hematopoietic cell lineages through the induction of both blood cells and vasculature transcriptional programs, in mouse and in zebrafish [6,7]. In endothelial cells, ETV2 regulates the expression of other ETS transcription factors, VEGF (Vascular Endothelial Growth factor) signaling receptors and effectors, Rho-GTPases and adhesion molecules [6,7]. Besides, adhesion molecules have been shown to be crucial players in vascular morphogenesis as Vascular Endothelial cadherin (VE-cad/ Cdh5) and endothelial cell-selective adhesion molecule (Esama) are essential for junction remodeling and blood vessel elongation in zebrafish [8,9]. Indeed, loss-of-function of both *cdh5* and *esama* leads to the formation of disconnected vessels and delayed lumen formation. Likewise, knock-down of the scaffold protein Amot2, which associates to VE-cadherin, also leads to sprout elongation defects and narrowed aortic lumen [10]. While the transcriptional cascade underlying blood vessel formation starts to be better characterized, little is known about the role and mode of action of epigenetic enzymes during this process. Even though chromatin-modifying enzymes have been described as central in cardiovascular disease and development [11,12], only few examples illustrate in detail the role of epigenetic enzymes during blood vessel development. For instance, the chromatin-remodeling enzyme BRG1 affects early vascular development as well as hematopoiesis in mice [13], and the histone acetyltransferase P300 has been proposed to be recruited at the promoter of specific endothelial genes by the ETS transcription factor ERG (ETS Related Gene) to control their expression both *in vivo* in zebrafish and in HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) [14,15].

Given the common origin of blood and endothelial cells, and their partially shared transcriptional programs, it is plausible that known chromatin-modifying enzymes affecting hematopoiesis could also control blood vessel formation. Along this line, the epigenetic enzyme Prmt5 (Protein Arginine Methyltransferase 5) has been identified as a key player in blood cell formation [16], but its impact on endothelial development has not been investigated to date. Prmt5 forms a hetero-octameric complex with MEP50 (Methylome Protein 50)/Wdr77 (WD repeat Domain 77) [17], which catalyzes the symmetric di-methylation of arginine residues on a variety of proteins including histones and therefore acts on many cellular processes such as genome organization, transcription, differentiation, cell cycle regulation or

spliceosome assembly [12,18–22]. Prmt5 regulates transcription through the methylation of arginine residues on histones H3 and H4 and has been shown to participate in several differentiation processes such as myogenesis, germ cell differentiation or hematopoiesis [16,23–25]. In mice, *prmt5* knock-out prevents pluripotent cells to form from the inner cell mass and is embryonic lethal [26]. Conditional loss of *prmt5* leads to severe anemia and pancytopenia as Prmt5 maintains Hematopoietic Stem Cells (HSCs) and ensures proper blood cell progenitor expansion by repressing p53 expression [16]. In this context, Prmt5 protects HSCs from DNA damages by allowing the splicing of genes involved in DNA repair [27].

Here, we explored the role of the Protein Arginine Methyltransferase Prmt5 in hematopoiesis and during blood vessel formation in zebrafish. Through loss-of-function approaches by generating a *prmt5* mutant and using *prmt5* morpholinos, we highlighted a key role of Prmt5 in both processes. Interestingly, rescue experiments as well as the use of a drug inhibitor showed that, in contrast with blood cell formation, vascular morphogenesis was independent on Prmt5 methyltransferase activity. Finally, analyses of chromatin architecture impact on reporter gene expression and chromatin immunoprecipitation experiments suggest that while Prmt5 activates transcription in a “classical” way in hematopoiesis, it rather functions as a scaffold protein that provides a proper chromatin conformation to promote endothelial gene expression during vascular morphogenesis.

Results

Prmt5 is required for blood cell formation

To characterize *prmt5* function, we generated a *prmt5* mutant by targeting the second exon of *prmt5* with the CRISPR/Cas9 system. A deletion of 28 nucleotides was obtained, leading to a premature stop codon before the catalytic domain of Prmt5 (Fig 1A). As a consequence, Prmt5, which was expressed ubiquitously in the trunk at 24 hours post fertilization (hpf), was no longer detected in the mutant (Fig 1B and 1C). In order to test whether Prmt5 regulates hematopoiesis in zebrafish, we took advantage of the transgenic line *Tg(gata2b:Gal4;UAS:life-actGFP)* that labels Hematopoietic Stem Cells (HSCs) [28]. HSCs emerge from the ventral wall of the dorsal aorta (DA, Fig 1D and 1D'), before migrating into the Caudal Hematopoietic Tissue (CHT) (Fig 1D) where Hematopoietic Stem and Progenitor Cells (HSPCs) proliferate and undergo maturation [28]. Reminiscent of the situation in mice [16], the loss of *prmt5* led to an increased number of *gata2b*⁺ HSCs in 36 hpf mutant embryos as compared to wild type ones (Fig 1E–1G). In addition, we found that the relative expression of *runx1* or *cmyb*, which are specifically expressed in emerging HSCs, was increased in *prmt5* mutant embryos as compared to wild type embryos (Fig 1H). Of note, *prmt5* loss-of-function by *prmt5*-specific morpholino injection resulted in a similar increase of HSCs as compared to control morphants (S1A Fig). In order to further characterize the role of Prmt5 in HSC proliferation, we assessed the percentage of HSCs (*gata2b*⁺ cells) in mitosis by co-immunostaining for Phospho Histone H3 (P-H3). We found that, as in mouse [16], the increase of HSC number was associated with enhanced proliferation in *prmt5* morphants as compared to control embryos (10.15% versus 1.92% of *gata2b*⁺, P-H3⁺ cells) (S1B and S1C Fig). Altogether, these results suggest that Prmt5 regulates the number of emerging HSCs from the dorsal aorta. We next investigated whether blood cell formation was impaired in *prmt5* zebrafish mutant as described in mouse [16]. HSPCs give rise to different blood cell progenitors, such as lymphoid progenitors which colonize the thymus leading to T lymphopoiesis, but also erythroid or myeloid progenitors that will home in the CHT (Fig 1D) [29]. We found that at 5 days, the number of *gata2b*⁺ HSPCs in the thymus was significantly reduced in *prmt5* mutant as compared to wild-type (Fig 1I–1K). Similarly, imaging the caudal vascular plexus of *prmt5* morphant and control embryos at

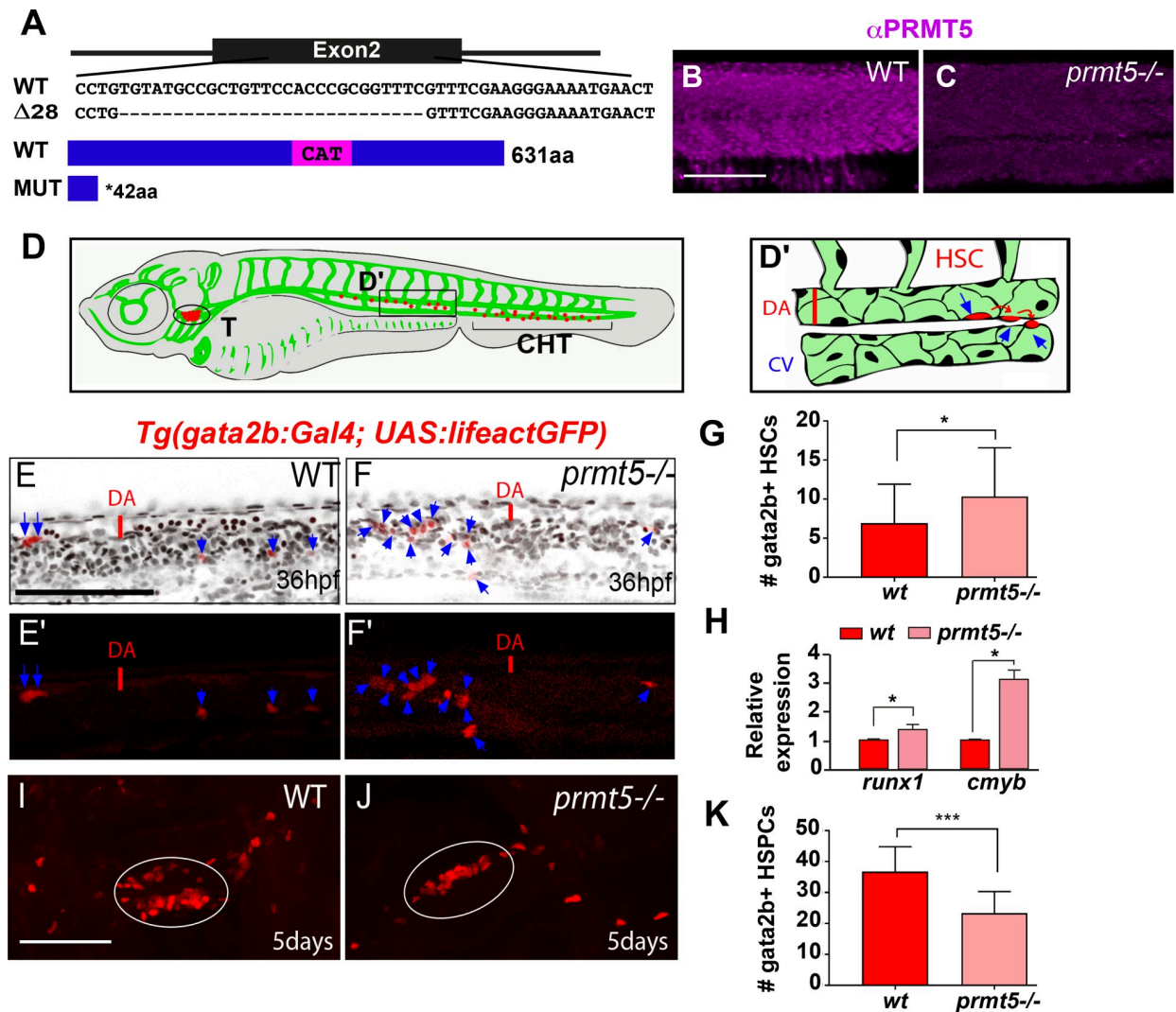


Fig 1. Loss of *prmt5* affect HSCs and HSPCs production. (A) Schematic representation of the sequence targeted by CRISPR/Cas9 leading to a 28 nucleotides deletion, and of wild type and truncated Prmt5 proteins. The catalytic domain “CAT” appears in magenta. (B, C) Confocal sections of immunostaining with anti-Prmt5 antibody of wild type and *prmt5* mutant embryos at 24 hpf. Scale bar 100 μ m. (D) Schematic representation of vascular (green) and hematopoietic (red) systems in a zebrafish larva. Circle and bracket indicate the Thymus (T) and the Caudal Hematopoietic Tissue (CHT), respectively. (D') Close-up of the trunk vasculature where HSCs emerge from the ventral wall of the dorsal aorta (DA), bud and migrate. Red line represents the diameter of the dorsal aorta. Cardinal Vein (CV). (E-F') Confocal projections of transgenic *Tg(gata2b:Gal4; UAS:lifectGFP)* embryos at 36 hpf showing *gata2b*⁺ cells in red and TO-PRO-3 (cell nuclei) in black. Blue arrows indicate HSCs labelled in red in wild type (E, E') and in *prmt5* mutant (F, F') embryos. Scale bar 100 μ m. (G) Average number of HSCs enumerated per confocal stack in wild type and in *prmt5* mutant embryos at 36 hpf. Data are from 3 independent experiments with at least 6 individuals per experiment and a Mann-Whitney test was performed. (H) Relative mRNA expressions determined by RT-qPCR in the trunk of 36 hpf wild type and *prmt5* mutant embryos, from 3 independent experiments with at least 6 animals per condition. T-test was performed. (I, J) Confocal projections of wild type (I) and *prmt5* mutant (J) thymus from transgenic *Tg(gata2b:Gal4; UAS:lifectGFP)* embryos at 5 days. Thymus are delimited by a white circle. Scale bar 100 μ m. (K) Average number of HSPCs enumerated per confocal stack in wild type and *prmt5* mutant embryos at 5 days from 3 independent experiments with at least 5 individuals per analysis. T-test was performed. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009641.g001>

3 dpf showed a reduced number of *gata2b*⁺ HSPCs in the CHT of *prmt5* morphants. Thus, as in mouse [16], Prmt5 seems required for HSPC maintenance in zebrafish (S1D–S1G Fig). Furthermore, analyzing the expression of the common lymphoid progenitor marker *rag1* and of the mature T cell marker *rag2* showed that both genes were downregulated in *prmt5* morphant as compared to control embryos (S1H and S1I Fig). In contrast, the expression of the erythrocyte marker *gata1* was increased and that of the myeloid marker *spi1/pu.1* was not affected

(S1J and S1K Fig). These data suggest that *prmt5* loss impairs lymphoid progenitors and T cell differentiation but promotes the production of erythrocyte without affecting myelopoiesis. In sum, our data support the conclusion that Prmt5 plays an important and conserved role for hematopoiesis in vertebrates.

Prmt5 function in hematopoiesis depends on its methyltransferase activity

To further investigate Prmt5 mode of action in hematopoiesis, we tested whether its enzymatic activity was required in this process. Indeed, Prmt5 function has been shown to be generally due to its enzymatic activity, and since it is upregulated in many types of cancers, it constitutes a promising therapeutic target (for a review, [20]). Hence, intense studies have been undertaken to identify inhibitors of its methyltransferase activity and some of them, such as the EPZ015666 compound, are already tested in clinical trials [30].

To determine the impact of Prmt5 methyltransferase on the fate of *gata2b*⁺ cells in the thymus, we combined morpholino-based loss-of-function with rescue experiments using either a wild-type or a catalytic dead point mutant of human *prmt5* mRNA, all of which have been previously validated [16,23,31]. To first validate the effect of *prmt5* morpholino and the respective rescues, immunostainings were performed on 5 hpf embryos to detect either Prmt5, its obligate co-factor Mep50/Wdr77 or symmetric dimethylarginines (the generic product of arginine methylation by Prmt5 and some other Prmts) on control embryos, *prmt5* morphants and *prmt5* morphants injected with wild-type or with catalytic point mutant *prmt5* mRNA (Fig 2A–2L). As expected, Prmt5 expression was strongly decreased in *prmt5* morphant and was rescued after injection of *prmt5* wild type or point mutated mRNAs (Fig 2A–2D). Interestingly, Mep50/Wdr77 expression followed the same trend as Prmt5, supporting the finding that they regulate each other [32](Fig 2E–2H). Symmetric dimethylation levels slightly decreased in *prmt5* morphants as compared to control embryos and strongly increased upon injection of wild type *prmt5* mRNA but not of *prmt5* mutant mRNA (Fig 2I–2L). This confirms that *prmt5* *wt* mRNA rescues efficiently Prmt5 enzymatic activity while *prmt5* mRNA mutated form is indeed coding a catalytic dead Prmt5 protein. Altogether, these data validate our approach as we observed the loss of Prmt5/Mep50 complex following *prmt5* morpholino injection, the efficient rescue of the complex and of its enzymatic activity by *prmt5* *wt* mRNA, and the rescue of the complex but not of its enzymatic activity with *prmt5* catalytic mutant mRNA. Moreover, Prmt5 immunostaining in 24 hpf embryos validated the efficiency of *prmt5* loss-of-function and rescues at later stage (Fig 2M–2P). Hence, we used this approach to determine whether Prmt5 enzymatic activity was required for the formation of *gata2b*⁺ cells in the thymus at 3 dpf using the *Tg(gata2b:Gal4;UAS:lifeactGFP)* line (Fig 2Q–2T). We found that *gata2b*⁺ cell number was reduced in *prmt5* morphants as compared to control embryos and this effect was rescued upon injection of *prmt5* *wt* mRNA but not of *prmt5* catalytic mutant mRNA (Fig 2Q–2T and 2X). These data underscore the conserved requirement of Prmt5 in hematopoiesis among species, as human *prmt5* mRNA could efficiently rescue Prmt5 function in *prmt5* morphants, as previously shown in myogenesis [23]. More importantly, they also show that Prmt5 enzymatic activity is required for *gata2b*⁺ cell formation in the thymus. To further support these findings, we assessed the impact of the well-established Prmt5 specific inhibitor (EPZ015666) on wild-type zebrafish embryos. EPZ015666 treatment efficiently inhibited Prmt5 activity *in vivo* as increasing concentrations of this drug led to a dose-dependent decrease of global symmetric dimethylarginines, as seen by western blot (Fig 2W). Interestingly, we found that EPZ015666 treatment also led to a decrease of *gata2b*⁺ cell number which was similar to the one observed in *prmt5* morphant (Fig 2U, 2V and 2X). Hence, our data show that Prmt5 enzymatic activity is required for its function in hematopoiesis.

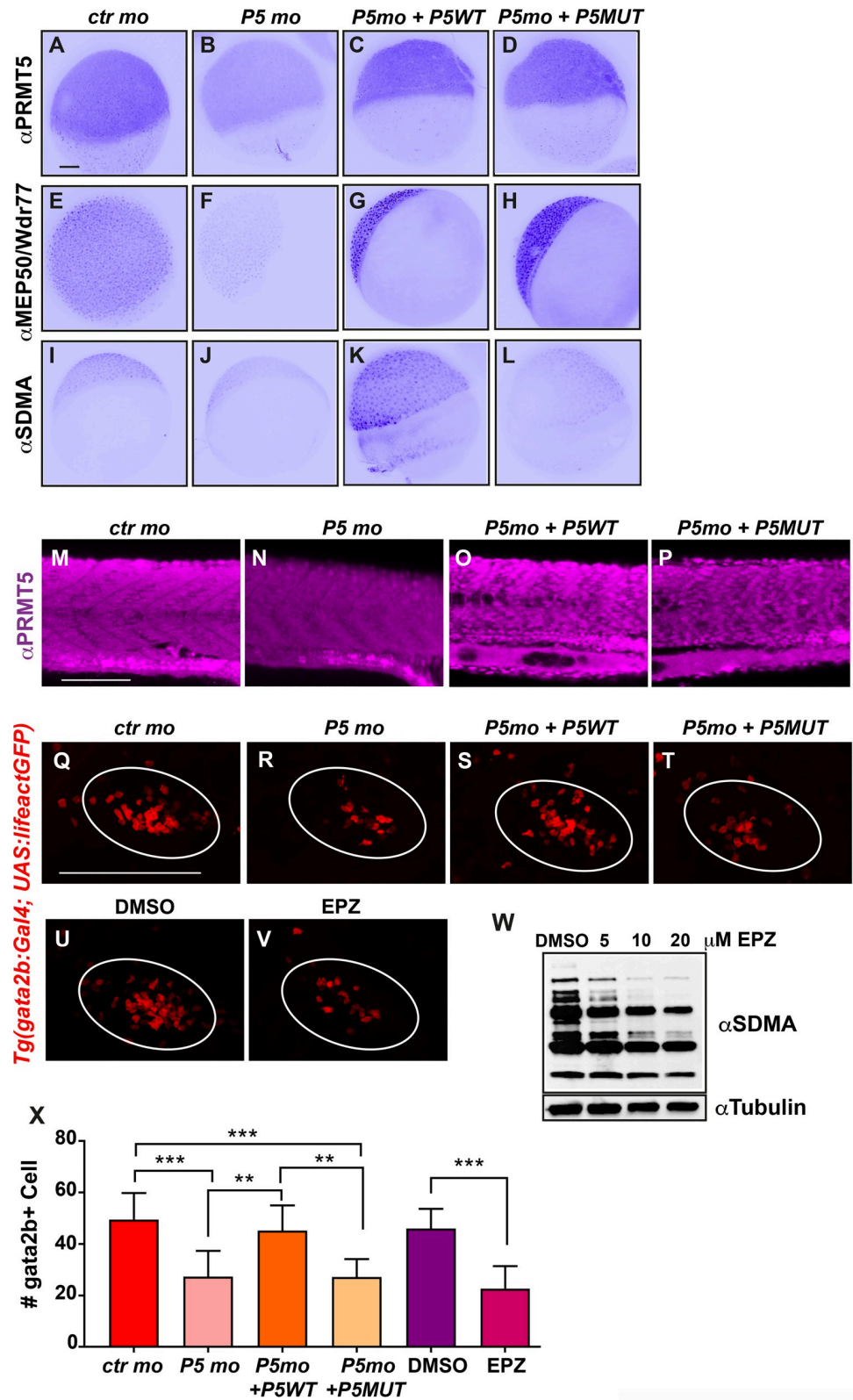


Fig 2. PRMT5 methyltransferase activity is required for HSPC maintenance. (A-D) PRMT5 immunostaining of 5 hpf embryos injected by control morpholino (A), or *prmt5* morpholino only (B) or in combination with *prmt5*WT mRNA (C) or with the catalytic mutant form *prmt5*MUT mRNA (D). (E-H) Immunostaining of embryos as in A-D

with an antibody raised against MEP50/Wdr77 PRMT5 obligate co-factor. (I-L) Immunostaining as in A-D but with an antibody recognizing SDMAs (symmetric Di-Methyl Arginine motifs) which are PRMT5 substrates. Scale bar, 100 μ m. (M-P) Confocal projections of Prmt5 immunostaining of embryos injected by control morpholino (M), or *prmt5* morpholino only (N) or in combination with *prmt5*^{WT} mRNA (O) or with the catalytic mutant form *prmt5*^{MUT} mRNA (P) at 24 hpf. Scale bar 100 μ m. (Q-T) Confocal projections of thymus rudiment from transgenic Tg(*gata2b:Gal4; UAS:lifectGFP*) embryos at 3 days in the same conditions as in M-P. Thymus is delimited by a white circle. (U-V) Confocal projections of thymus rudiment from transgenic Tg(*gata2b:Gal4; UAS:lifectGFP*) embryos treated with either DMSO (U) or 20 μ M of PRMT5 inhibitor EPZ015666 (V) from 30 hpf to 3 dpf. Thymus is delimited by a white circle. Scale bar 100 μ m. (W) Western blot of protein extracts from 24 hpf embryos treated either with DMSO or with increasing concentrations (5–20 μ M) of EPZ015666, revealed with an antibody recognizing SDMAs. Reblotting with α tubulin antibody served as a loading control. (X) Average number of HSPCs enumerated at 3 days per confocal stack in injected embryos as in Q-V. Data are from 2 independent experiments with at least 3 individuals per analysis. T-test was performed. **P<0.01. ***P<0.001.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009641.g002>

Prmt5 is required for vascular morphogenesis

As Prmt5 regulates zebrafish hematopoiesis, we next asked whether Prmt5 could also play a role during blood vessel formation, either during angiogenesis or vasculogenesis. First, we analyzed the expression and localization of Prmt5 by immunostaining in Tg(*fli1a:eGFP*) transgenic embryos, in which endothelial cells can be visualized with *egfp* [4]. We observed that Prmt5 was expressed in early endothelial cells at 14 somite-stage (S2A–S2A' Fig). At 24 hpf, Prmt5 was expressed in endothelial cells of the dorsal aorta (DA) and of the cardinal vein (CV) (S2B, S2B' and S2D Fig) and was also detected in Intersegmental Vessels (ISVs) sprouting from the DA, in the tip cell (leading the sprout) and the stalk cell (S2C, S2C' and S2D Fig). Single cell RNA-sequencing data [33] supported the expression of *prmt5*, but also of its obligate cofactor *wdr77/mep50*, in endothelial cells from 10 hpf to 24 hpf with a slight decrease in the later stages (S2E Fig). We then analyzed whether blood vessel formation was affected in transgenic Tg(*fli1a:eGFP*); *prmt5* mutants at 28 hpf. We found that *prmt5* mutants had a defect for sprouting ISV: some of them did not reach the dorsal part of the trunk and failed to connect with other ISVs to form the Dorsal Longitudinal Anastomotic Vessel (DLAV) (Fig 3A–3C). This defect was associated with a significant reduction of ISV length (Fig 3D) but with no impact on endothelial cell number (Fig 3E). Importantly, *prmt5* morphants reproduced the phenotype observed in *prmt5* mutants *i.e.* a reduced ISV length without any reduction of the cell number per ISV (Fig 3F–3I), further validating the specificity of the morpholinos. The observed size reduction of ISVs is thus most likely the result of an elongation issue rather than a proliferation defect. This effect was not due to a developmental delay at early stage, as transgenic mutants imaged at 48 hpf do present a formed DLAV, but also an increased number of disconnected ISVs (S3A–S3C Fig), likely as a result of impaired vessel elongation. Mutant embryos at 28 hpf also displayed a reduced DA diameter as compared to the control (Figs 3B and 2C, close-ups), suggesting that lumen formation was perturbed. To confirm this result, we made use of the Notch reporter line Tg(*TP1bglob:VenusPEST*)^{s940} in which only the dorsal aorta cells express the transgene while the cardinal vein endothelial cells do not [34,35]. In this context, the area occupied by the dorsal aorta in *prmt5* morphant embryos was significantly reduced as compared to control embryos (Fig 3J–3L). Similarly, at 48 hpf the area occupied by ISVs in mutant embryos was significantly decreased as compared to control embryos (S3D Fig), thus revealing lumen formation defect at later stages.

To get a better insight into the impact of Prmt5 on the dynamics of vascular system formation, we performed time-lapse analyses with the Tg(*Fli1a:eGFP*) line in control and *prmt5* morphant embryos. Time-lapse confocal movies were carried out from 28 hpf to 38 hpf to follow ISV elongation of ISVs and lumen formation. As compared to control, *prmt5* morphants showed impaired formation of ISV lumen and DLAV (Fig 3M and 3N). Indeed, in *prmt5*

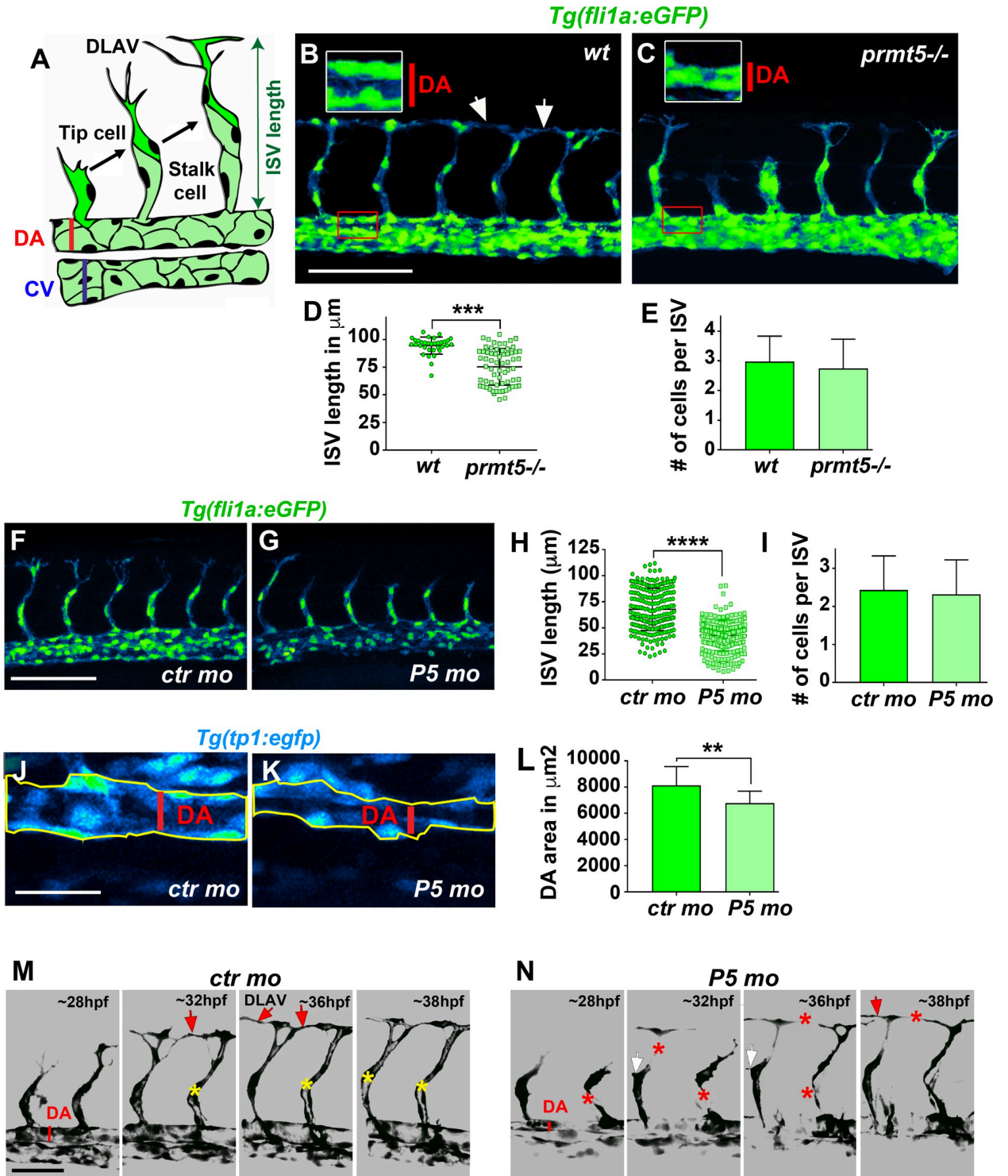


Fig 3. Loss of *prmt5* impairs blood vessel formation. (A) Schematic representation of the trunk vasculature with Intersegmental Vessels (ISV) sprouting from the dorsal aorta (DA). The tip cell leads the cell migration and the stalk cell maintains the connection with the DA. CV: cardinal vein. (B, C) Confocal projections of transgenic *Tg(fli1a:eGFP)*¹ wild-type (B) and *prmt5* mutant (C) embryos at 28 hpf. Red rectangles delimit where DA close ups were made. White rectangles delimit the higher magnification (x2) of the DA with red lines indicating the dorsal aorta diameters. White arrows indicate the connection point between two ISVs to form the Dorsal Longitudinal Anastomotic Vessel (DLAV). Scale bar 100 μm. (D, E) Average ISV length in μm (D) and average number of endothelial cells per intersegmental vessel (E) in control and in *prmt5* mutant embryos from 3 independent experiments with at least 3 animals per condition. T-test and Mann Whitney test were performed, respectively. ** $P < 0.01$,

*** $P < 0.001$. (F, G) Confocal projections of transgenic $Tg(fli1a:GFP)^{y1}$ embryos injected by either control morpholino (F) or *prmt5* morpholino (G) at 28 hpf. Scale bar 100 μm . (H, I) Average ISV length in μm (H) and average number of endothelial cells per ISV (I) in control and *prmt5* morphant embryos, from 4 independent experiments with at least 5 animals per condition. Mann-Whitney test were performed. **** $P < 0.0001$. (J, K) Confocal projections of control morphant (J) and *prmt5* morphant (K) transgenic $Tg(TP1b:glob:VenusPEST)^{s940}$ embryos labelling cells of the DA at 28 hpf. Yellow lines delimit the measured area occupied by the DA. Scale bar 25 μm . (L) Average area occupied by the DA in μm^2 in control and *prmt5* morpholino injected embryos from 2 independent experiments with at least 8 animals per condition. T-test was performed. (M, N) Still images from movies of control (M) and *prmt5* morphant (N) $Tg(fli1a:GFP)^{y1}$ transgenic embryos from 28 to 38 hpf. Red asterisks label missing connections between tip and stalk cells as well as missing connections between tip cells that should lead to DLAV formation. Red arrows point to connecting ISVs leading to DLAV formation. White arrows indicate supernumerary sprouts. Yellow asterisks label the lumen of ISVs. Scale bar 50 μm .

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009641.g003>

morphants tip cells failed to stay connected with the stalk cells and to contact other tip cells to form the DLAV. Moreover, supernumerary connections were detected in *prmt5* loss-of-function. Of note, re-expressing *prmt5* specifically in endothelial cells in *prmt5* morphants was sufficient to rescue partially ISV length (S3E–S3I Fig) as well as *cdh5* expression, a gene down-regulated in *prmt5* mutant (see below), supporting a cell autonomous role for Prmt5 in endothelial cells. Altogether, these data suggest a central role of Prmt5 in vascular morphogenesis.

Prmt5 methyltransferase activity is not required for vascular morphogenesis

Next, we asked whether Prmt5 methyltransferase activity was also required for vascular morphogenesis as observed for blood cell formation. To this end, transgenic $Tg(fli1a:eGFP)$ *prmt5* mutant embryos were injected with either wild-type *prmt5* mRNA or with *prmt5* mRNA mutated in the catalytic site (Fig 4A–4D), or were treated with Prmt5 inhibitor EPZ015666 (Fig 4E and 4F). Surprisingly, both mRNAs were able to restore ISV elongation, as indicated by the average ISV length in injected mutant embryos as compared to non-injected mutants (Fig 4G). However, the average length of ISVs in *prmt5* wild-type-injected mutants was even longer than intersegmental vessels of wild-type embryos, while the average length in *prmt5* catalytic dead-injected mutants was significantly superior to non-injected mutants but similar as control embryos (Fig 4G). Moreover, EPZ015666-treated embryos did not show any significant reduction of ISV length compared to control embryos, further supporting the idea that Prmt5 enzymatic activity is not required for ISV elongation (Fig 4G). Interestingly, no difference could be detected in the cell number per ISV in the different contexts, thus ruling out the possibility that Prmt5 regulates ISV cell proliferation (Fig 4H). Therefore, in contrast to blood cell formation, angiogenesis seems largely independent of Prmt5 methyltransferase activity.

We next wondered whether Prmt5 regulates blood vessel formation through the control of the master regulator Etv2, ETS transcription factors and adhesion proteins, all known to be involved in this process [8–10,36,37]. Analyzing single cell RNA-sequencing data [33] allowed us to confirm that *etv2*, *fli1a*, *fli1b*, *cdh5*, *agtr2* and *esama* are expressed in endothelial cells from 10 hpf and showed that their expression increases from 14 to 24 hpf (S2E Fig). In addition, our previous RNA-seq results show that these 5 genes are essentially expressed in endothelial cells and not in other cell types in 24 hpf embryos (S1 Table)[38]. To test whether Prmt5 could regulate the expression of these genes, RT-qPCR experiments were performed on *prmt5* mutant embryos and on their wild-type counterparts (Fig 4I–4K). As expected, *prmt5* expression was reduced in the mutant but *etv2* expression was not affected (Fig 4I and 4J). However, the expression of ETS transcription factors (*fli1a*, *fli1b*) and adhesion proteins (*cdh5*, *agtr2* and *esama*), all putative Etv2 target genes [6,7], was significantly reduced in *prmt5* mutant (Fig 4K). Of note, the reduction of *fli1a* and *cdh5* expression as detected in *prmt5* mutant by RT-qPCR was confirmed by *in situ* hybridization in the hemogenic endothelium (S3J–S3S Fig). That *etv2* expression was unaffected by the loss of *prmt5* whereas its targets

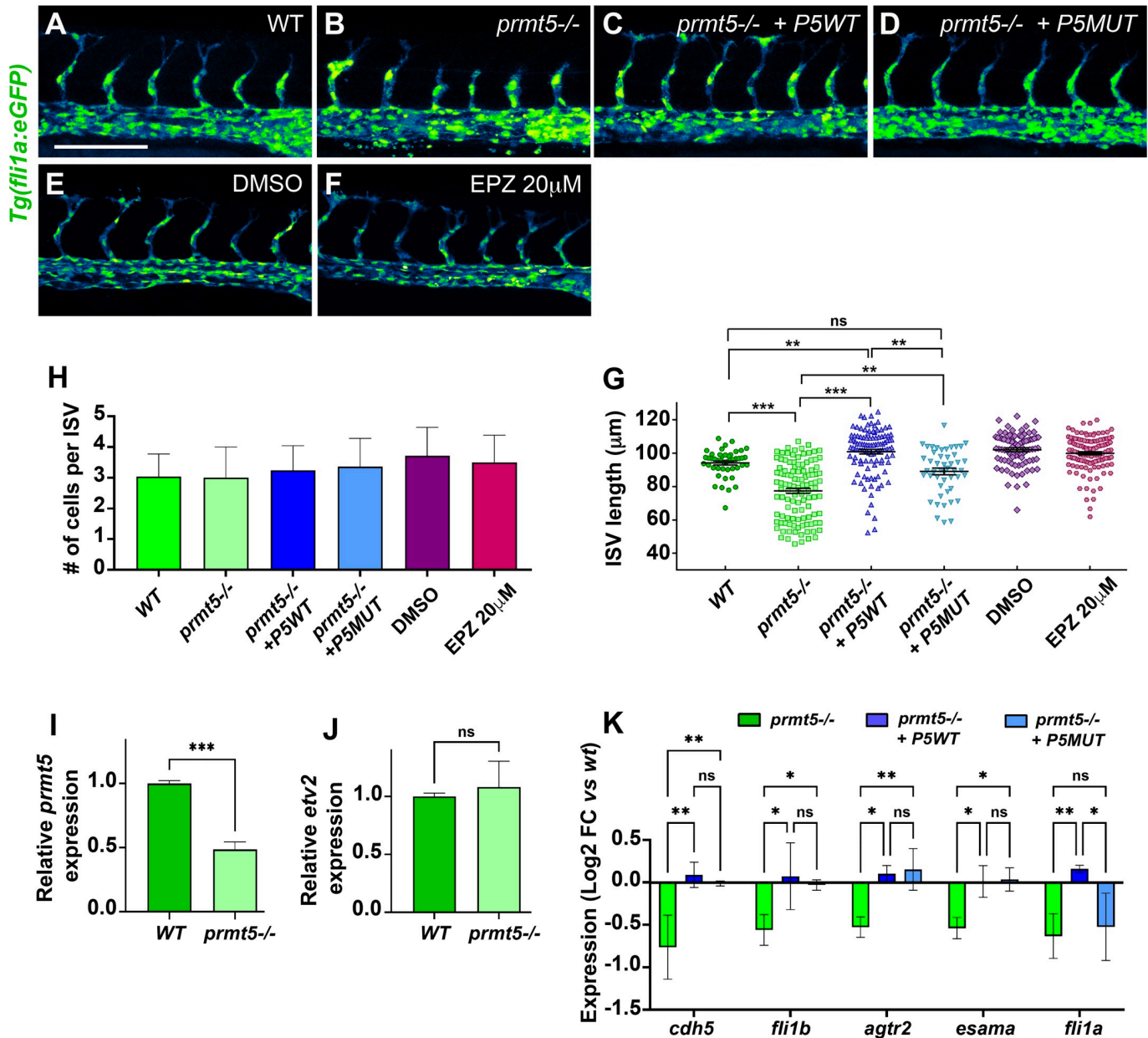


Fig 4. Prmt5 requirement for vascular morphogenesis is independent of its methyltransferase activity. (A–D) Confocal projections of transgenic *Tg(fli1a:eGFP)*^{y1} embryos at 28 hpf. Wild type embryo is on the top left panel (A), *prmt5* mutant embryos were not injected (B) or injected with either *prmt5*^{WT} mRNA (C) or the mutant form *prmt5*^{MUT} mRNA (D). Scale bar 100 μm. (E, F) Confocal projections of transgenic *Tg(fli1a:eGFP)*^{y1} embryos treated with either DMSO (E) or EPZ 20 μM (F) from 9 hpf to 28 hpf. (G, H) Average ISVs length in μm (G) and average number of endothelial cells per ISVs (H) of embryos. Data were from 3 independent experiments with at least 3 animals per condition. Kruskal-Wallis test (G) and One-way ANOVA (H) were performed. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, **** P<0.0001. (I, J) Relative expression of *prmt5* (I) or *etv2* (J) mRNA by RT-qPCR on 28 hpf wild type and *prmt5* mutant embryos from 3 independent experiments with at least 6 animals per condition. T-test was performed. ****P<0.001. (K) Log2 fold change expression relative to wt embryos of *cdh5*, *fli1b*, *agtr2*, *esama* and *fli1a* mRNAs by RT-qPCR on 28 hpf *prmt5* mutant embryos not injected or injected by either *prmt5*^{WT} or *prmt5*^{MUT} mRNAs, from at least 2 independent experiments with a minimum of 6 animals per condition. Two-way ANOVA was performed. * P<0.05. ** P<0.01.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009641.g004>

were down-regulated suggests that Prmt5 is required to promote Etv2 target gene expression. Interestingly, RT-qPCR experiments on the tails of *prmt5* mutant embryos injected with either wild-type *prmt5* mRNA or *prmt5* mRNA mutated in the catalytic activity revealed that both mRNAs were able to restore the expression of all Etv2 target genes, except *fli1a* whose

expression was only rescued by *prmt5* wild-type (Fig 4K). In sum, these results indicate that Prmt5 controls blood vessel formation by regulating Etv2 target genes mostly independently of its methyltransferase activity.

Prmt5 might regulate gene expression by shaping correct chromatin conformation in endothelial cells

As Prmt5 methyltransferase activity seems dispensable for gene activation during vascular morphogenesis, we speculated that Prmt5 could act as a scaffold protein in complexes mediating transcription and chromatin looping. Indeed, Prmt5 has been proposed to promote enhancer-promoter looping at the PPAR γ 2 locus and more broadly to facilitate chromatin connection in adipocytes, *via* the recruitment of the Mediator subunit MED1 and the SWI/SNF chromatin remodeling complex subunit Brg1 [39]. Thus, we decided to inspect the chromatin architecture of the flanking region of Prmt5-regulated genes using ATAC-seq data from zebrafish endothelial cells [38]. Doing so, we found putative endothelial-specific enhancers in *agtr2*, *cdh5*, *esama*, *fli1a* and *fli1b*. Interestingly *cdh5*, *esama* and *fli1b* loci presented enhancers at relatively long distances (>10kb) from the transcriptional start site (TSS) suggesting that their expression could be regulated by Prmt5 through the formation of chromatin loop (S4 Fig). To explore this hypothesis, we performed chromatin immunoprecipitation experiments to test whether Prmt5, MED1 and/or Brg1 were recruited to the promoters as well as to the putative distant endothelial enhancers of these three genes. Of note, similar to Prmt5, MED1 and Brg1 were expressed in endothelial cells at 24 hpf [38](S1 Table). Importantly, ChIP experiments showed that Prmt5, MED1 and Brg1 were all binding to *cdh5* promoter and to its putative enhancer, though at different levels (2–3 fold enrichment for Prmt5 and MED1; 4–8 fold for Brg1), this variation being probably due to antibody efficiency differences between these factors (Fig 5A and 5B). Also, since *cdh5* expression is restricted to endothelial cells, which correspond to a small proportion of cells within whole embryos, it was not surprising to observe a relatively weak enrichment in ChIP assays. Testing *esama* promoter and its four putative enhancers by ChIP showed a recruitment of all three cofactors on the promoter and on Enhancer 3 (E3), but no recruitment on the three other enhancers (E1, E2 and E4) (Fig 5C and 5D). Furthermore, we observed a similar scenario for *fli1b*, *i.e.* an efficient binding of Prmt5, MED1 and Brg1 to the promoter and to enhancer 4 (E4), but no recruitment of these proteins on enhancer 5 (E5) (Fig 5E and 5F). Hence, our ChIP data indicate that Prmt5, MED1 and Brg1 are recruited altogether on promoters and on selected distal enhancers of *cdh5*, *esama* and *fli1b*. These results suggest that the three factors could participate to a chromatin loop between the promoter and the corresponding enhancer of these genes to activate their expression.

In order to gain further insight into the role of Prmt5 in supporting chromatin looping to induce endothelial gene expression, we made use of two reporter transgenes in which the *cdh5* enhancer, which we found to be bound by Prmt5, MED1 and Brg1, is either in its natural context (*i.e.* largely separated from its promoter) or inserted just before its promoter. First, we analyzed the expression of the *TgBAC(cdh5:GAL4FF) Gal4* transgene that contains the sequence of an optimized version of Gal4VP16 (*GAL4FF*) inserted in the endogenous chromatin context of *cdh5*, *i.e.* at the TSS of *cdh5*, between its promoter and putative enhancer distant of ~20kb, as defined by the presence of two ATAC-seq positive regions (Figs 5G and S4)[38,40]. Therefore, in double transgenic individuals *TgBAC(cdh5:GAL4FF);Tg(UAS:GFP)*, the level of GFP fluorescence intensity correlates with endogenous *cdh5* expression. Comparing the level of fluorescence intensity in *TgBAC(cdh5:GAL4FF);Tg(UAS:GFP)* transgenic line in control condition and in the context of *prmt5* knock-down, we observed a strong reduction of GFP

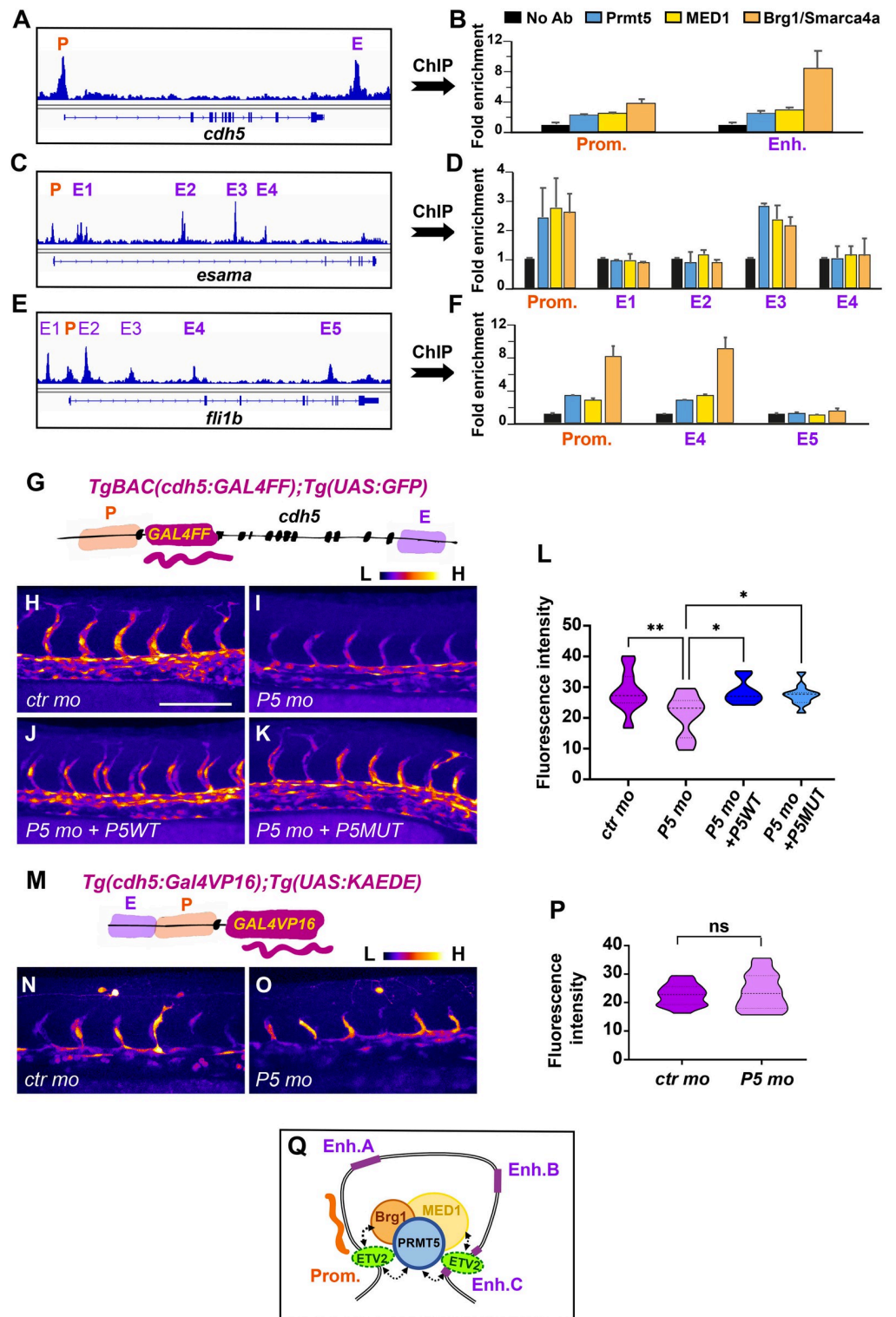


Fig 5. Prmt5 promotes chromatin looping. (A-F) ChIP experiments with the indicated antibodies on *cdh5* (A, B), *esama* (C, D) and *Fli1b* (E, F) regulatory sequences. P, promoter; E, enhancer. Samples were analyzed in duplicates from 2 experiments. Fold enrichment was calculated relative to the input and to a negative region on the genome and then relative to the mock ChIP (No antibody). (G) Schematic representation of the transgene *TgBAC(cd5:GAL4FF)* containing two putative cis-regulatory elements, a promoter region (P) and an enhancer (E), separated by ~20kb with the *GAL4FF* reporter gene inserted

at the TSS of *cdh5*. (H-K) Confocal projections of transgenic *TgBAC(cdh5:GAL4FF);Tg(UAS:GFP)* embryos at 28 hpf. Control morphant is on the top left panel (H), *prmt5* morphant embryos were not injected (I) or injected by either *prmt5*^{WT} mRNA (J) or the catalytic mutant form *prmt5*^{MUT} (K) mRNA. The fluorescent intensity is colored-coded, from the Low intensity (L) in black to High intensity (H) in white. Scale bar 100 μ m. (L) Average GFP fluorescence intensity per confocal projection for control, *prmt5* morphant embryos not injected or injected by *prmt5*^{WT} mRNA or *prmt5*^{MUT}, from 3 independent experiments with at least 3 animals per condition. One-way ANOVA was performed. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (M) Schematic representation of the transgene *Tg(cdh5:GAL4VP16)* containing the two putative *cis*-regulatory elements next to each other (E and P), upstream of *GAL4VP16* reporter gene. (N, O) Confocal projection of transgenic *Tg(cdh5:GAL4VP16);Tg(UAS:KAEDE)* embryos at 26 hpf injected with either a control morpholino (N) or a *prmt5* morpholino (O). The fluorescence intensity is color-coded, from the Low intensity (L) in black to High intensity (H) in white as in panels (H-F). (P) Average KAEDE fluorescence intensity for control and for *prmt5* morphant embryos, from 3 independent experiments with at least 5 animals per condition. T-test was performed. (Q) Proposed model to depict the function of Prmt5 in zebrafish endothelial cells. The transcription factor Etv2 bound on promoters and selective enhancers of endothelial specific genes, could recruit a complex including Prmt5, Brg1 and the mediator complex which favors the formation of a chromatin loop thereby facilitating the transcription of these genes. Dashed lines indicate potential interactions for the recruitments of Prmt5, Brg1 and/or the mediator complex by Etv2.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009641.g005>

fluorescence intensity in *prmt5* morphants (Fig 5H, 5I and 5L), thus confirming that Prmt5 is required for *cdh5* expression in an endogenous context. Interestingly, injecting either wild-type *prmt5* mRNA or mutated in Prmt5 catalytic activity in *prmt5* morphants rescued efficiently *cdh5* expression and restored GFP fluorescence intensity (Fig 5J–5L). These results further support the conclusion that Prmt5 directly regulates *cdh5* transcription in an enzymatic-independent manner. Second, we analyzed the expression of the *Tg(cdh5:Gal4VP16)* transgenic line in which *cdh5* promoter and putative enhancer were cloned next to each other, both upstream of the *Gal4VP16* coding sequence (Fig 5M). In double transgenic embryos *Tg(cdh5:Gal4VP16); Tg(UAS:KAEDE)*, the fluorescence intensity of the protein KAEDE is an artificial read out of *cdh5* transcription for which chromatin looping is not required. In these double transgenic embryos, the fluorescent protein KAEDE was expressed in blood vessels (Fig 5N), validating that the putative enhancer and the promoter region of *cdh5* are sufficient to drive specific gene expression in endothelial cells. Strikingly, *prmt5* morpholino injection had no effect on the level of KAEDE fluorescence intensity as compared to control morphants (Fig 5N–5P). Hence, it appears that tethering *cdh5* enhancer to the vicinity of its promoter is sufficient to bypass the requirement for Prmt5 to activate it.

Collectively, our chromatin immunoprecipitation experiments and our analyses of chromatin architecture impact on *cdh5* reporter gene expression suggest that Prmt5 regulates transcription by acting as a scaffold protein that facilitates chromatin looping of certain genes involved in vascular morphogenesis (Fig 5Q).

Discussion

Here we demonstrate a role for Prmt5 in both hematopoiesis and blood vessel formation in zebrafish. We found that, as in mouse [16], Prmt5 plays an important role in zebrafish hematopoiesis by controlling HSC emergence and HSPC expansion and that this function depends on Prmt5 enzymatic activity. We also describe for the first time the involvement of Prmt5 in vascular morphogenesis, whereby it controls the expression of key ETS transcription factors and adhesion molecules, and we showed that this function is in good part independent of its methyltransferase activity. Analyses based on reporter gene expression and chromatin immunoprecipitation experiments led us to propose that Prmt5 regulates transcription by acting as a scaffold protein that facilitates chromatin looping to promote the expression of genes involved in vascular morphogenesis.

Our finding that Prmt5 controls the expression of ETS transcription factors and adhesion proteins in endothelial cells is further supported by the fact that *prmt5* loss-of-function

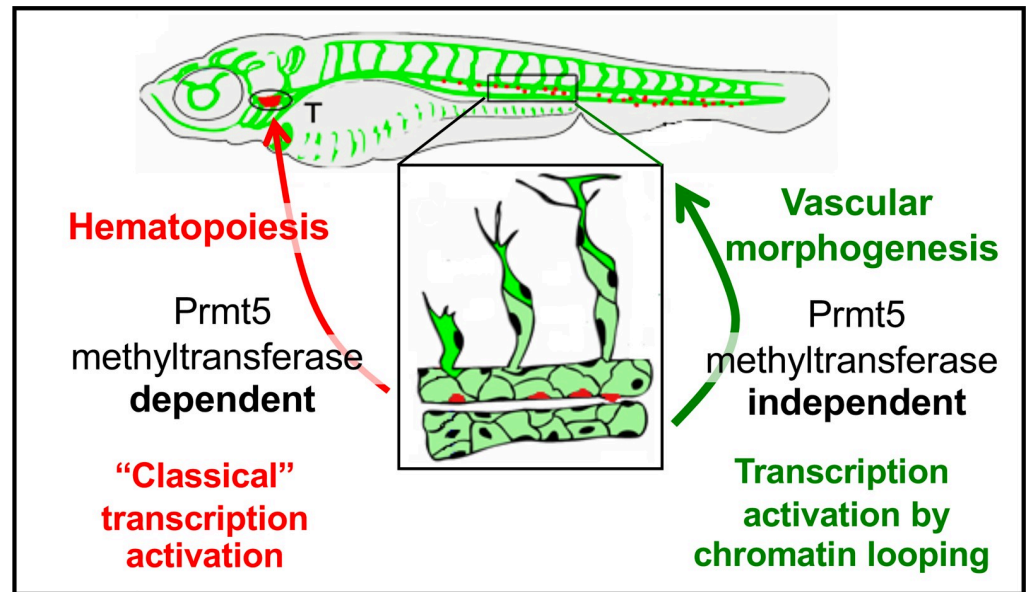


Fig 6. Schematic representation of the two distinct roles of Prmt5 during the formation of hematopoietic lineages and blood vessels, relying or not on its methyltransferase activity, respectively.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009641.g006>

partially phenocopied loss-of-function(s) of these genes. Indeed, it was shown that knocking-down individual ETS proteins had limited effect on sprout formation, while the combination of morpholinos against both *fli1a*, *fli1b* and *ets1* led to a decreased number of vessel sprouts at 24 hpf [37]. Moreover, the disconnected stalk and tip cells and delayed formation of DLAV that we observed in *prmt5* mutant phenocopied the loss-of-function of both *cdh5* and *esama* [8,9]. However, *cdh5* loss had no effect on HSC emergence or HSPC expansion [41], suggesting that Prmt5 acts on different set of genes in endothelial cells and in emerging HSCs. In agreement with this hypothesis, Tan et al. proposed that Prmt5 plays a critical role in HSC quiescence through the splicing of genes involved in DNA repair [27]. Consistent with our findings, this study also showed that Prmt5 methyltransferase activity was required for controlling HSC quiescence. Importantly though, our data revealed that the methyltransferase activity of Prmt5 is largely dispensable in endothelial cells, reinforcing the idea that Prmt5 regulates transcription by different mechanisms in these two processes (Fig 6).

Prmt5 has been shown to facilitate ATP-dependent chromatin remodeling to promote gene expression in skeletal muscles and during adipocyte differentiation [24,31,39,42]. Here, we propose that Prmt5 could also be essential for proper chromatin looping in endothelial cells. Indeed we found that Prmt5 influences gene expression in contexts supporting chromatin looping (e.g. *cdh5* and *TgBAC(cdh5:GAL4FF)*), while it is dispensable for gene expression when enhancer and promoter regions are artificially associated (e.g. *Tg(cdh5:Gal4VP16)*). Moreover, our ChIP experiments revealed the binding of Prmt5 but also of MED1 and Brg1 to the promoters and to specific distal enhancers of *cdh5*, *esama* and *fli1b*, which are regulated by Prmt5 in an enzymatic-independent way. MED1 or Brg1 have been shown to participate in the formation of chromatin loop between promoter and distant enhancer in several cases [43–47] and notably at the *PPAR γ 2* locus in mouse adipocyte cell culture, where they act together with Prmt5 [39]. This implies that Prmt5 could interact with Brg1 and MED1 to induce promoter-enhancer looping in endothelial cells *in vivo*. Interestingly, *brg1* mutant mouse embryos display an anemia coupled to vascular defects in the yolk sac, characterized by thin vessels and

supernumerary sprouts [13], which is reminiscent to our present findings in zebrafish with *prmt5* mutant. In addition, it has been proposed that the Mediator complex regulates endothelial cell differentiation [48]. It is thus tempting to speculate that Prmt5, Brg1 and MED1 act together to mediate chromatin looping and gene activation in endothelial cells (Fig 5Q).

The presence of Prmt5 and Brg1 at promoter regions of *PPAR γ 2* or *myogenin* was associated with dimethylated H3R8 (histone 3 arginine 8) and *prmt5* knock-down led to a reduction of both histone methylation and chromatin loop formation [42,49]. However, these studies did not assess whether the ability of Prmt5 to facilitate chromatin looping at these loci was functionally linked to its methyltransferase activity. Our data suggest that chromatin looping favored by Prmt5 does not require its methyltransferase activity. Indeed, rescue experiments demonstrated that Prmt5 was able to restore gene expression independently of its enzymatic activity, with the exception of *flila* expression. Since *flila* putative enhancers are located at proximity from its promoter, chromatin looping might not be required for *flila* expression and Prmt5 might essentially act here through its methyltransferase activity. Yet chromatin looping might not be the only enzymatic-independent mode of action of Prmt. Indeed, we did not identify distant enhancers for *atgr2*, whose expression was rescued by a catalytic-dead Prmt5. However, it is also possible that *atgr2* distal enhancers were not clearly apparent or were located too distally to be identified in the ATAC-seq data. Hence, depending on the context and the target genes, Prmt5 could modulate gene expression in endothelial cell through promotion of chromatin interaction and/or *via* histones/proteins modification. Still, in light of our results from rescue experiments and drug inhibitor treatments, the most critical functions of Prmt5 in vascular morphogenesis *in vivo* appear to be independent of its enzymatic activity.

Which transcription factor mediates Prmt5 recruitment to its target genes in endothelial cells remains unknown. ChIP-seq data available in mouse revealed that some flanking regions of orthologues of the Prmt5 target genes *cdh5*, *esama* and *flilb* are bound by Etv2 [6]. Moreover, similar to *prmt5* mutant, *etv2* zebrafish mutant display abnormal vasculature at 48 hpf characterized by defective lumen formation, defective vessel extension and aberrant connections [36,37]. Hence, Etv2 could be involved in the recruitments of Prmt5 to *cis* regulatory regions of endothelial genes. However, we could not confirm this hypothesis as none of the commercially available Etv2 antibody was functional in our hands. Another crucial player of blood vessel formation is the transcription factor Npas4l, which is expressed during late gastrulation and regulates *etv2* expression [50]. Npas4l ChIP-seq data analysis revealed the binding of this transcription factor to several *cis*-regulatory regions of Prmt5 target genes identified in the present work. Hence, Npas4l could participate to the recruitment of Prmt5 to endothelial genes. Even though highly challenging technically due to the low amounts of endothelial cells in fish embryo, Cut&Run experiments in sorted endothelial cells against afore mentioned factors or any other factor of interest, combined with HiC data and the corresponding RNA-seq/ATAC-seq experiments in wild-type or mutant conditions for *Prmt5* would certainly help to identify Prmt5 target genes and its global impact on chromatin organization.

Finally, it is worth mentioning that Prmt5 has been proposed as a therapeutic target in many diseases, including cancer [12]. In light of our result, targeting Prmt5 might also reduce tumor growth indirectly by inhibiting tumor angiogenesis. Along that line, it was recently shown in a zebrafish xenotransplantation model that Etv2 and Fli1b are required for tumor angiogenesis [51]. Several Prmt5 inhibitors have been discovered in the past decade and some have been tested in clinical trials for the treatment of tumors (reviewed in [52]). However, these compounds were developed and validated for their ability to inhibit Prmt5 enzymatic activity [53]. Yet, we show here that Prmt5 acts at least in part, independently of its methyltransferase activity to regulate vascular morphogenesis and it is possible that enzymatic-independent function of Prmt5 controls other physiological and pathological situations. Hence,

our data shed light on a mechanism of action of Prmt5 that will be insensitive to the aforementioned enzymatic inhibitors and calls for the design of alternative drugs *i.e.* specific inhibitors of the interaction between Prmt5 and Etv2, MED1 or Brg1 for example.

In conclusion, our study highlights different modes of regulation of gene expression by Prmt5 in endothelial cells *in vivo* and underscores the importance of its enzymatic-independent function in chromatin looping. This non-canonical function of Prmt5 may have a more pervasive role than previously thought and certainly deserves more attention in the future.

Materials and methods

Ethics statement

Fish were handled in a facility certified by the French Ministry of Agriculture (approval number A3155510). The project has received an agreement number APAFIS#7124–20161 00517263944 v3. Anesthesia and euthanasia procedures were performed in Tricaine Methanesulfonate (MS222) solutions as recommended for zebrafish (0.16 mg/ml for anesthesia, 0.30 mg/ml for euthanasia). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering, in accordance with the guidelines from the European directive on the protection of animals used for scientific purposes (2010/63/UE) and the guiding principles from the French Decret 2013–118.

Zebrafish care and maintenance

Embryos were raised and staged according to standard protocols and the Recommended Guidelines for Zebrafish Husbandry Conditions [54,55]. The establishment and characterization of *Tg(gata2b:Gal4;UAS:lifeactGFP)*, *Tg(fli1a:eGFP)*, *Tg(TP1b:glob:VenusPEST)s940*, *TgBAC(cdh5:GAL4FF);Tg(UAS:GFP)*, *Tg(UAS:KAEDE)* have been described elsewhere [4,28,34,40,56]. Lines generated in this study are described below. Embryos were fixed overnight at 4°C in BT-FIX, after which they were immediately processed or dehydrated and stored at –20°C until use.

Plasmid construction

To construct the transgene *Tg(cdh5:GAL4VP16)*, we cloned the putative *cdh5* promoter (*cdh5P*) and enhancer (*cdh5E*) elements into *pme_mcs* and *p5E_GGWDest+* (Addgene #49319) [57,58] using XhoI, EcoRI and BsaI to generate *pme_cdh5P* and *p5E_cdh5E*, respectively. The Gal4VP16 sequence from *pme_Gal4VP16* [58] was then introduced downstream of *cdh5P* into *pme_cdh5P* using BamHI and SpeI. A multisite LR recombination reaction (Gateway LR Clonase II Enzyme mix, Invitrogen) was then performed using *p5E_cdh5E*, *pme_cdh5P:Gal4VP16*, with *pminTol-R4-R2pA* to give *pminTol_cdh5E-cdh5P:Gal4VP16*. *prmt5* coding sequence from pBluescript II KS+ PRMT5 WT [31] was consecutively cloned into pCS2+ and *pme_mcs* by using BamHI/EcoRI and BamHI/XbaI respectively. Then it was cloned into *pDest insUAS R1R2 CC* using LR clonase II (Thermo Fisher Scientific), to produce *pinsUAS:PRMT5*. 535pb and 430pb of respectively *cdh5* and *fli1a* coding sequences were cloned into PGEM-T vector (Promega) for riboprobes production. Oligonucleotide sequences are listed in [S2 Table](#).

Generation of *prmt5*^{-/-} mutants by CRISPR/cas9

The guide RNA (gRNA) was designed using CHOPCHOP CRISPR Design website [59]. The designed oligos were annealed and ligated into pDR274 after digestion of the plasmid with BsaI (NEB). The gRNA was prepared *in vitro* using the MEGAshortscript T7 transcription kit

(Ambion) after linearizing the plasmid with *DraI* (NEB) [60] before being purified using Illustra MicroSpin G-50 Columns (GE Healthcare). 1 nL of a solution containing 10 μM EnGen Cas9 NLS (NEB) and 100 ng/μl of gRNA was injected at the one-cell stage. WT, heterozygous, and homozygous *prmt5* animals were identified by PCR. Oligonucleotide sequences are listed in [S2 Table](#).

Microinjections

Tg(cdh5:GAL4VP16);Tg(UAS:KAEDE) and *Tg(UAS:PRMT5)* lines was generated using pmin-Tol-*cdh5E-cdh5P:Gal4VP16* and *pinsUAS:PRMT5*, respectively by Tol2 transposition as described previously [61]. Control and *prmt5* morpholino oligonucleotides (MOs) were described previously [23]. Embryos from in-crosses of the indicated heterozygous carriers or wild-type adults were injected at one cell stage with 6 ng of MO. pBluescript II KS+ PRMT5 WT and pBluescript II KS+ PRMT5 Mutant [31] were linearized by *EcoRI* (NEB) and transcribed by T7 (Promega). 200 pg *prmt5*WT mRNA, or *prmt5*MUT mRNA were injected at one cell stage.

EPZ015666 treatment

Embryos were treated with 5 μM, 10 μM or 20 μM of the Prmt5 inhibitor EPZ015666 (Sigma-Aldrich) or with DMSO from 90% epiboly to 20 hpf (WB) or from 30 hpf to 3 dpf (RT-qPCR).

RNA extraction, Reverse transcription and real-time PCR

Embryos were dissected at the indicated stage after addition of Tricaine Methanesulfonate. Genomic DNA was extracted from dissected embryo heads to identify their genotype and the corresponding dissected tails were conserved in TRIzol Reagent at -20°C. After identification of wild-type and mutant embryos, total RNAs from at least 6 identified tails were extracted following manufacturer's instructions (Invitrogen). Total RNAs were converted into cDNA using Prime Script cDNA Synthesis Kit (Takara) with Oligo(dT) and random hexamer primers for 15 min at 37°C according to manufacturer's instructions. cDNAs were then diluted 20-fold and quantified by qPCR using SsoFast Evagreen Supermix (Bio-Rad) and specific primers. Data were acquired on CFX96 Real-Time PCR detection System (Bio-Rad). Samples were analyzed in triplicates and the expression level was calculated relative to zebrafish house-keeping gene *EF1α*. Oligonucleotide sequences are listed in [S2 Table](#).

Live imaging

For the transgenic lines *TgBAC(cdh5:GAL4FF);Tg(UAS:GFP)* and *Tg(cdh5:GAL4VP16);Tg(UAS:KAEDE)*, and *Tg(fli1a:eGFP)* embryos were placed in 1.5% low melt agarose with Tricaine on a glass-bottomed culture dish filled with egg water. Images were acquired using the confocal microscope TCS SP8 (Leica Microsystems) with an L 25 × /0.95 W FLUOSTAR VIZIR objective (zoom X1.25) using the scanner resonant mode. Confocal stacks were acquired every 10 min from 28 to 38 hpf to generate movies.

Immunostaining and *in situ* hybridization

After fixation or rehydration, embryos were washed twice with Phosphate Buffered Saline/1% Triton X-100 (PBST), permeabilized with PBST/0.5% Trypsin for 30 sec and washed twice again with PBST. After blocking with PBST/10% Fetal Calf Serum (FCS)/1% bovine serum albumin (BSA) (hereafter termed 'blocking solution') for at least 1 h, embryos were incubated with antibodies directed against GFP (Torrey Pine, Biolabs), Prmt5 (Upstate #07405), MEP50/

Wdr77 (Cell Signaling Technology #2823) or Symmetric Di-Methyl Arginine Motif (SDMA, Cell Signaling Technology #13222) in blocking solution overnight at 4°C followed by 5 washing steps with PBST. Embryos were then incubated with the appropriate Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies (Molecular Probes) for at least 2 h at room temperature and washed three times. Nuclei were then stained with TO-PRO3 (Molecular Probes) and washed twice with PBST. Embryos were dissected, flat-mounted in glycerol and images were recorded on a confocal microscope as above. *In situ* hybridization was carried out as previously described [35]. Riboprobes were produced by linearizing PGEMT-cdh5 and PGEMT-fli1a vector by SacII and *in vitro* transcription by SP6 polymerase. Embryos were dissected, flat-mounted in glycerol and images were recorded on a confocal microscope as above or using the confocal Zeiss LSM 880.

Western blots

20 hpf Embryos were lysed in 2x Laemmli sample buffer (4% SDS, 20% glycerol, 125mM Tris-HCl pH 6.5, 0.004% bromophenol blue, 10% β -2-mercapthoethanol). Proteins equivalent to 6 embryos were loaded and samples were separated by SDS-PAGE before being transferred to Nitrocellulose membranes. Membranes were blocked 1h at room temperature (10% milk, 0.1% Tween TBS) and probed at 4°C overnight (2% milk, 0.1% Tween TBS) with α -Symmetric Di-Methyl Arginine Motif (SDMA, Cell Signaling Technology #13222) and α -Tubulin (Sigma-Aldrich #T-6199) primary antibodies. After several washings, membranes were incubated with appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies for 1h. Detection was performed using Clarity Western ECL substrate (Bio-Rad) according to manufacturer's instruction and signals were analyzed with the ChemiDoc MP Imaging System device (Bio-Rad).

Chromatin immunoprecipitations

20 hpf dechorionated embryos were fixed in 1.85% formaldehyde in fish water for 15 min at room temperature. Glycine was then added to a final concentration of 125 mM at room temperature for 5 min to quench formaldehyde. Embryos were then rinsed three times in ice cold PBS at 4°C and were snap frozen in liquid nitrogen. Embryos (400 embryos/ChIP) were lysed in buffer containing 10 mM Tris-HCl pH7.4, 10 mM NaCl, 0.5% NP-40 supplemented with protease inhibitors and were then spun at 3500 rpm for 5 min at 4°C. The pellet was resuspended in 100 μ l nuclei lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH7.4, 10 mM EDTA, 1% SDS + protease inhibitors) and incubated for 10 min at 4°C. Two volumes of IP dilution buffer (16.7 mM Tris-HCl pH7.4, 167 mM NaCl, 1.2 mM EDTA, 1.1% Triton X-100, 0.01%SDS + protease inhibitors) were then added before proceeding to the sonication with a Bioruptor device (Diagenode) to get fragments of 300–500 nucleotides. Samples were spun at 14000 rpm for 10 min at 4°C and the supernatant was transferred to a new tube. Protein A and protein G agarose beads (Sigma-Aldrich) saturated with PBS containing 0.5% BSA were added to the samples for the pre-clearing step for 4 h at 4°C on a rotating wheel. After a short centrifugation, 3 μ g of the following antibodies were added to each supernatant: anti-Brg1 (#NB100-2594, Novus Biologicals), anti-PRMT5 (mix of #07–405, Upstate Biotechnology and #MA1-25470, Invitrogen), anti-MED1/PPARBP (#H00005469, Abnova). A mock ChIP with no antibody, was included as a control. After 4 h of incubation with antibodies, protein A and protein G agarose beads were added to the mix and incubation was carried on overnight at 4°C on a rotating wheel. The day after, beads were washed twice in RIPA buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.1% sodium deoxycholate) then three times in LiCl solution (10 mM Tris-HCl pH8.0, 250 mM LiCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 0.5% sodium

deoxycholate) and finally twice in TE (10 mM Tris-HCl pH8.0, 1 mM EDTA). Proteins on beads were then eluted twice in 10 mM Tris-HCl pH8.0, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 1% SDS during 15 min at 65°C. The supernatants were adjusted to a final concentration of 200 mM NaCl before incubation at 65°C overnight to reverse the crosslink. The day after, RNase A was added for 1 h at 37°C before proceeding to proteinase K treatment. DNA was purified by addition of phenol/chloroform/isoamyl alcohol followed by ethanol precipitation. Purified DNA was dissolved in RNase-free, DNase-free water (Sigma-Aldrich) and further used for qPCR. Samples were analyzed in duplicates and fold enrichment was calculated relative to the input and to a negative region (gene desert) on chromosome 7 (Active Motif). The final fold enrichment value was then calculated relative to the mock ChIP. Primer sequences are listed in [S2 Table](#).

Image processing and measurements

Confocal images and stacks were either analyzed with ImageJ software, LAS X or ZEN blue. Nuclei of ISV cells and *gata2b*⁺ cells were counted using the Multipoint tool of ImageJ. ISV lengths were measured by drawing a line between the base and the tip of ISV on ImageJ. Contours of the Dorsal Aorta were drawn using the Freehand Selection Tool with a digital pen and the area was then measured. Fluorescence intensity corresponded to the measurement of average gray value for each entire image.

Statistical analysis

Statistical comparisons of datasets were performed using GraphPad Prism software. For each dataset, we tested the assumption of normality with D'Agostino-Pearson tests and accordingly, unpaired t-test, Mann-Whitney test, One-way ANOVA, two-way ANOVA or Kruskal-Wallis test were used to compare dataset; means and SDs are shown for each graph/plot. The test used as well as the number of independent experiments performed and the minimal number of biological replicates are indicated in each figure legend.

Bioinformatic analysis

Published single cell data from total embryos at 10 hpf, 14 hpf, 18 hpf and 24 hpf [33] were analyzed using the R package Seurat [62,63]. After data clustering, clusters of endothelial cells from each stage were identified by the expression of several endothelial specific genes (*etv2*, *fli1a*, . . .). Then, we examined the level of expression and the percentage of cells expressing our gene of interest at each developmental stage. ATAC-seq data [38] and ChIP-seq data [6] were inspected using the Galaxy platform [64].

Supporting information

S1 Fig. Analysis of hematopoietic lineage markers. (A) Average number of HSCs enumerated per confocal stack in control and in *prmt5* morphant embryos at 40 hpf. Data are from 2 independent experiments with at least 3 individuals per experiment and a t-test was performed. *** $P < 0,001$. (B, C) Confocal projections of immunostaining with anti-phosphoH3 antibody (in red) of *Tg(gata2b:Gal4; UAS:lifeactGFP)* transgenic embryos either injected with control morpholino (B) or *prmt5* morpholino (C) at 40 hpf. Scale bar 100 μm . (D) Schematic representation of vascular (green) and hematopoietic (red) systems in a zebrafish larva. Bracket indicate the Caudal Hematopoietic Tissue (CHT). (E, F) Confocal projections of CHT from transgenic *Tg(gata2b:Gal4; UAS:lifeactGFP)* embryos at 3 days in the same conditions as in B-C. Scale bar 100 μm . (G) Average number of HSPCs enumerated per confocal stack in

control and *prmt5* morphant embryos at 3 days from 2 independent experiments with at least 4 individuals per analysis. T-test was performed. *** $P < 0.001$. (H-K) Relative mRNA expressions determined by RT-qPCR in either the head (H, I) or the trunk (J, K) of 3-day old control and *prmt5* morphant embryos, from 4 independent experiments with at least 10 animals per condition. T-test was performed. * $P < 0.05$.

(TIF)

S2 Fig. (A-C') Confocal projections of transgenic *Tg(fli1a:GFP)^{y1}* embryos with endothelial cells (in green) after immunostaining against Prmt5 (in magenta). (A-A'') Dorsal view of the lateral plate mesoderm at 14 somite- stage. Yellow rectangle delimits the close up of Prmt5+ endothelial cells (A'-A''). Prmt5+ cells appear in magenta (A-A'') and endothelial cells in green (A-A'). Anterior is on top. Scale bars 100 μm (A) and 25 μm (A'). (B, B') Confocal projections focusing on endothelial cells (in green) from the dorsal aorta (DA) and the cardinal vein (CV) at 24 hpf. Red and blue arrows point to Prmt5+ cells (in magenta) from the DA and the CV, respectively. Red and blue lines represent DA and CV diameters, respectively. Scale bar 50 μm . (C, C') Confocal projections focusing on sprouting ISVs (in green) at 24 hpf. Light blue and yellow arrows point to tip and stalk cell, respectively. (D) Schematic representation of the trunk vasculature with ISVs sprouting from the DA. The tip cell leads the cell migration and the stalk cell maintains the connection with the DA. (E) Expression heatmaps for *etv2*, *prmt5*, *MEP50/Wdr77*, *Smarca4a/Brg1*, *MED1* and identified Prmt5 target genes, in endothelial cells at 10 hpf, 14 hpf, 18 hpf and 24 hpf. Data were derived from single cell RNA-sequencing from Wagner et al. [33]. The expression level is colored-coded from absence of expression (green) to highest level of expression (white).

(TIF)

S3 Fig. (A, B) Confocal projections of transgenic *Tg(fli1a:GFP)^{y1}* wild-type (A) and *prmt5* mutant (B) embryos at 48 hpf. Scale bar 100 μm . (C, D) Average number of disconnected ISV per confocal projection (C) and average ISV area in μm^2 (D) in control and *prmt5* mutant embryos, from 3 independent experiments with at least 4 animals per condition. Mann-Whitney tests were performed. **** $P < 0.0001$; *** $P < 0.001$. (E-G) Confocal projections of transgenic *TgBAC(cdh5:GAL4FF);Tg(UAS:GFP)* and *TgBAC(cdh5:GAL4FF);Tg(UAS:GFP);Tg(UAS:prmt5)* embryos at 28 hpf. Control morphant is on the top left panel (E), *prmt5* morphant embryos not expressing (F) or mis-expressing *prmt5^{WT}* in blood vessel (G). The fluorescent intensity is colored-coded, from Low intensity (L) in black to High intensity (H) in white. Scale bar 100 μm . (H, I) Average GFP fluorescence intensity per confocal projection (H) and average ISV length in μm (I), for control, *prmt5* morphant embryos not expressing or mis-expressing *prmt5^{WT}* in blood vessels, from 2 independent experiments with at least 3 animals per condition. One-way ANOVA and Kruskal-Wallis test were performed. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. (J-R) DIC images and confocal projections of wild-type (J,L,O,Q) and *prmt5* mutant embryos (K,M,P,R) after *in situ* hybridization or fluorescent *in situ* hybridization against *cdh5* (J-M) and *fli1a* (O-R). Scale bar 100 μm . (N, S) Percentage of embryos (y axis) presenting a high or a low level of expression of *cdh5* (N) or *fli1a* (S), according to their genotype (x axis), from 3 independent experiments with at least 4 animals per condition.

(TIF)

S4 Fig. Chromatin profile visualization of endothelial cells from the UCSC Genome

Browser. ATAC-seq peaks as determined by Quillien et al. [38] flanking potential *Etv2* target genes as indicated (*cdh5*, *esama*, *fli1b*, *atgr2*, *fli1a*). GFP+ cell track corresponds to endothelial cell ATAC-seq profile and GFP-minus track represents non-endothelial cell profile. Endothelial cell peak track shows specific peaks for endothelial cells. Promoter regions (P) and putative

enhancers (E) are highlighted in light orange and light pink, respectively.
(TIF)

S1 Table. RNA-seq in Endothelial cells/non-endothelial cells from Quillien et al. [38] (derived from dataset GSE97256).
(XLSX)

S2 Table. Oligonucleotides used in this study.
(DOCX)

S1 Data. All numerical data underlying graphs shown in the manuscript.
(XLSX)

Acknowledgments

We would like to thank the Blader lab for helpful discussions and support; Dr Blader for graciously allocating space and time to AQ to complete the experiments; Drs. Cau, Male and Navajas Acedo for critical reading of the manuscript; Dr. Renaud (iGREd, Clermont-Ferrand) for help in bio-informatics analyses. A. Laire for excellent zebrafish care; Dr. Tavernier from the CREFRE platform; B. Ronsin, S. Bosch and L. Ligat from the Toulouse Rio Imaging (TRI) platform; M. Aguirrebengoa from the BigA Core Facility, CBI Toulouse; Dr. Herbomel (Institut Pasteur, Paris) for the *Tg(gata2b:Gal4;UAS:lifeactGFP)* transgenic line.

Author Contributions

Conceptualization: Aurélie Quillien, Laurence Vandel.

Formal analysis: Aurélie Quillien, Lucas Waltzer, Laurence Vandel.

Funding acquisition: Lucas Waltzer, Laurence Vandel.

Investigation: Aurélie Quillien, Gueric Gilbert, Manon Boulet, Séverine Ethuin.

Methodology: Gueric Gilbert.

Project administration: Laurence Vandel.

Resources: Lucas Waltzer.

Supervision: Laurence Vandel.

Validation: Aurélie Quillien, Manon Boulet, Séverine Ethuin.

Writing – original draft: Aurélie Quillien, Laurence Vandel.

Writing – review & editing: Aurélie Quillien, Lucas Waltzer, Laurence Vandel.

References

1. Hogan BM, Schulte-Merker S. How to Plumb a Pisces: Understanding Vascular Development and Disease Using Zebrafish Embryos. *Dev Cell*. 2017 Sep 25; 42(6):567–83. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.08.015> PMID: 28950100
2. Betz C, Lenard A, Belting HG, Affolter M. Cell behaviors and dynamics during angiogenesis. *Development*. 2016 Jul 1; 143(13):2249–60. <https://doi.org/10.1242/dev.135616> PMID: 27381223
3. Beis D, Stainier DY. In vivo cell biology: following the zebrafish trend. *Trends Cell Biol*. 2006 Feb; 16(2):105–12. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.12.001> PMID: 16406520
4. Lawson ND, Weinstein BM. In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Dev Biol*. 2002 Aug 15; 248(2):307–18. <https://doi.org/10.1006/dbio.2002.0711> PMID: 12167406

5. Thisse C, Zon LI. Organogenesis—heart and blood formation from the zebrafish point of view. *Science*. 2002 Jan 18; 295(5554):457–62. <https://doi.org/10.1126/science.1063654> PMID: 11799232
6. Liu F, Li D, Yu YY, Kang I, Cha MJ, Kim JY, et al. Induction of hematopoietic and endothelial cell program orchestrated by ETS transcription factor ER71/ETV2. *EMBO Rep*. 2015 May; 16(5):654–69. <https://doi.org/10.15252/embr.201439939> PMID: 25802403
7. Wong KS, Proulx K, Rost MS, Sumanas S. Identification of vasculature-specific genes by microarray analysis of *Etsrp/Etv2* overexpressing zebrafish embryos. *Dev Dyn*. 2009 Jul; 238(7):1836–50. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21990> PMID: 19504456
8. Sauteur L, Krudewig A, Herwig L, Ehrenfeuchter N, Lenard A, Affolter M, et al. *Cdh5*/VE-cadherin promotes endothelial cell interface elongation via cortical actin polymerization during angiogenic sprouting. *Cell Rep*. 2014 Oct 23; 9(2):504–13. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.09.024> PMID: 25373898
9. Sauteur L, Affolter M, Belting HG. Distinct and redundant functions of *Esama* and VE-cadherin during vascular morphogenesis. *Development*. 2017 Apr 15; 144(8):1554–65. <https://doi.org/10.1242/dev.140038> PMID: 28264837
10. Hultin S, Zheng Y, Mojallal M, Vertuani S, Gentili C, Balland M, et al. *AmotL2* links VE-cadherin to contractile actin fibres necessary for aortic lumen expansion. *Nat Commun*. 2014 May 7; 5:3743. <https://doi.org/10.1038/ncomms4743> PMID: 24806444
11. Rosa-Garrido M, Chapski DJ, Vondriska TM. Epigenomes in Cardiovascular Disease. *Circ Res*. 2018 May 25; 122(11):1586–607. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.311597> PMID: 29798902
12. Shailesh H, Zakaria ZZ, Baiocchi R, Sif S. Protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) dysregulation in cancer. *Oncotarget*. 2018 Nov 30; 9(94):36705–18. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26404> PMID: 30613353
13. Griffin CT, Brennan J, Magnuson T. The chromatin-remodeling enzyme BRG1 plays an essential role in primitive erythropoiesis and vascular development. *Development*. 2008 Feb; 135(3):493–500. <https://doi.org/10.1242/dev.010090> PMID: 18094026
14. Fish JE, Cantu Gutierrez M, Dang LT, Khyzha N, Chen Z, Veitch S, et al. Dynamic regulation of VEGF-inducible genes by an ERK/ERG/p300 transcriptional network. *Development*. 2017 Jul 1; 144(13):2428–44. <https://doi.org/10.1242/dev.146050> PMID: 28536097
15. Kalna V, Yang Y, Peghaire CR, Frudd K, Hannah R, Shah AV, et al. The Transcription Factor ERG Regulates Super-Enhancers Associated With an Endothelial-Specific Gene Expression Program. *Circ Res*. 2019 Apr 26; 124(9):1337–49. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313788> PMID: 30892142
16. Liu F, Cheng G, Hamard PJ, Greenblatt S, Wang L, Man N, et al. Arginine methyltransferase PRMT5 is essential for sustaining normal adult hematopoiesis. *J Clin Invest*. 2015 Sep; 125(9):3532–44. <https://doi.org/10.1172/JCI81749> PMID: 26258414
17. Antonyamy S, Bonday Z, Campbell RM, Doyle B, Druzina Z, Gheyi T, et al. Crystal structure of the human PRMT5:MEP50 complex. *Proc Natl Acad Sci U A*. 2012 Oct 30; 109(44):17960–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209814109> PMID: 23071334
18. Blanc RS, Richard S. Arginine Methylation: The Coming of Age. *Mol Cell*. 2017 Jan 5; 65(1):8–24. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.11.003> PMID: 28061334
19. Karkhanis V, Hu YJ, Baiocchi RA, Imbalzano AN, Sif S. Versatility of PRMT5-induced methylation in growth control and development. *Trends Biochem Sci*. 2011 Dec; 36(12):633–41. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.09.001> PMID: 21975038
20. Kim H, Ronai ZA. PRMT5 function and targeting in cancer. *Cell Stress*. 2020 Jul 13; 4(8):199–215. <https://doi.org/10.15698/cst2020.08.228> PMID: 32743345
21. Radzishewska A, Shliha PV, Grinev V, Lorenzini E, Kovalchuk S, Shlyueva D, et al. PRMT5 methylome profiling uncovers a direct link to splicing regulation in acute myeloid leukemia. *Nat Struct Mol Biol*. 2019 Nov; 26(11):999–1012. <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0313-z> PMID: 31611688
22. Stopa N, Krebs JE, Shechter D. The PRMT5 arginine methyltransferase: many roles in development, cancer and beyond. *Cell Mol Life Sci*. 2015 Jun; 72(11):2041–59. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1847-9> PMID: 25662273
23. Batut J, Duboe C, Vandel L. The methyltransferases PRMT4/CARM1 and PRMT5 control differentially myogenesis in zebrafish. *PLoS One*. 2011; 6(10):e25427. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025427> PMID: 22016767
24. Dacwag CS, Ohkawa Y, Pal S, Sif S, Imbalzano AN. The protein arginine methyltransferase Prmt5 is required for myogenesis because it facilitates ATP-dependent chromatin remodeling. *Mol Cell Biol*. 2007 Jan; 27(1):384–94. <https://doi.org/10.1128/MCB.01528-06> PMID: 17043109
25. Zhu J, Zhang D, Liu X, Yu G, Cai X, Xu C, et al. Zebrafish prmt5 arginine methyltransferase is essential for germ cell development. *Development*. 2019 Oct 14; 146(20). <https://doi.org/10.1242/dev.179572> PMID: 31533925

26. Tee WW, Pardo M, Theunissen TW, Yu L, Choudhary JS, Hajkova P, et al. Prmt5 is essential for early mouse development and acts in the cytoplasm to maintain ES cell pluripotency. *Genes Dev.* 2010 Dec 15; 24(24):2772–7. <https://doi.org/10.1101/gad.606110> PMID: 21159818
27. Tan DQ, Li Y, Yang C, Li J, Tan SH, Chin DWL, et al. PRMT5 Modulates Splicing for Genome Integrity and Preserves Proteostasis of Hematopoietic Stem Cells. *Cell Rep.* 2019 Feb 26; 26(9):2316–2328 e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.001> PMID: 30811983
28. Butko E, Distel M, Pouget C, Weijts B, Kobayashi I, Ng K, et al. Gata2b is a restricted early regulator of hemogenic endothelium in the zebrafish embryo. *Development.* 2015 Mar 15; 142(6):1050–61. <https://doi.org/10.1242/dev.119180> PMID: 25758220
29. Ma D, Wei Y, Liu F. Regulatory mechanisms of thymus and T cell development. *Dev Comp Immunol.* 2013 Feb; 39(1–2):91–102. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.12.013> PMID: 22227346
30. Chan-Penebre E, Kuplast KG, Majer CR, Boriack-Sjodin PA, Wigle TJ, Johnston LD, et al. A selective inhibitor of PRMT5 with in vivo and in vitro potency in MCL models. *Nat Chem Biol.* 2015 Jun; 11(6):432–7. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1810> PMID: 25915199
31. Pal S, Yun R, Datta A, Lacomis L, Erdjument-Bromage H, Kumar J, et al. mSin3A/histone deacetylase 2- and PRMT5-containing Brg1 complex is involved in transcriptional repression of the Myc target gene cad. *Mol Cell Biol.* 2003 Nov; 23(21):7475–87. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.21.7475-7487.2003> PMID: 14559996
32. Saha K, Adhikary G, Eckert RL. MEP50/PRMT5 Reduces Gene Expression by Histone Arginine Methylation and this Is Reversed by PKCdelta/p38delta Signaling. *J Invest Dermatol.* 2016 Jan; 136(1):214–24. <https://doi.org/10.1038/JID.2015.400> PMID: 26763441
33. Wagner DE, Weinreb C, Collins ZM, Briggs JA, Megason SG, Klein AM. Single-cell mapping of gene expression landscapes and lineage in the zebrafish embryo. *Science.* 2018 Jun 1; 360(6392):981–7. <https://doi.org/10.1126/science.aar4362> PMID: 29700229
34. Ninov N, Borius M, Stainier DY. Different levels of Notch signaling regulate quiescence, renewal and differentiation in pancreatic endocrine progenitors. *Development.* 2012 May; 139(9):1557–67. <https://doi.org/10.1242/dev.076000> PMID: 22492351
35. Quillien A, Moore JC, Shin M, Siekmann AF, Smith T, Pan L, et al. Distinct Notch signaling outputs pattern the developing arterial system. *Development.* 2014 Apr; 141(7):1544–52. <https://doi.org/10.1242/dev.099986> PMID: 24598161
36. Craig MP, Grajevskaja V, Liao HK, Balciuniene J, Ekker SC, Park JS, et al. Etv2 and fli1b function together as key regulators of vasculogenesis and angiogenesis. *Arter Thromb Vasc Biol.* 2015 Apr; 35(4):865–76. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304768> PMID: 25722433
37. Pham VN, Lawson ND, Mugford JW, Dye L, Castranova D, Lo B, et al. Combinatorial function of ETS transcription factors in the developing vasculature. *Dev Biol.* 2007 Mar 15; 303(2):772–83. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.10.030> PMID: 17125762
38. Quillien A, Abdalla M, Yu J, Ou J, Zhu LJ, Lawson ND. Robust Identification of Developmentally Active Endothelial Enhancers in Zebrafish Using FANS-Assisted ATAC-Seq. *Cell Rep.* 2017 Jul 18; 20(3):709–20. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.070> PMID: 28723572
39. LeBlanc SE, Wu Q, Lamba P, Sif S, Imbalzano AN. Promoter-enhancer looping at the PPARgamma2 locus during adipogenic differentiation requires the Prmt5 methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jun 20; 44(11):5133–47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw129> PMID: 26935580
40. Bussmann J, Schulte-Merker S. Rapid BAC selection for tol2-mediated transgenesis in zebrafish. *Development.* 2011 Oct; 138(19):4327–32. <https://doi.org/10.1242/dev.068080> PMID: 21865323
41. Anderson H, Patch TC, Reddy PN, Hagedorn EJ, Kim PG, Soltis KA, et al. Hematopoietic stem cells develop in the absence of endothelial cadherin 5 expression. *Blood.* 2015 Dec 24; 126(26):2811–20. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-07-659276> PMID: 26385351
42. LeBlanc SE, Konda S, Wu Q, Hu YJ, Oslowski CM, Sif S, et al. Protein arginine methyltransferase 5 (Prmt5) promotes gene expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 (PPAR-gamma2) and its target genes during adipogenesis. *Mol Endocrinol.* 2012 Apr; 26(4):583–97. <https://doi.org/10.1210/me.2011-1162> PMID: 22361822
43. Chen Z, Zhang C, Wu D, Chen H, Rorick A, Zhang X, et al. Phospho-MED1-enhanced UBE2C locus looping drives castration-resistant prostate cancer growth. *EMBO J.* 2011 May 10; 30(12):2405–19. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.154> PMID: 21556051
44. Kagey MH, Newman JJ, Bilodeau S, Zhan Y, Orlando DA, van Berkum NL, et al. Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature.* 2010 Sep 23; 467(7314):430–5. <https://doi.org/10.1038/nature09380> PMID: 20720539

45. Kim SI, Bresnick EH, Bultman SJ. BRG1 directly regulates nucleosome structure and chromatin looping of the alpha globin locus to activate transcription. *Nucleic Acids Res.* 2009 Oct; 37(18):6019–27. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp677> PMID: 19696073
46. Kim SI, Bultman SJ, Kiefer CM, Dean A, Bresnick EH. BRG1 requirement for long-range interaction of a locus control region with a downstream promoter. *Proc Natl Acad Sci U A.* 2009 Feb 17; 106(7):2259–64. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806420106> PMID: 19171905
47. Ni Z, Abou El Hassan M, Xu Z, Yu T, Bremner R. The chromatin-remodeling enzyme BRG1 coordinates CIITA induction through many interdependent distal enhancers. *Nat Immunol.* 2008 Jul; 9(7):785–93. <https://doi.org/10.1038/ni.1619> PMID: 18500344
48. Napoli C, Schiano C, Soricelli A. Increasing evidence of pathogenic role of the Mediator (MED) complex in the development of cardiovascular diseases. *Biochimie.* 2019 Oct; 165:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.06.014> PMID: 31255603
49. Dacwag CS, Bedford MT, Sif S, Imbalzano AN. Distinct protein arginine methyltransferases promote ATP-dependent chromatin remodeling function at different stages of skeletal muscle differentiation. *Mol Cell Biol.* 2009 Apr; 29(7):1909–21. <https://doi.org/10.1128/MCB.00742-08> PMID: 19188441
50. Marass M, Beisaw A, Gerri C, Luzzani F, Fukuda N, Gunther S, et al. Genome-wide strategies reveal target genes of Npas4l associated with vascular development in zebrafish. *Development.* 2019 Jun 3; 146(11). <https://doi.org/10.1242/dev.173427> PMID: 31097478
51. Baltrunaite K, Craig MP, Palencia Desai S, Chaturvedi P, Pandey RN, Hegde RS, et al. ETS transcription factors Etv2 and Fli1b are required for tumor angiogenesis. *Angiogenesis.* 2017 Aug; 20(3):307–23. <https://doi.org/10.1007/s10456-017-9539-8> PMID: 28108843
52. Wang Y, Hu W, Yuan Y. Protein Arginine Methyltransferase 5 (PRMT5) as an Anticancer Target and Its Inhibitor Discovery. *J Med Chem.* 2018 Nov 8; 61(21):9429–41. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00598> PMID: 29870258
53. Lin H, Luengo JI. Nucleoside protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2019 Jun 1; 29(11):1264–9. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.03.042> PMID: 30956011
54. Alestrom P, D'Angelo L, Midtlyng PJ, Schorderet DF, Schulte-Merker S, Sohm F, et al. Zebrafish: Housing and husbandry recommendations. *Lab Anim.* 2020 Jun; 54(3):213–24. <https://doi.org/10.1177/0023677219869037> PMID: 31510859
55. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn.* 1995 Jul; 203(3):253–310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302> PMID: 8589427
56. Hatta K, Tsujii H, Omura T. Cell tracking using a photoconvertible fluorescent protein. *Nat Protoc.* 2006; 1(2):960–7. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.96> PMID: 17406330
57. Kirchmaier S, Lust K, Wittbrodt J. Golden GATEway cloning—a combinatorial approach to generate fusion and recombination constructs. *PLoS One.* 2013; 8(10):e76117. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076117> PMID: 24116091
58. Kwan KM, Fujimoto E, Grabher C, Mangum BD, Hardy ME, Campbell DS, et al. The Tol2kit: a multisite gateway-based construction kit for Tol2 transposon transgenesis constructs. *Dev Dyn.* 2007 Nov; 236(11):3088–99. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21343> PMID: 17937395
59. Montague TG, Cruz JM, Gagnon JA, Church GM, Valen E. CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. *Nucleic Acids Res.* 2014 Jul; 42(Web Server issue):W401–7. <https://doi.org/10.1093/nar/gku410> PMID: 24861617
60. Talbot JC, Amacher SL. A streamlined CRISPR pipeline to reliably generate zebrafish frameshifting alleles. *Zebrafish.* 2014 Dec; 11(6):583–5. <https://doi.org/10.1089/zeb.2014.1047> PMID: 25470533
61. Covassin LD, Siekmann AF, Kacergis MC, Laver E, Moore JC, Villefranc JA, et al. A genetic screen for vascular mutants in zebrafish reveals dynamic roles for Vegf/Plcg1 signaling during artery development. *Dev Biol.* 2009 May 15; 329(2):212–26. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.02.031> PMID: 19269286
62. Butler A, Hoffman P, Smibert P, Papalexi E, Satija R. Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. *Nat Biotechnol.* 2018 Jun; 36(5):411–20. <https://doi.org/10.1038/nbt.4096> PMID: 29608179
63. Stuart T, Butler A, Hoffman P, Hafemeister C, Papalexi E, Mauck WM, et al. Comprehensive Integration of Single-Cell Data. *Cell.* 2019 Jun 13; 177(7):1888–1902 e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.031> PMID: 31178118
64. Afgan E, Baker D, Batut B, van den Beek M, Bouvier D, Cech M, et al. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Res.* 2018 Jul 2; 46(W1):W537–44. <https://doi.org/10.1093/nar/gky379> PMID: 29790989

Résumé

Les protéines de la famille Ten-Eleven Translocation (TET) sont des acteurs clés de la régulation de la transcription et des mutations des gènes codant pour ces enzymes sont fréquemment associées au développement de diverses pathologies comme des cancers. Si les enzymes TET ont été largement décrites pour leur rôle dans la déméthylation des 5-méthylcytosines (5mC) sur l'ADN, ces enzymes peuvent aussi agir sur d'autres substrats ou indépendamment de leur activité enzymatique. En ce sens, le génome de la Drosophile est globalement dépourvu de 5mC mais code pour des enzymes TET, faisant de cet organisme un modèle de choix pour caractériser les fonctions de TET par-delà l'oxydation des 5mC. Au cours de ma thèse, je me suis intéressé au mécanisme moléculaire d'action de TET chez la drosophile. Tout d'abord, nous avons ré-examiné son rôle dans la déméthylation des 6-méthyladénines (6mA), une modification épigénétique dont la présence et le rôle chez les métazoaires sont controversés. Nos résultats montrent que les niveaux de 6mA sont très faibles dans le génome de la Drosophile, et que TET est incapable d'accommoder cette marque comme substrat. De plus, l'étude d'un mutant *Tet* dépourvu d'activité catalytique indique que l'activité enzymatique de TET n'est pas requise pour le développement de la mouche, et que dans le système nerveux central larvaire, son mode d'action est majoritairement indépendant de son activité catalytique. Au sein de ce tissu, nous avons pu montrer que TET interagit avec le Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) pour activer l'expression de ses gènes cibles.

Mots clés : TET, Drosophile, Polycomb, activité catalytique, régulation de la transcription, 6-méthyladénine

Abstract

Proteins from the Ten-Eleven Translocation (TET) family are key players in transcription regulation, and mutations affecting *TET* genes are frequently associated with several pathologies such as cancers. TET enzymes have been mainly described for their involvement in 5-methylcytosine (5mC) demethylation on DNA, but these enzymes can also act on other substrates or independently of their catalytic activity. Interestingly, the *Drosophila* genome is essentially deprived of 5mC but still encodes for TET enzymes. Thus, this organism stands as a valuable model system to study TET functions beyond its ability to oxidise 5mC. During my PhD, I characterised TET molecular mechanisms of action in *Drosophila*. First, I participated to the re-evaluation of TET function in 6-methyladenine (6mA) demethylation, an epigenetic modification whose presence and function in metazoans are still under debate. Our results show that 6mA levels are very low in *Drosophila* genome, and that TET is not able to accommodate this mark as a substrate. In addition, our study of a *Tet* mutant in which its catalytic activity is abolished show that TET enzymatic function isn't required for fly development, and that TET function in the larval central nervous system is mainly catalytic independent. In this tissue, our results show that TET interacts with the Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) to promote gene activation.

Keywords : TET, Drosophila, Polycomb, catalytic activity, transcription regulation, 6-methyladenine