



HAL
open science

Rôle de l'ETP Corto et de la protéine ribosomique RPL12 dans la régulation transcriptionnelle chez *Drosophila melanogaster*

Anne Coleno-Costes

► **To cite this version:**

Anne Coleno-Costes. Rôle de l'ETP Corto et de la protéine ribosomique RPL12 dans la régulation transcriptionnelle chez *Drosophila melanogaster*. Biologie du développement. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PAO66170 . tel-00828236

HAL Id: tel-00828236

<https://theses.hal.science/tel-00828236>

Submitted on 30 May 2013

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

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

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

Biologie Moléculaire et Cellulaire
Ecole doctorale Complexité du vivant

Présentée par

Mme Anne COLENO-COSTES

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

**Rôle de l'ETP Corto et de la protéine ribosomique RPL12 dans la
régulation transcriptionnelle chez *Drosophila melanogaster***

soutenue le 28 JUIN 2012

devant le jury composé de :

Mme. Frédérique PERONNET	Directeur de thèse
M. Sébastien BLOYER	Co-Directeur de thèse
Mme. Anne-Marie MARTINEZ	Rapporteur
M. Slimane AIT-SI-ALI	Rapporteur
M. André VERDEL	Examineur
M. Olivier JEAN-JEAN	Examineur

Je tiens tout d'abord à remercier Anne-Marie MARTINEZ, Slimane AIT-SI-ALI, André VERDEL et Olivier JEAN-JEAN pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse et de faire partie de mon jury.

Un grand merci à Sébastien pour ton encadrement si particulier, tu m'as rendue encore plus autonome que je ne l'étais déjà. Les réunions-café-clope sur la terrasse du 7^{ème} étaient juste ce qu'il fallait au moment où il le fallait, enfin je crois. J'ai adoré tes éclats de voix (tonitruants) quand tu t'énervais tout seul devant ton ordinateur (surtout quand les stagiaires passaient très inquiets), et encore plus ton enthousiasme pour mes manips alors que j'étais moi-même sceptique. Parmi les images les plus frappantes que je garderai, Obélix ne laissera pas sa place, mais d'autres costumes, paraît-il, te vont également à ravir.

Frédérique, tu m'as accueillie dans ton équipe, un peu surprise et très heureuse que je choisisse l'association de la chromatine et du développement. Je n'ai jamais regretté ce choix et crois bien que c'est le cœur très lourd que je vous quitterai. Un simple merci ne suffira pas pour te remercier pour tout, pour ton implication exceptionnelle d'abord pour les corrections de mon manuscrit, pour ta disponibilité et ta patience, pour ta franchise aussi quand on avait besoin de se remettre sur les rails, pour les bons moments qui sont nombreux et aussi pour ta vision de la science. Tu fais partie du peu de gens que j'admire.

Merci à mes collègues et amis du laboratoire, j'ai eu la chance de faire ma thèse dans une équipe très sympathique et dont l'ambiance fait du bien au moral, je me suis sentie soutenue et poussée vers le haut, ce n'est pas comme ça dans tous les labos.

D'abord, merci à Valérie dont l'aide est précieuse chaque jour, tu déteste qu'on t'appelle « la maman des mouches », il faut dire que tu veilles autant sur elles que sur nous, je te dois plus qu'un merci pour cette dernière année de thèse, tu m'as sauvé plus d'une fois sur le planning des croisements et des dissections, merci aussi pour ton écoute dans les moments de doutes et à chaque fois que je devais vider mon panier.

Merci à toi Delphine, également pour ton écoute et ta confiance, je savais également pouvoir compter sur toi à chaque fois que j'en avais besoin (je ne crois pas en avoir abusé). Tu gagnerais à te plaindre plus, rien ne transparait sur toi, ni la fatigue, ni la douleur, c'est à la fois une chance et une calamité. Mais j'adore quand tu es fatiguée, le filtre s'évapore un peu et on oublie le prime, j'aime beaucoup !!!! Bon courage pour ta thèse, tu en auras besoin, avec deux enfants ça devient une course, c'est un sacré challenge dont on peut être fier.

Merci aussi à Camille, tu commences ta thèse, quoique, dans quelques mois la deuxième année commencera... tictac tictac, bon courage à toi aussi.

Merci Emmanuelle, tu as toujours été disponible quand j'avais des questions à te poser et que j'étais dans l'expectative... Merci Neel, tu prends toujours beaucoup de ton temps pour faire une réponse exhaustive aux questions qu'on te pose, grâce à toi j'ai comblé quelques lacunes sur le développement de la drosophile. Merci Jean-Michel, tu es arrivé depuis peu dans l'équipe et tous les matins tu prends soin de prendre des nouvelles et surtout d'écouter ce qu'on a à raconter.

Merci aux anciens thésards de l'équipe, Floria et Julien, vos départs m'ont rapprochés de la date de ma soutenance, j'ai hérité à mon tour des nuits courtes et de la boule au ventre. Je la laisse avec joie aux suivantes .

Comment ne pas remercier l'équipe Ronsseray avec qui nous partageons bien plus que la salle des mouches ! Stéphane, tu es pour moi le stéréotype du chercheur fou même s'il te manque la blouse, mais entre les gniainchouin, les chansons et les discussions philosophiques, c'est plutôt ça... Ton disciple Léonard-Antoine en prend le chemin et en est fier, ça ne doit donc pas être si grave.

Merci Laure pour ton aide sur mdg3, et merci Valérie, Catherine et Nathalie de votre amitié, ce n'est pas rien de se sentir entouré.

Dépassons le « bout du couloir du 7^{ème}, pour remercier les plus proches voisins, l'équipe de Muriel Umbauer et Jean-François Riou avec qui nous avons partagé, en plus de la machine à café, les sessions Beaujolais nouveau et autres galettes des rois, on entend parfois les éclats de rire de Ronan traverser les murs, inévitablement ça me faisait sourire pendant mes manip, et un grand merci aux thésardes de l'équipe, Mélinée pour ton organisation du club des Docs auquel j'ai pris plaisir à venir à chaque fois que je le pouvais et à Isabelle, dans la même situation que moi, c'est pas toujours facile de faire une thèse avec une famille à charge, courage.

D'un point de vue plus global, je remercie Catherine Jessus de m'avoir permis de choisir l'équipe de Frédérique quand je suis arrivée au laboratoire.

Je remercie enfin mes proches, les amis qui me prennent pour une folle quand je leur raconte mes mouches sans tête et qui désespèrent quand je commence à parler de mon boulot (tout le monde ne peut pas faire de l'informatique non plus !).

Merci à ma mère qui crois en moi depuis toujours, j'imagine que tu dois être fière, enfin je l'espère. Tu m'a appris à aller toujours plus haut, à demander le meilleur de moi-même, cette thèse, elle est pour toi aussi.

Merci Alex, c'est aussi grâce à toi que je me suis lancée sereine (enfin, sereine au début...) dans cette aventure qu'est la thèse. Tu m'as toujours soutenue, grâce à toi je suis solide, merci de me supporter, dans tous les sens du terme. Je t'aime.

Un grand cri d'amour pour mes petits poulets qui me portent chaque jour un peu plus loin, grâce à vous je ne m'autorise pas l'idée de baisser les bras, j'aurai toujours envie que vous soyez fiers de moi comme je suis fière de vous.





Duncan, tu as un petit grain de folie qu'il ne faudra surtout pas perdre en grandissant, cultive ton originalité, c'est quelque chose de précieux dans ce vilain monde de morne conformité. Je suis ta première fan, je ne doute pas que tu sauras toujours nous surprendre.

Arwen, tu me régales de tes beaux dessins et de tes mots d'amour, de plus en plus serviable et gentille, si tu pouvais continuer comme ça très longtemps je serais la plus heureuse des mamas.



Hanaë, ma petite fleur, tu illumines nos journées, tu colores nos vies. Telle une petite fée, tu allies déjà douceur et petit air coquin, je ne doute pas que tu nous en fera voir de toutes les couleurs. Ne nous en veux pas des surnoms étranges que tu auras à supporter, entre Poï-Poï, choucroute, bébé-chou, Hananounette, Micro Doudou et Ananas, bon courage avec tes parents !

Résumé

Les chromodomaines sont présents dans de nombreux régulateurs de la structure chromatinienne. Ils sont très conservés et reconnaissent spécifiquement certaines lysines méthylées sur les histones. Chez la drosophile, l'*Enhancer de Trithorax et Polycomb* Corto, impliqué dans la répression et dans l'activation transcriptionnelle de nombreux gènes, contient un chromodomaine (CortoCD). La surexpression de CortoCD dans des drosophiles transgéniques montre que c'est un module d'adressage à la chromatine. L'identification par spectrométrie de masse des polypeptides retenus par CortoCD *in vitro* révèle qu'ils correspondent à des protéines ribosomiques nucléaires (RPs). Je me suis concentrée sur l'une d'entre elle, RPL12, car les homologues de cette dernière dans d'autres espèces possèdent de nombreux résidus lysines méthylés. J'ai montré que CortoCD reconnaît spécifiquement la lysine 3 de RPL12 triméthylée (RPL12K3me3). De plus, Corto et RPL12 co-localisent avec des marques épigénétiques activatrices sur les chromosomes polytènes. L'analyse par CHIP (immunoprécipitation de la chromatine), de deux cibles transcriptionnelles de Corto et RPL12, révèle que ces deux protéines sont localisées dans le corps des gènes et ne sont pas enrichies sur les promoteurs, suggérant un rôle dans l'élongation de la transcription. Des analyses transcriptomiques (RNAseq) montrent que Corto et RPL12 régulent majoritairement des gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes. Nos résultats mettent en évidence pour la première fois une coopération entre une protéine ribosomique et un facteur de maintien de la mémoire épigénétique dans la régulation transcriptionnelle.

Abstract

Chromodomains are conserved domains found in many regulators of chromatin structure. Most of them recognize methylated lysine on histone tails. The *Drosophila melanogaster* *Enhancer of Polycomb and Trithorax* Corto that is involved in both silencing and activation of gene expression bears a chromodomain (CortoCD). Overexpression of CortoCD in transgenic flies shows that it behaves as a chromatin-targeting module. Mass spectrometry analysis of peptides pulled-down by CortoCD from nuclear extracts reveals that they correspond to nuclear ribosomal proteins (RPs). Among them, I focused on RPL12 since homologues of this RP have been shown to be methylated in several species. CortoCD binds with high affinity RPL12 trimethylated on lysine 3 (RPL12K3me3) as demonstrated by real-time interaction analyses. Co-localization of Corto and RPL12 with active epigenetic marks on polytene chromosomes suggests that they are involved in fine-tuning transcription of genes located in open chromatin. Analysis of two Corto and RPL12 transcriptional targets by ChIP (Chromatin Immuno Precipitation) shows that both proteins are not enriched at promoters but rather located in the core region of these genes. Altogether, our results suggest a role for Corto and RPL12 in transcriptional elongation. RNAseq analyses of wing imaginal discs overexpressing either Corto or RPL12 show that most deregulated genes are shared by both factors. Interestingly, RP genes are among these common targets suggesting that Corto and RPL12 are involved in dynamic coordination of ribosome biogenesis. Our results show for the first time that an RP and a chromatin regulator can cooperate in the control of gene expression.

Mots clés

Epigénétique, Chromodomaine, protéines ribosomiques, ETP, Enhancer de Trithorax et Polycomb, régulation de la transcription, biogenèse des ribosomes

Key words

Epigenetic, chromodomain, ribosomal proteins, ETP, Enhancer of Trithorax and Polycomb, transcriptional regulation, ribosomal biogenesis.

Nom et adresse du laboratoire

UMR7622

Chromatine et développement

Bat C 7eme étage case 24

9 Quai st bernard

75005 Paris

TABLE DES MATIERES

Table des Matières

Liste des Figures	13
Figures des données complémentaires	14
Liste des abréviations	17
Nomenclatures utilisées	19
I- INTRODUCTION	23
1 Notions d'épigénétique	25
1.1. Historique, définition.....	25
1.2. La mémoire épigénétique.....	27
1.3. Les supports de la mémoire épigénétique	29
1.3.1. L'ADN : l'ADN méthylé.....	29
1.3.2. L'ARN : les ARN non codants	29
1.3.3. La chromatine	33
1.4. Exemples de processus épigénétiques	33
1.5. Perturbation de la mémoire épigénétique par l'environnement.....	37
2. La chromatine et le "code histone"	41
2.1. Structure et organisation de la chromatine	41
2.2. Les modifications post-traductionnelles des histones	43
2.2.1. Nomenclature	43
2.2.2. Les kinases	45
2.2.3. Les histones acétyltransférases	45
2.2.4. Les histones méthyltransférases (HMT)	47
2.2.4.1. Les lysines méthyltransférases.....	47
2.2.4.2. Les protéines arginine méthyltransférases (PRMT).	47
2.2.5. Les polyADP ribosylases	49
2.2.6. Les ubiquitines-ligases.....	49
2.3. Le code histone.....	49
2.3.1. Writers , Readers et Erasers	51
2.3.2. Histone crosstalk	53
2.4. Les gommages épigénétiques ou <i>Erasers</i>	55
2.4.1. Les phosphatases.....	55
2.4.2. Les histones désacétylases (HDAC)	55

2.4.3. Les histones déméthylases (HDMases)	57
2.4.4. La déribosylase PARG (polyADP-ribose glycohydrolase)	57
2.4.5. La déubiquitinase MYSM1	59
2.5. Les lecteurs du code histone ou <i>Readers</i>	59
2.5.1. Les domaines 14-3-3	59
2.5.2. Les bromodomains	61
2.5.3. Les chromodomains	61
2.5.3.1. Structure des chromodomains	63
2.5.3.2. Classification des chromodomains.....	63
2.5.3.3. Fixation des acides nucléiques.....	65
2.5.3.4. Adressage à la chromatine	67
2.6. Les complexes de remodelage de la chromatine.....	67
2.7. Les complexes Polycomb et Trithorax.	69
2.7.1. Les complexes Polycomb (PcG).....	71
2.7.2. Les complexes Trithorax (TrxG)	73
2.7.3. Les éléments de maintien de la mémoire épigénétique	75
2.7.4. Les Enhancers de Trithorax et Polycomb ou ETP.....	77
3 La transcription	79
3.1. Les ARN polymérase.....	79
3.2. Le cycle de transcription	83
3.2.1. L'initiation	83
3.2.2. L'élongation précoce	85
3.2.3. La pause transcriptionnelle	87
3.2.4. L'épissage alternatif.....	91
3.2.4. La terminaison	95
3.3. Chromatine, organisation nucléaire et contrôle de la transcription	97
3.3.1. Structure de la chromatine et régulation de la transcription	97
3.3.2. Compartimentation nucléaire.....	99
4 La biogenèse des ribosomes.....	101
4.1. Le ribosome.....	101
4.1.1. Structure du ribosome	103
4.1.2. Les ARN ribosomiques.....	103
4.1.3. Les protéines ribosomiques (RPs)	105
4.1.4. Assemblage des ribosomes	107

4.1.5. Activité du ribosome.....	111
4.2. Fonctions extra-ribosomiques des RPs.....	111
4.2.1. Epissage et NMD (Non-sense Mediated Decay)	111
4.2.1.1. Le NMD	111
4.2.1.2. Régulation transcriptionnelle par des RPs	115
4.3. Les ribosomes, gardiens de l'homéostasie cellulaire	119
4.3.1. La voie Myc	119
4.3.2. La voie p53	123
4.3.3. Contrôle de la croissance au cours du cycle cellulaire	125
5 Corto, une protéine à chromodomaine atypique.....	127
5.1. Le gène <i>corto</i>	127
5.1.1. Mutants de <i>corto</i>	129
5.1.2. Surexpression de <i>corto</i>	129
5.1.3. Phénotypes des mutants	131
5.1.4. <i>corto</i> , un nouvel Enhancer de Trithorax et Polycomb (ETP).....	133
5.2. La protéine Corto.....	133
5.3. Corto, un régulateur transcriptionnel	135
Présentation du projet de thèse	139
II- RESULTATS	141
RESUME DE L'ARTICLE	143
ARTICLE.....	145
DONNEES COMPLEMENTAIRES A L'ARTICLE	185
1 Analyses génétiques.....	189
1.A.. Génétique de <i>RPL12</i>	189
1.A.1. Perte de fonction de <i>RPL12</i>	189
1.A.2. Gain de fonction de <i>RPL12</i>	191
1.A.3. Interaction génétique entre Corto et <i>RPL12</i>	193
1.B. Caractérisation moléculaire des mutations <i>corto</i> ⁴²⁰ et <i>corto</i> ^{L1}	193
1.B.1. Caractérisation de la mutation <i>corto</i> ⁴²⁰	193
1.B.2. Caractérisation de la mutation <i>corto</i> ^{L1}	195
1.B.3. Anomalie de transcription dans les mutants <i>corto</i>	197
2 Analyses fonctionnelles	199
2.A. Analyse de l'inactivation de <i>RPL12</i> et <i>corto</i> par RNAi dans les cellules S2	199
2.A.1. Inactivation de <i>RPL12</i>	199

2.A.2. Inactivation de RPL12 dans les disques d'aile.....	201
2.A3. Inactivation de corto en cellules S2	203
2.A.4. Inactivation de corto en cellules S3	203
2.B. Autorégulation de <i>corto</i>	203
2.C. Caractérisation de cibles directes de Corto et RPL12 par XChIP	205
2.C.1. Cible RPS4	207
2.C.2. Cible HSP70.....	207
III-DISCUSSION.....	211
Conclusion	213
Discussion.....	215
1-Réseau d'interacteurs de RPL12	215
2-Protéines ribosomiques et régulation épigénétique de l'expression des gènes	219
3-Les protéines ribosomiques agissent-elles en complexes ou sous forme libre ?	221
4- La biogenèse des ribosomes est coordonnée par la régulation transcriptionnelle des protéines ribosomiques	222
5-La régulation transcriptionnelle par les protéines ribosomiques est-elle conservée au cours de l'évolution ?	225
Perspectives.....	227
1- Dynamique et rôle de la méthylation de la lysine 3 dans l'activité transcriptionnelle de RPL12.	227
2- Analyse du recrutement de Corto et de RPL12 sur la chromatine	228
Etude du rôle de la méthylation de RPL12	228
3- Etude des cibles transcriptionnelles directes de Corto et de RPL12	229
4- RPL12 agit-elle seule ou fait-elle partie d'un pseudo-ribosome impliquant d'autres RPs et ARNr ?.....	229
5- Perspectives évolutives.....	230

Liste des Figures

FIGURE 1 : LE PAYSAGE EPIGENETIQUE.....	26
FIGURE 2 : PCG ET TRXG	28
FIGURE 3 : COMPLEXITE DES PETITS ARN CHEZ LA DROSOPHILE.	30
FIGURE 4 : DIFFERENTS NIVEAUX DE COMPACTION DE LA CHROMATINE.	40
FIGURE 5 : MODIFICATIONS DES L'HISTONES.....	42
FIGURE 6 : METHYLATION DE H3K4 CHEZ S. CEREVISIAE.	46
TABLEAU 1 : HISTONES METHYLTRANSFERASES ACTIVATRICES.....	48
TABLEAU 2 : HISTONES METHYLTRANSFERASES REPRESSIVES.....	48
FIGURE 7 : CONVERSATIONS CROISEES IMPLIQUANT DES LYSINES DEMETHYLASES.....	54
FIGURE 8 : CONVERSATIONS CROISEES ENTRE MODIFICATIONS D'HISTONES.	54
FIGURE 9 : DOMAINES D'ORGANISATION DES HDAC DE LA LEVURE A L'HOMME.....	56
FIGURE 10 : EXEMPLES DE READERS.....	58
FIGURE 11: CHROMODOMAINE DE HP1.....	60
FIGURE 12: AFFINITE DES CHROMODOMAINE DE PC ET HP1 POUR LEURS SUBSTRATS RESPECTIFS.	62
TABLEAU 3 : EXEMPLES DE PROTEINES A CHROMODOMAINE CHEZ LA DROSOPHILE.....	64
FIGURE 13 : REMODELAGE DE LA CHROMATINE ATP-DEPENDANT.....	66
FIGURE 14 : LES DIFFERENTS COMPLEXES PCG ET LEURS INTERACTIONS CHEZ LA DROSOPHILE.	70
FIGURE 15 : NOUVELLE CLASSIFICATION DES PROTEINES IMPLIQUEES DANS LES FONCTIONS PCG ET TRXG.....	76
FIGURE. 16 : ETAPES ET FACTEURS IMPLIQUES DANS LA GENERATION D'UN COMPLEXE D'ELONGATION PRODUCTIVE.....	80
FIGURE. 17: VUE SCHEMATIQUE DU CYCLE DE TRANSCRIPTION DE L'ARN POLYMERASE II.	82
FIGURE 18 : MECANISME DE BACKTRACKING.	84
FIGURE 19: PAUSE BUTTON (PB)	86
FIGURE 20 : SEQUENCES CONSENSUS DES SITES DONNEUR ET ACCEPTEUR DE L'EPISSAGE ALTERNATIF.	88
FIGURE 21 : EXEMPLE DU PRE-ARNM DU GENE DSCAM CHEZ DROSOPHILA MELANOGASTER	90
FIGURE 22 : ENRICHISSEMENT DE L'ARN POLYMERASE II DU COTE DE L'EXON A LA JONCTION EXON-INTRON.	90
FIGURE 23 : MODELE TORPEDO ET LOCALISATION DE LA PHOSPHORYLATION DU CTD DE L'ARN POLYMERASE II ET DE FACTEURS DE TERMINAISON	92
FIGURE 24 : PROCESSUS DU GENE LOOPING	94
FIGURE 25 : CYCLE DE TRANSCRIPTION DANS UN CONTEXTE CHROMATINIEN.....	96
FIGURE 26 : DIVERSITE DES CORPS NUCLEAIRES.	98
FIGURE 27 : SCHEMA DU LOCUS DES ADNr DE LA DROSOPHILE.	102
FIGURE 28 : CONSERVATION DES PROTEINES RIBOSOMIQUES	104
FIGURE 29 : ASSEMBLAGE DES RIBOSOMES.....	106
FIGURE 30: RIBOSOME STALK DU RIBOSOME PROKARYOTE.....	108
FIGURE 31 : ASSEMBLAGE DU STALK DU RIBOSOME EUCARYOTE	108
FIGURE 32. ACTIVITE DU RIBOSOME DURANT LA TRADUCTION CHEZ LES PROCARYOTES.....	110
FIGURE 33 : MODELE DE REGULATION NEGATIVE DE L'EPISSAGE ALTERNATIF DE RPL12 ET DE RPS13.	112
FIGURE 34 : LES PROTEINES RIBOSOMIQUES FIXENT LA CHROMATINE.....	114
FIGURE 35 : PROTEINES RIBOSOMIQUES NUCLEAIRES CO-IMMUNOPRECIPITEES PAR L'HISTONE H1.....	116
FIGURE 36 : C-MYC, BIOGENESE DES RIBOSOMES ET TRADUCTION.....	118
FIGURE 37 : MODELE DE L'ACTIVATION DE P53 PAR UN STRESS RIBOSOMIQUE	120
FIGURE 38 : REGION CHROMOSOMIQUE DU GENE CORTO.....	126
FIGURE 39 : PHENOTYPES LOF DE CORTO.	130
FIGURE 40 : PHENOTYPES GOF DE CORTO.	130

FIGURE 41 : STRUCTURE DE LA PROTEINE CORTO.....	134
FIGURE 42 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES CONSTRUCTIONS CORTO.	136

Figures des données complémentaires

FIGURE 1. DESCRIPTION DES TROIS LIGNEES TRANSGENIQUES PERMETTANT L'INACTIVATION DE <i>RPL12</i> PAR ARN INTERFERENCE.	188
FIGURE 2 : PHENOTYPES ENGENDRES PAR L'INACTIVATION DE <i>RPL12</i>	190
FIGURE 3 : SUREXPRESSION DE <i>CORTO</i> ET <i>RPL12</i> PAR <i>DA ::GAL4>RPL12Myc ; FHCORTOCD</i>	192
FIGURE 4 : CARACTERISATION DU MUTANT <i>CORTO</i> ⁴²⁰	194
FIGURE 5 : CARACTERISATION DU MUTANT <i>CORTO</i> ^{L1}	196
FIGURE 6 : QUANTIFICATION DES TRANSCRITS <i>CORTO</i>	196
FIGURE 7 : ETENDUE DES TRANSCRITS PRODUITS A PARTIR DU PROMOTEUR DE <i>CORTO</i> DANS LA COMBINAISON HETEROALLELIQUE <i>CORTO</i> ⁴²⁰ / <i>CORTO</i> ^{L1}	198
FIGURE 8 : EXPRESSION DE DIFFERENTS GENES EN CONDITION D'INACTIVATION DE <i>RPL12</i> PAR ARNi.	200
FIGURE 9 : EXPRESSION DE DIFFERENTS GENES EN CONDITION D'INACTIVATION DE <i>CORTO</i> PAR ARNi.	202
FIGURE 10 : QUANTIFICATION DES TRANSCRITS <i>CORTO</i> LOF OU GOF.....	204
FIGURE 11 : <i>CORTOCD</i> ET <i>RPL12</i> SONT ENRICHIS SUR LE GENE <i>RPS4</i>	206
FIGURE 12 : EXPRESSION DU GENE <i>HSP70</i> APRES UN CHOC THERMIQUE.	208
FIGURE 13 : <i>CORTOCD</i> ET <i>RPL12</i> SONT ENRICHIS SUR LE GENE <i>HSP70</i>	210
FIGURE 14 : RESEAU D'INTERACTIONS PROTEIQUES INTEROLOGFINDER CENTRE SUR <i>RPL12</i>	216
FIGURE 15 : RESEAU D'INTERACTIONS PROTEIQUES DROID CENTREE SUR <i>RPL12</i>	218
INTERACTIONS PROTEIQUES PUBLIEES ET PREDITES PAR DROID ENTRE <i>CYCG</i> , <i>RPL12</i> ET <i>ELONGIN-C</i> . LE TABLEAU SUR LA DROITE DONNE LE CODE COULEUR UTILISE EN FONCTION DE L'ORIGINE DES DONNEES EXPERIMENTALES. LES INTERACTIONS DE <i>CORTO</i> SONT RAJOUTEES EN ROSE.....	218
FIGURE 16 : MODELE DE COOPERATION ENTRE TRADUCTION ET TRANSCRIPTION CHEZ LES PROCARYOTES.....	224

LISTE DES ABREVIATIONS

Liste des abréviations

AIRN	<i>Antisense Igf2r RNA non coding</i>
ANT-C	<i>Antennapedia Complex</i>
ARF	<i>ADP ribosylation factor</i>
ARN Pol	ARN polymérase
Ash1	<i>absent, small, or homeotic-1</i>
bp	<i>base pair</i>
BRM	Brahma
BX-C	Bithorax complex
CB	corps de Cajal ou <i>cajal body</i>
CBP/p300	<i>CREB-binding protein</i>
CBX	Chromodomain BoX
CDK7	Cyclin Dependant Kinase 7
CENP-A	CENtromeric Protein - A
CHD	Chromodomain, Hélicase et DNA binding
ChIP	Chromatin Immuno Precipitation
COMPASS	<i>Complex Proteins Associated with Set1</i>
RISC	<i>RNA-Induced Silencing Complex</i>
RITS	<i>RNA-Induced Transcriptional Silencing complex</i>
CoREST	REST <i>co-repressor</i>
CPSF	Cleavage/Polyadenylation Specificity Factor
CTD	C Terminal Domain (de la sous-unité RBP1 de l'ARN Pol II)
CTF/NFI	CCAAT-binding transcription factor / NFIC nuclear factor I
DAPI	4',6'-DiAmidino-2-PhénylIndole
DFC	<i>Dense Fibrillar Compartment</i> ou compartiment fibrillaire dense du nucléole
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
DNMT	DNA Méthyltransférases
DPE	<i>Downstream Promoter Element</i>
dRAF	<i>related dRing-Associated factors</i>
DSIF	DRB (5,6-Dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole) Sensitivity Inducing Factor
DSP1	<i>Dorsal switch protein 1</i>
EJC	<i>Exon Junction Complex</i>
ESC	<i>Extra sex combs</i>
ESCL	<i>Extra sex combs Like</i>
ETP	<i>Enhancer</i> de Trithorax et Polycomb
ETS	<i>External Transcribed Spacer</i>
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
FC	<i>Fibrillar Center</i> ou centre fibrillaire du nucléole
GAF	GAGA Associated Factor, aussi appelé GAGA
GC	<i>Granular Component</i> ou composant granulaire du nucléole
GROseq	<i>Global Run On sequencing</i>
GST	Glutathione S-Transférase
GTF	<i>General Transcription Factor</i>
H2A.Bbd	<i>H2A.Bar Body deleted</i>
HAT	Histones Acétyltransférases
HDAC	Histones Désacétylases
HDM	Histone DéMéthylases
HLB	Histone Locus Body
HMT	Histones Méthyltransférases
HOTAIR	<i>HOX transcript antisense intergenic RNA</i>
HP1	Heterochromatin Protein 1
HSF	<i>Heat Shock Factor</i>
IGS	Inter Genic Spacer
INO80	<i>INositol requiring 80</i>
ISWI	<i>Imitation of SWItch</i>
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
KAT	Lysines Acétyltransférases

KMT	Lysine Méthyltransférases
LNA	<i>Locked Nucleic Acids</i>
lncARN	long ARN non codants
LSU	Large Sub Unit
miARN	microARN
MPT	Modification Post Traductionnelle
MSL	Male Specific Lethal
ncARN	ARN non codants
NELF	Negative ELongation Factor
NMD	Non-sense Mediated Decay
NOR	Nucleolar Organizer Region
PARG	poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase
PARP1	Poly ADP Ribose Protein 1
PC	Polycomb
PcG	Groupe Polycomb
PEV	Position Effect Variegation
PH	Polyhomeotic
PHO	Pleiohomeotic
PhoRC	Pleiohomeotic Repressive Complex
piARN	piwi associated RNA
PIC	Pre Initiation Complex
PML	ProMyelocytic Leukemia nuclear bodies
PRC1	Polycomb Repressive Complex 1
PRC2	Polycomb Repressive Complex 2
PR-DUB	Polycomb Repressive DeUbiquitination
PRE	Polycomb Response Element
PRMT	Protéine Arginine Méthyltransférases
PRPF	Pre-mRNA Processing Factor
PSC	Posterior Sex Combs
P-TEFb	Positive Transcription Elongation Factor b
REST	RE1-silencing transcription factor
RPB1	RNA Pol II sous-unité B1
RPS6K	Ribosomal protein S6 kinase
SAM	S-Adénosyl Méthionine
SCM	Sex Comb on Middleg
SET	Su(var)3-9 , Enhancer of Zeste et Trithorax
siARN	small interfering RNA
snARN	small nucleolar RNA
snRNP	small nucleolar RiboNucleoProtein
SPR	Surface Plasmon Resonance
SPT	Suppressor of Ty
SRB	Suppressor of RNA polymerase B
SRF	Serum Responsive Factor
SSU	Small Sub Unit
SWI/SNF	mating type SWItch et Sucrose Non-Fermenting
TAF	TBP Associated Factors
TBP	TATA box Binding Protein
TFII	Transcription Factor associés à l'ARN Polymérase II
TGS	Transcriptional Gene Silencing
Trr	Trithorax related
TRX	Trithorax
TSS	Transcriptional Start Site
UAS	<i>Upon Activating Sequence</i>
UTR	UnTranslated Region

Nomenclatures utilisées

Marques épigénétiques :

H3K27me3	tri-méthylation (me3) de la lysine 27 (K27) de l'histone H3
H3K4me3	tri-méthylation (me3) de la lysine 4 (K4) de l'histone H3
H3K27me3S28p	tri-méthylation (me3) de la lysine 27 (K27) et phosphorylation (p) de la Sérine 28 (S28) de l'histone H3
H4K14ac	acétylation (ac) de la lysine 14 (K14) de l'histone H4
H2BK123ub	ubiquitination (Ub) de la lysine 123 (K123) de l'histone H2B
.....	

Protéines ribosomiques :

Les protéines ribosomiques ont des nomenclatures différentes en fonction de l'organisme dans lequel elles sont étudiées. De plus, le gène et la protéine suivent également un code différent. Afin de faciliter la lecture, j'ai choisi d'utiliser un seul format pour toutes les espèces, gène et protéine confondus : RPL pour Ribosomal Protein Large subunit et RPS pour Ribosomal Protein Small subunit.

Exemples de différences de nomenclature pour RPL12.

Organisme	gène	protéine
<i>E.coli</i>	<i>rplK</i>	L11p
<i>S.cerevisiae</i>	<i>RPL12A</i>	RPL12p
<i>D.melanogaster</i>	<i>RpL12</i>	RpL12
<i>C.elegans</i>	<i>rpl12</i>	RPL12
<i>M.musculus</i>	<i>Rpl12</i>	RPL12
<i>H.sapiens</i>	<i>RPL12</i>	RPL12

INTRODUCTION

I- INTRODUCTION

Les eucaryotes ont évolué en espèces différentes depuis des millions d'années; cependant, un grand nombre de gènes sont très conservés chez les levures, les insectes, les plantes, l'homme *etc.*. Les processus intervenant dans la régulation des génomes sont pour la plupart communs à ces divers organismes.

Les eucaryotes multicellulaires sont composés de nombreux tissus différenciés. Une cellule musculaire n'exprime pas les mêmes gènes qu'un neurone. Cependant, l'information génétique contenue dans ces cellules est la même. Elle provient du contenu génétique délivré par les gamètes parentaux au cours de la fécondation. A partir du zygote seront engendrées de nombreuses cellules filles qui se différencieront et formeront l'organisme adulte. Le développement est une succession d'étapes coordonnées, en particulier grâce au contrôle de l'expression des gènes. Diverses régulations transcriptionnelles assurent la mise en place du plan d'organisation du corps, des organes et des tissus, tout en minimisant les effets de l'environnement et la variabilité intrinsèque, permettant ainsi de maintenir l'homéostasie du développement.

L'expression des gènes dépend de facteurs de transcription spécifiques activateurs ou répresseurs. La transcription fait intervenir différents complexes protéiques que l'on peut regrouper sous le terme générique de « machinerie transcriptionnelle ». Récemment, un niveau supplémentaire de régulation transcriptionnelle impliquant la structure de la chromatine a été mis en évidence. La molécule d'ADN, support de l'information génétique est en effet condensée dans le noyau sous forme de chromatine. La chromatine se subdivise en hétérochromatine, contenant de la chromatine très condensée peu permissive pour la transcription, et en euchromatine, contenant de la chromatine beaucoup moins dense, où la transcription peut avoir lieu ou non. Ainsi, l'état de compaction de la chromatine influe directement sur l'expression des gènes. Au cours du développement, les profils d'expression des gènes sont précocement mis en place, puis maintenus à une échelle plus globale par la conformation de la chromatine. La transmission de l'état de la chromatine aux cellules filles au cours des divisions cellulaires successives est appelée mémoire épigénétique.

Les protéines qui contrôlent l'état de la chromatine, en particulier les protéines des groupes Polycomb et Trithorax (PcG et TrxG), sont impliquées dans la mémoire épigénétique. Initialement découvertes chez la drosophile car elles maintiennent l'expression des gènes homéotiques au cours du développement, ces protéines ont fait l'objet de nombreuses études au cours des dix dernières années. On sait aujourd'hui que les protéines PcG et TrxG régulent de très nombreux gènes. L'intérêt croissant pour leur étude vient du fait que ces dernières, très conservées au cours de l'évolution, sont impliquées dans un très grand nombre de processus biologiques, en particulier les cancers. Les protéines PcG et TrxG forment des complexes protéiques de composition variable qui maintiennent respectivement la répression et l'activation des gènes. Certains co-facteurs de ces complexes interviennent dans des processus de régulation à la fois positive et négative. C'est le cas des co-facteurs appartenant au groupe des Enhancers de Trithorax et Polycomb (ETP), qui pourraient assurer les transitions entre état activé et état réprimé des gènes.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à un ETP de la drosophile, appelé Corto. La protéine Corto contient un domaine qui rappelle les chromodomaines de certains facteurs chromatiniens. J'ai étudié ce domaine afin de comprendre son rôle dans l'adressage de la protéine à la chromatine et dans la régulation de la transcription chez *Drosophila melanogaster*. Les résultats que j'ai obtenus montrent que Corto interagit avec une protéine ribosomique nucléaire méthylée, RPL12, *via* son chromodomaine. Corto et RPL12 co-régulent l'expression d'un grand nombre de gènes, en particulier ceux qui codent les composants du ribosome. Ainsi, l'interaction entre l'ETP Corto et RPL12 pourrait intervenir dans le contrôle de la biogenèse des ribosomes et donc de l'homéostasie cellulaire.

1 Notions d'épigénétique

1.1. Historique, définition

Le terme "épigénétique" a été proposé en 1942 par Conrad H. Waddington, biologiste du développement, paléontologue et généticien. Il s'inspire d'épigenèse : la théorie selon laquelle un embryon se développe par différenciation progressive des organes (par opposition à la théorie de la préformation). Waddington, qui souhaitait réunir la génétique, relativement récente à l'époque, et l'embryologie, a défini l'épigénétique comme l'ensemble des mécanismes par lesquels le génotype engendre le phénotype (Figure 1). Aujourd'hui, la définition la plus généralement admise est « l'étude des changements de l'expression des gènes, transmissibles à travers la mitose et/ou la méiose, n'impliquant aucune modification de la séquence nucléotidique de l'ADN » (Riggs *et al.*, 1996). La notion d'hérédité y est donc centrale. Le paysage épigénétique de Waddington schématise le contrôle épigénétique du développement (Figure 1).

On peut estimer l'impact de l'épigénétique chez des jumeaux monozygotes. En effet, alors qu'ils partagent le même génome, leurs profils épigénétiques diffèrent de plus en plus au cours du temps. Cela est particulièrement vrai pour des jumeaux élevés séparément dans deux environnements distincts, ou ayant des styles de vie très différents (*i.e.* habitudes nutritionnelles, consommation de tabac, d'alcool et de médicaments, historique des maladies, activité physique). Ces derniers diffèrent plus que ceux de jumeaux ayant vécu ensemble ou ayant partagé des environnements et des expériences similaires (Fraga *et al.*, 2005).

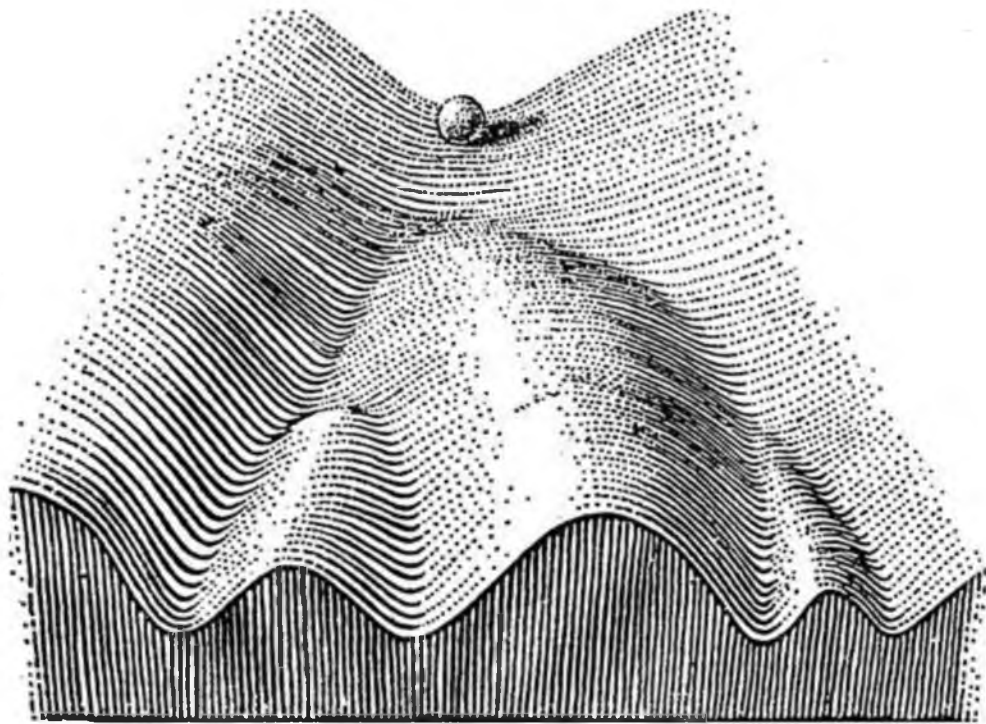


Figure 1 : Le paysage épigénétique.

Le chemin suivi par la balle (*e.g.* une cellule souche pluripotente), qui roule vers l'observateur, correspond à l'histoire du développement. Le paysage épigénétique est constitué de vallées et de collines; il est sous-tendu par les gènes. Il existe une première alternative pour cette cellule, s'engager dans la vallée de droite où dans celle de gauche (qui correspondent à deux voies de détermination différentes). Plus loin sur le parcours, une seconde alternative est possible. Plusieurs choix de voies apparaissent ainsi dans le chemin développemental mais il n'y a pas de retour en arrière possible. A l'extrémité du chemin, la balle tombe dans un puit, qui schématise le type cellulaire. Ainsi, le paysage épigénétique canalise le développement. Il est sous-tendu par les gènes. Tiré de C.H. Waddington (1942). «epigenotype». *Effort* 1: 18-20.

1.2. La mémoire épigénétique

Le maintien de l'état transcriptionnel des gènes au travers des mitoses et/ou de la méiose, en absence des facteurs qui l'ont induit, est qualifié de mémoire épigénétique. La mémoire épigénétique a été mise en évidence pour la première fois chez la drosophile grâce aux travaux de génétique du développement, plus précisément lors de l'étude de la régulation de l'expression des gènes homéotiques (Figure 2A). Les gènes homéotiques spécifient l'identité des segments selon l'axe antéro-postérieur du corps. Chez la drosophile, les gènes Hox sont regroupés en deux complexes sur le chromosome 3R (Figure 2B). Le premier complexe qui a été découvert est le complexe Bithorax (BX-C). Il contient trois gènes : *Ubx*, *Abd-A* et *Abd-B*, qui sont responsables de l'identité du 3^{ème} segment thoracique et des segments abdominaux. Le second "cluster" est le complexe Antennapedia (ANT-C), qui contient cinq gènes (*lab*, *pb*, *Dfd*, *Scr* et *Antp*) responsables de l'identité de la tête et des deux premiers segments thoraciques. L'expression ectopique de l'un de ces gènes transforme une partie du corps en une autre, cette transformation est dite homéotique. Le patron d'expression des gènes homéotiques est initié par des facteurs de transcription précoces codés par les gènes de segmentation. L'expression de ces facteurs de transcription est transitoire et s'arrête après la gastrulation. L'état transcrit ou réprimé des gènes homéotiques est maintenu pendant la suite du développement par les protéines Polycomb (PcG) et Trithorax (TrxG). Ce maintien de l'état transcriptionnel des gènes est appelé mémoire épigénétique. Nous verrons que les protéines PcG et TrxG forment des complexes qui se lient à la chromatine et maintiennent respectivement l'état réprimé ou activé des gènes.

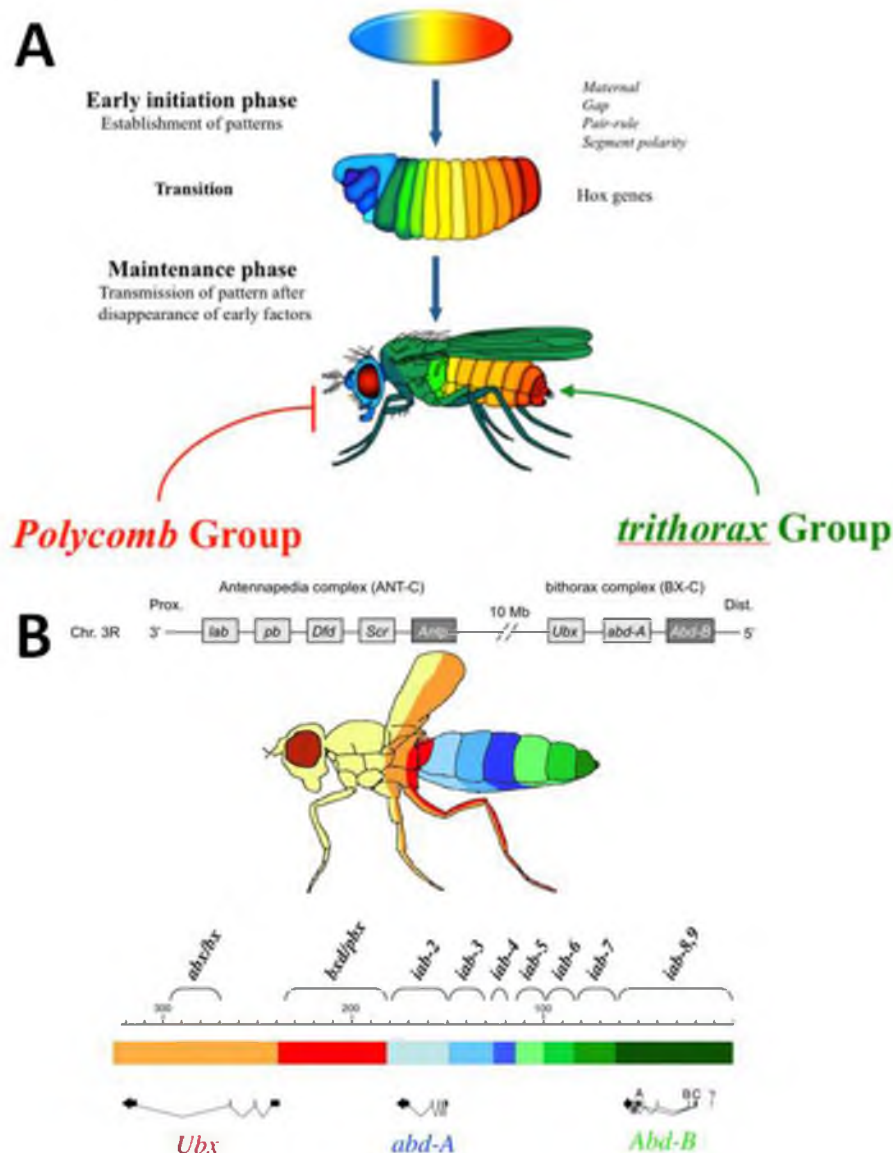


Figure 2 : PcG et TrxG

A Les protéines TrxG jouent un rôle dans le maintien de l'activation des gènes; inversement, les protéines PcG interviennent dans le maintien de la répression des gènes. Les individus mutants pour un gène *trxG* ou *PcG* présentent des dérégulations tardives de l'expression des gènes *Hox*, qui induisent des phénotypes homéotiques. D'une façon générale, les mutants pour les gènes *trxG* présentent des phénotypes de perte de fonction des gènes homéotiques et inversement les mutants pour les gènes *PcG* présentent des phénotypes de gain de fonction des gènes homéotiques. C'est sur ces critères génétiques que la plupart des gènes des groupes *trxG* et *PcG* ont été identifiés chez la drosophile (Brock et Fisher, 2005).

B Schéma illustrant les complexes antérieur et postérieur de gènes Hox chez la drosophile (Adapté de Grimaud *et al.*, 2006). La barre multicolore représente un agrandissement du complexe BX-C. Les trois gènes homéotiques, *Ubx*, *abd-A* et *Abd-B* sont indiqués. Les segments adultes affectés par les mutations dans chaque région *cis*-régulatrice (*abx/bx*, *bxl/pbx*, *iab-2* à *iab-8*, *iab-9*) sont indiqués sur le dessin avec le même code couleur (Adapté de Maeda et Karch, 2006).

1.3. Les supports de la mémoire épigénétique

Les supports moléculaires de la mémoire épigénétique sont l'ADN, l'ARN et la chromatine. Ils ne sont pas indépendants les uns des autres et agissent de façon concertée et/ou séquentielle. Je les décrirai très brièvement ici.

1.3.1. L'ADN : l'ADN méthylé

Certaines bases nucléotidiques de l'ADN peuvent être modifiées par l'addition d'un groupement méthyl (CH₃). Chez les bactéries, la méthylation peut intervenir sur les cytosines, mais aussi sur la position N6 des adénines, sur les séquences 5'-GATC-3'. Chez les vertébrés, la cytosine est méthylée (5-méthylcytosine) sur les séquences CG de l'ADN, en particulier dans les îlots CpG (région génomique enrichie en dinucléotides CG). La méthylation de l'ADN a un impact sur le taux d'expression des gènes. Chez les eucaryotes, lorsque les îlots CpG d'un promoteur sont méthylés, le gène correspondant est réprimé (pour revue, voir Deaton et Bird, 2011).

Les enzymes qui méthylent l'ADN font partie de la famille des DNMT (DNA MéthylTransférases). Par exemple chez les mammifères, ces enzymes sont responsables de la mise en place du patron de méthylation du génome au cours du développement embryonnaire. Chez la drosophile, l'existence d'ADN méthylé est controversée. La drosophile possède une DNMT (Dnmt2) qui pourrait méthyler à la fois l'ADN et les ARNt (Krauss et Reuter, 2011).

1.3.2. L'ARN : les ARN non codants

Différents types d'ARN sont produits dans les cellules : les ARN ribosomiques représentent jusqu'à 80% des ARN cellulaires, les ARN de transfert environ 15%, enfin les ARNm ne représentent que 2 à 3% des ARN cellulaires. Les autres ARN, non codants, peuvent être classés en différentes catégories selon leur taille et leur voie de biogenèse.

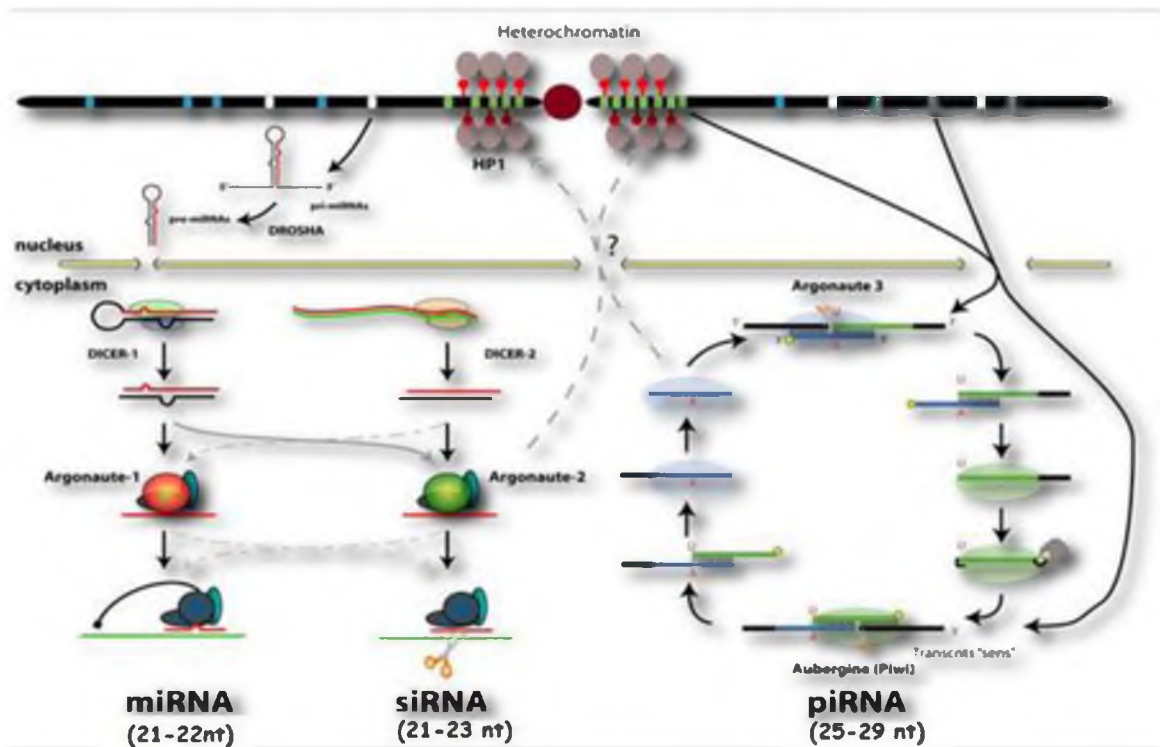


Figure 3 : Complexité des petits ARN chez la drosophile.

Les trois espèces d'ARN misipi peuvent être distinguées par leur biogénèse, leur taille, l'identification de leur partenaire Argonaute et leur mécanisme d'inactivation des gènes. Les protéines Dicer 1 et 2 génèrent les mi et les siRNA à partir d'ARN double brin en les clivant. Les piARN sont produits dans la lignée germinale par le mécanisme appelé « ping-pong ». D'après C. Antoniewski

Les lncARN (*long non coding RNA*) se trouvent dans différents compartiments nucléaires suggérant des rôles précis en fonction de leur localisation. Ces ARN ont une taille supérieure à 2 Kb. Les plus étudiés sont *Xist* (*X inactive specific transcript*), responsable de la compensation de dose chez la femelle des mammifères, *AIRN* (*Antisense Igf2r RNA non coding*), responsable de l'inactivation de trois gènes du "cluster" *Igf2r* sur l'allèle paternel du chromosome 17 de la souris, et *HOTAIR* (*HOX Transcript Antisense Intergenic RNA*) transcrit à partir du locus *HOX C* et qui interviendrait en *trans* dans le recrutement d'un complexe Polycomb sur le locus *HOX D* permettant l'inactivation des gènes de ce locus de façon tissu-spécifique (Rinn *et al.*, 2007 et pour revue, voir Hung et Chang, 2010 ; Saxena et Carninci, 2011).

Après la découverte de l'interférence par les ARN chez *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.*, 1998 ; Mello et Conte, 2004), la caractérisation moléculaire de ce mécanisme a permis de mettre en évidence des petits ARN de 21 à 25 nt nommés siARN (*small interfering RNA*). Deux autres groupes de petits ARN ont été décrits ultérieurement, ce sont les miARN (microARN) et les piARN (*piwi associated RNA*). On distingue ces trois groupes de petits ARN (misipi) par leur voie de biogenèse, leur taille, leur mode d'action et les protéines Argonautes avec lesquelles elles s'associent (Figure 3).

Chez la plupart des organismes étudiés, les miARN induisent une répression post-transcriptionnelle en bloquant la traduction dans le cytoplasme, alors que les siARN peuvent agir soit dans le cytoplasme, post-transcriptionnellement (PTGS ou *Post-Transcriptional Gene Silencing*), en dégradant de longs ARN *via* le complexe RISC, (*RNA-Induced Silencing Complex*), soit directement dans le noyau de façon co-transcriptionnelle (TGS ou *Transcriptional Gene Silencing*), en induisant une hétérochromatinisation locale de la région génomique ciblée par le complexe RITS (*RNA-Induced Transcriptional Silencing complex*) (pour revue, voir Verdel *et al.*, 2009).

Les piARN sont de plus grande taille (entre 25 et 29nt). Leur production ne fait pas intervenir de protéine Dicer. Chez la drosophile, les piARN sont principalement dérivés du brin antisens de transcrits d'éléments transposables hétérochromatiques. Le modèle du « ping-pong » (Figure 3) explique la production des piARN de cette façon : les piARN antisens associés à Piwi et Aubergine génèrent des piARN sens en ciblant le transcrit de transposons hétérochromatiques (non fonctionnels) ou euchromatiques (qui peuvent être fonctionnels).

Les piARN sens pourraient être à leur tour utilisés pour produire d'autres piARN antisens en guidant le clivage des transcrits antisens synthétisés dans le locus hétérochromatique. Les piARN jouent un rôle important dans la régulation de l'expression et donc de la mobilité des transposons dans les cellules germinales (Aravin *et al.*, 2007).

Les lncARN, siARN et piARN modifient la structure de la chromatine et induisent une répression transcriptionnelle de leurs cibles qui peut être transmise aux cellules filles. Les miARN induisent une répression traductionnelle des gènes cibles mais peuvent être eux-mêmes hérités par le cytoplasme d'un gamète parental ou lors des mitoses. Il s'agit donc bien de mécanismes épigénétiques.

1.3.3. La chromatine

Dans les cellules, l'ADN est compacté sous forme de chromatine. Cette structure a été décrite par Miescher en 1869 et nommée chromatine par Fleming en 1882. La composition et la structure de la chromatine ainsi que son impact sur l'expression des gènes fera l'objet du chapitre suivant.

1.4. Exemples de processus épigénétiques

Ces supports moléculaires de la mémoire épigénétique interviennent dans de très nombreux processus. Je ne les décrirai pas en détail ici mais je prendrai quelques exemples frappants :

(1) Le premier exemple, déjà cité ci-dessus, est celui du maintien de l'expression des gènes homéotiques au cours du développement (mémoire épigénétique). Il fait intervenir les complexes PcG et TrxG qui contrôlent la structure de la chromatine.

(2) Un second exemple est celui de l'empreinte parentale, découverte chez les mammifères au début des années 80. Alors que l'expression de la plupart des gènes est bi-allélique, un petit nombre d'entre eux présente une expression mono-allélique, maternelle ou paternelle. Ce processus, appelé empreinte parentale, dépend de mécanismes épigénétiques, en particulier de la méthylation de l'ADN, d'ARN non codants et de modifications post-traductionnelles des histones (Anaka *et al.*, 2009).

(3) Chez la femelle des mammifères, l'un des deux chromosomes X est inactivé (Lyon, 1961). Ce processus rétablit l'égalité du taux d'expression des gènes portés par le chromosome X entre la femelle et le mâle. Il est pour cela appelé compensation de dose. L'un ou l'autre des chromosomes X est inactivé (de façon aléatoire) juste après l'implantation de la blastula dans la paroi utérine. ARN non codants, méthylation de l'ADN, et complexes chromatiniens interviennent de façon séquentielle dans la compensation de dose. Chez la drosophile, la compensation de dose se manifeste de façon opposée: les gènes de l'unique chromosome X du mâle sont beaucoup plus exprimés (pour revue, voir Conrad et Akhtar, 2011).

(4) Le *bookmarking* est un mécanisme par lequel le promoteur d'un gène exprimé reste "signalé" durant la mitose par des facteurs de transcription et autres marques épigénétiques apposées sur la chromatine, diminuant ainsi sa compaction locale (Zaidi *et al.*, 2010). Ceci faciliterait la reprise rapide de la transcription des gènes "signalés" dès la phase G1 suivante. Ainsi, le maintien de l'activation transcriptionnelle du gène (mémoire épigénétique) serait assuré au cours des divisions cellulaires successives.

(5) On observe fréquemment une perturbation de l'expression des gènes dont l'environnement chromatinien est modifié, par exemple lors d'une translocation, on parle alors d'effet de position. Ce processus a été décrit chez la drosophile notamment grâce à des translocations plaçant le gène *white* (qui code le transporteur de pigment dans l'œil) à proximité de l'hétérochromatine péricentromérique. Il est connu sous le nom de PEV pour *Position Effect Variegation* (Weiler and Wakimoto, 1995 ; Grewal and Elgin, 2002). En effet, l'hétérochromatine péricentromérique, dont l'expansion est variable d'une cellule à une autre, induit l'inactivation stochastique du gène *white* (variégation de la pigmentation).

(6) Enfin, la transmission d'informations épigénétiques au travers des générations a été beaucoup étudiée chez les plantes, et en particulier chez le maïs. Ces travaux ont permis de mettre en évidence un cas particulier de mémoire épigénétique appelé paramutation (Chandler *et al.*, 2004). La paramutation repose sur l'interaction entre deux allèles d'un locus (dans un individu hétérozygote) qui conduit à la modification épigénétique de l'un des allèles (épimutation) par l'autre (sans modification de la séquence d'ADN), ce nouvel état devenant héritable.

La paramutation a également été mise en évidence chez la souris (Rassoulzadegan *et al.*, 2006) et plus récemment, chez la drosophile (de Vanssay *et al.*, soumis). De nombreux cas de paramutation décrits chez les plantes reposent sur la présence de transposons dont l'ADN est méthylé. Les génomes des eucaryotes étant très riches en éléments transposables [les éléments transposables ou leurs dérivés représentent 50% du génome humain, 15% du génome de *Drosophila melanogaster*, et plus de 70% du génome du maïs (Castillo *et al.*, 2011 ; Wessler 2006)], il est possible que la paramutation soit un mécanisme plus largement répandu.

L'altération des processus épigénétiques physiologiques comme l'empreinte parentale ou l'inactivation du chromosome X, et, d'un point de vue plus général, la perturbation de la mémoire épigénétique, peut conduire à des maladies elles-mêmes qualifiées d'épigénétiques. Ainsi, ces processus épigénétiques sont impliqués dans la tératogenèse, l'apparition et l'évolution des cancers, les maladies métaboliques, et de nombreuses autres pathologies.

1.5. Perturbation de la mémoire épigénétique par l'environnement

Certains facteurs environnementaux induisent des modifications épigénétiques qui peuvent être transmises au travers des générations. Par exemple chez l'homme, la privation d'acide folique au cours de la grossesse serait responsable de la plus grande incidence de schizophrénies chez les descendants des victimes de la famine en Hollande durant la seconde guerre mondiale (Brown and Susser 2008). Chez les souris *Agouti*, une supplémentation en acide folique diminue l'incidence de l'obésité héréditaire (Waterland RA, 2008). Chez les mammifères, l'alimentation de la mère durant la gestation, et également avant la conception, a un impact sur le phénotype de sa descendance; par exemple, l'alimentation peut favoriser des maladies métaboliques (obésité, diabète) (pour revue, voir Zhang S *et al.*, 2010 ; Seki *et al.*, 2012). L'acide folique est un donneur de groupements méthyles : en cas de déprivation, le profil de méthylation de l'ADN est modifié et l'information transmise à la génération suivante est perturbée.

Chez le rat, le stress induit par une séparation précoce ou un défaut d'attention de la part de la mère induit un comportement asocial, alors que la descendance de mères apportant un soin accru durant la première semaine de vie montre une meilleure résistance au stress. Ceci serait lié à un taux d'hormone adrénocorticotropique et de corticostérone élevé (Liu *et al.*, 1997; Francis *et al.*, 1999). Ces résultats suggèrent que le comportement maternel conditionne les réponses au stress de la descendance en reprogrammant l'information épigénétique dans les glandes neuroendocrines.

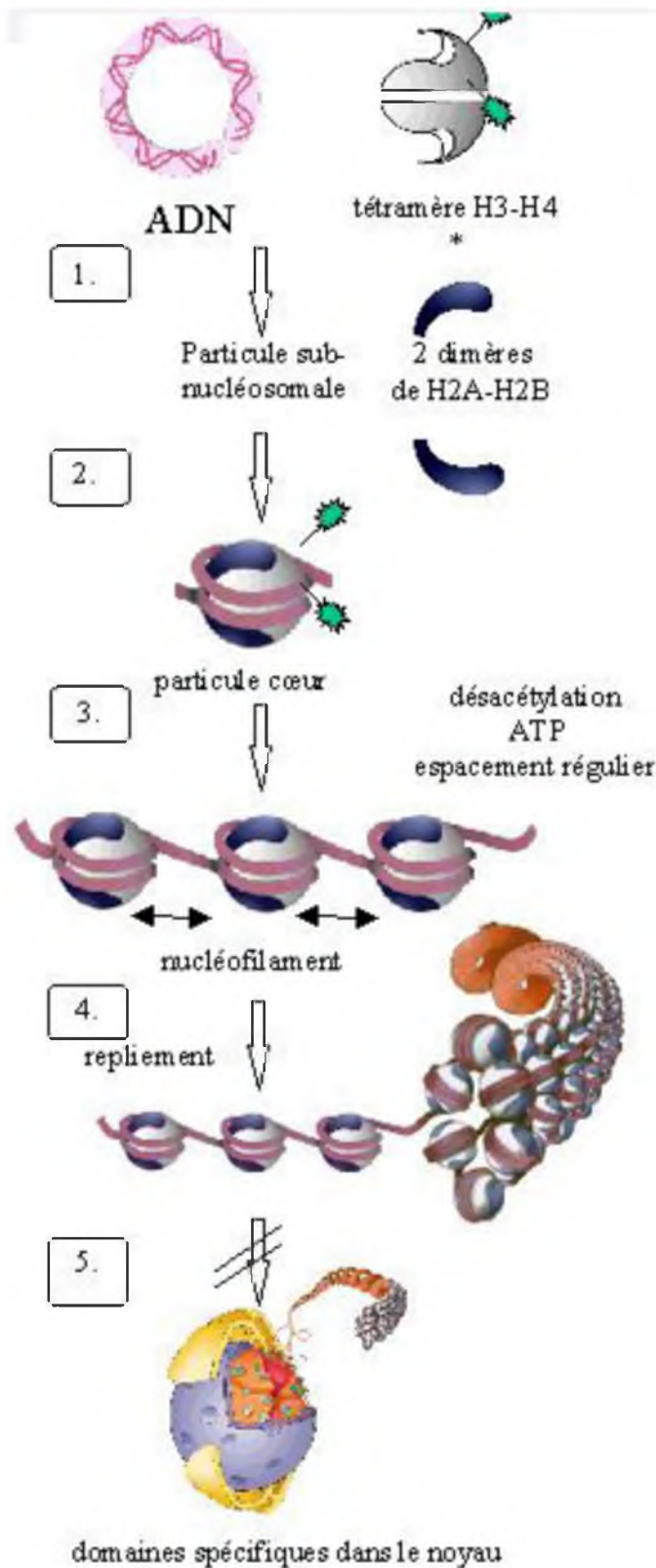


Figure 4 : Différents niveaux de compaction de la chromatine.

L'assemblage commence avec la mise en place d'un hétérotétramère (H3-H4) (1), auquel vient s'ajouter deux dimères H2A-H2B (2). Les histones nouvellement synthétisées sont spécifiquement modifiées; la modification la plus conservée est l'acétylation de l'histone H4 sur les lysines 5 et 12 (H3-H4*). L'étape de maturation nécessite la présence d'ATP afin d'établir un espacement régulier des nucléosomes. Les histones nouvellement incorporées sont désacétylées (3). L'incorporation des histones H1 est accompagnée du repliement du nucléofilament. Le modèle de type solénoïde (6 nucléosomes par tour) est présenté ici (4). Finalement, plusieurs repliements successifs conduisent à des niveaux d'organisation supérieurs jusqu'à la formation du chromosome mitotique (5). Adapté de Ridgway *et al.*, 2002.

2. La chromatine et le "code histone"

2.1. Structure et organisation de la chromatine

Au sein du noyau interphasique, l'état de compaction de l'ADN n'est pas homogène; en effet, une simple coloration HE (Hématoxyline/Eosine) laisse apparaître différentes zones en microscopie optique. On distingue l'hétérochromatine, en permanence très condensée, et l'euchromatine, décondensée pendant l'interphase mais condensée jusqu'à 10 000 fois dans les chromosomes métaphasiques (Li *et al.*, 1998). L'hétérochromatine est généralement localisée en périphérie du noyau et du nucléole tandis que l'euchromatine est répartie à l'intérieur du nucléoplasme, préférentiellement au centre du noyau.

La compaction de l'ADN est liée à son enroulement autour de nucléosomes (Figure 4). Les nucléosomes sont formés d'octamères d'histones. Le cœur histone est un tétramère formé de deux histones H3 et de deux histones H4, entouré par deux hétérodimères d'histones H2A et H2B, autour desquels 147,5 paires de bases d'ADN sont enroulées. La liaison entre l'ADN et le nucléosome implique les résidus arginines des histones qui se glissent à l'intérieur du petit sillon de la double hélice, ainsi que des interactions amides avec les groupements phosphates et des interactions hydrophobes avec les sucres de l'ADN (Wolffe and Hayes, 1999). L'enroulement de l'ADN autour des nucléosomes produit le nucléofilament. L'histone H1 clampe l'ADN sur le nucléosome ainsi formé et permet de faire la liaison entre nucléosomes adjacents, favorisant un degré supplémentaire de compaction en passant d'une fibre de 11 nm à une fibre de 30 nm (Bednar *et al.*, 1998).

Des variants des histones canoniques sont associés à des fonctions particulières. Par exemple, le variant de l'histone H3, CenH3 (encore appelé CENP-A chez les mammifères) se trouve au niveau de la chromatine centromérique, un autre variant de H3, H3.3, est associé aux gènes transcrits. Ces variants ne diffèrent de l'histone canonique H3 que par 4 ou 5 acides aminés. Quatre variants de l'histone H2A ont été décrits chez les mammifères : H2A.Z, H2A.X, macroH2A and H2A.Bbd (*Bar Body deleted*) (pour revue, voir Yuan et Zhu, 2012). Par exemple le variant macroH2A, est associé au chromosome X inactif des femelles de mammifères, alors que le variant H2A.Bbd en est totalement exclu. H2A.Bbd est présent dans tout le reste du génome (Chadwick *et al.*, 2001).

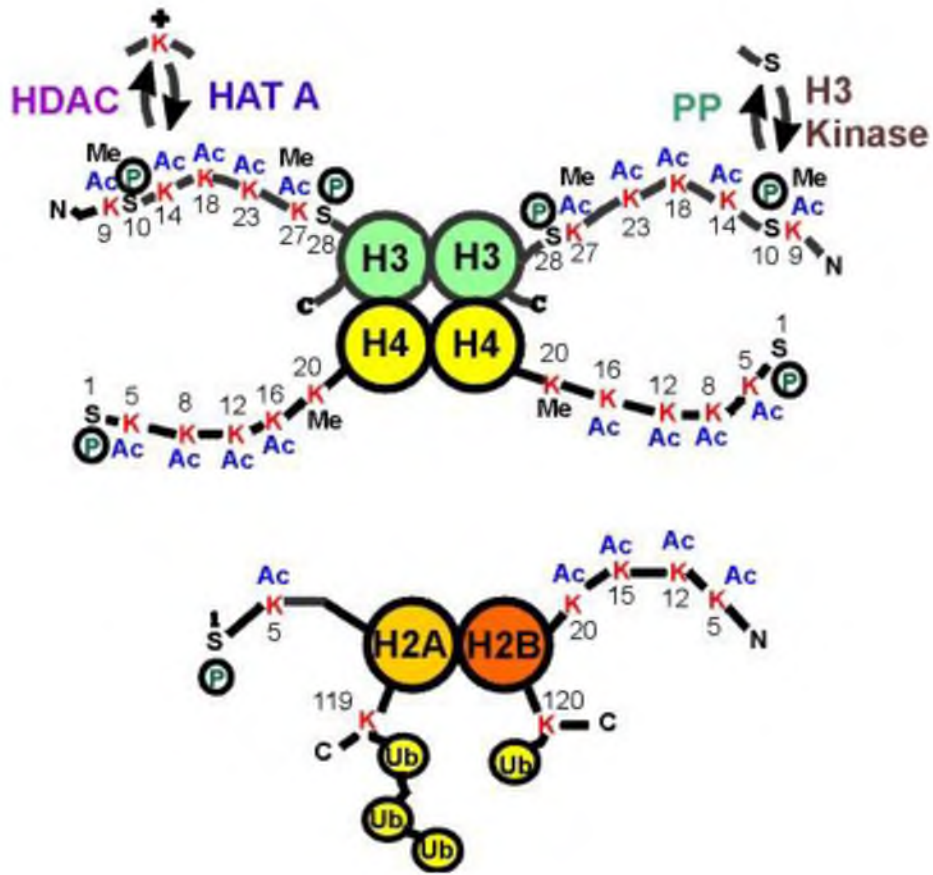


Figure 5 : Modifications des l'histones.

Les histones sont soumises à de nombreuses modifications post-traductionnelles. Ces modifications incluent les acétylations (Ac), les méthylation (Me), les déiminations (Clf), les phosphorylations (P), les ubiquitinations (Ub) et les isomérisations (iso). Ne sont indiquées ici que les marques Ac, Me, P. D'après http://mol-biol4masters.masters.orkraj.org/html/Gene_Expression_III3-Chromosomal_Nature_Before_During_and_After_Gene_Activation.htm

2.2. Les modifications post-traductionnelles des histones

Les histones subissent de nombreuses modifications post-traductionnelles, telles que des phosphorylations, méthylations, acétylations, sumoylations, ubiquitinations... appelées marques épigénétiques. La plupart de ces modifications ont lieu directement dans le noyau alors que les histones et l'ADN sont déjà assemblés en nucléosomes. L'histone dont on connaît la plus grande diversité de modifications post-traductionnelles est l'histone H3 (Figure 5). Les kinases phosphorylent les thréonines, les sérines ou les tyrosines, les HAT (Histones AcétylTransférases) acétylent les lysines et les arginines, les HMTases (Histones Méthyltransférases) méthylent les lysines ou les arginines, et d'autres enzymes modifient principalement les lysines en rajoutant des résidus ubiquitine, ADP-ribose, carbonyl, biotine... Plus de 67 types de modifications post-traductionnelles des histones ont été identifiées dont, récemment, la crotonylation des lysines (Tan *et al.*, 2011 et pour revue, voir Bannister et Kouzarides, 2011 et Figures 5).

2.2.1. Nomenclature

La grande diversité des enzymes de modification post-traductionnelle des histones, ainsi que leur conservation au cours de l'évolution dans différentes espèces, a conduit plusieurs chercheurs à réaliser un travail collectif pour harmoniser la nomenclature de ces protéines. L'article « *New Nomenclature for Chromatin-Modifying Enzymes* » paru en 2007 dans la revue Cell, concerne la nomenclature des lysines déméthylases, des lysines acétyltransférases et des lysines méthyltransférases. J'ai regroupé les trois Tableaux de nomenclature en Annexe 3. Mon but n'étant pas de faire une revue exhaustive de toutes les protéines ou complexes intervenant chez les différents organismes, je ne citerai que les principales enzymes responsables des modifications les plus étudiées.

2.2.2. Les kinases

Le domaine kinase catalyse le transfert d'un groupement phosphate d'un donneur comme l'ATP ou le GTP, spécifiquement vers une sérine, une thréonine ou une tyrosine de la protéine receveuse, ici une histone.

La protéine kinase Aurora B phosphoryle la sérine 10 de l'histone H3 durant la mitose, et également sa sérine 28 au début de la prophase. H3S10ph est nécessaire pour une condensation chromosomique correcte (Goto *et al.*, 2002). Souvent considérée comme une marque spécifique de la mitose, la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 peut cependant être apposée par la kinase JIL1 durant l'interphase. Cette phosphorylation contrecarre la propagation de l'hétérochromatine et empêche la répression génique chez la drosophile (Wang *et al.*, 2011).

La kinase Haspin phosphoryle la thréonine 3 de l'histone H3 durant la prophase. Elle inhiberait la fixation de TFIID sur la marque H3K4me3 lors de la mitose, et régulerait négativement la transcription (Varier *et al.*, 2010). Elle est importante pour un alignement correct des chromosomes sur la plaque métaphasique (Dai *et al.*, 2005).

La Ribosomal protein S6 kinase (ou MSK1 et 2 chez les mammifères) phosphoryle la sérine 28 de l'histone H3, ce qui entraîne le déplacement des complexes Polycomb fixés sur H3K27me3, provoquant ainsi l'activation du gène (voir *Phospho-méthyl switch*; Lau et Cheung, 2011). RpS6K est une kinase mitogène activée par le stress. Elle joue un rôle important dans la réponse aux stimuli environnementaux (Gehani *et al.*, 2010).

2.2.3. Les histones acétyltransférases

L'acétylation des résidus lysines des histones est médiée par des lysines acétyltransférases (KAT). Elles catalysent le transfert d'un groupement acétyl à partir d'un acétyl-CoA vers les résidus lysines. Ce transfert neutralise la charge positive des lysines et donc diminue l'interaction entre l'histone et l'ADN. Les histones acétylées servent également de plateforme de recrutement pour les protéines à bromodomaine. Les histones acétyltransférases sont majoritairement impliquées dans l'activation transcriptionnelle.

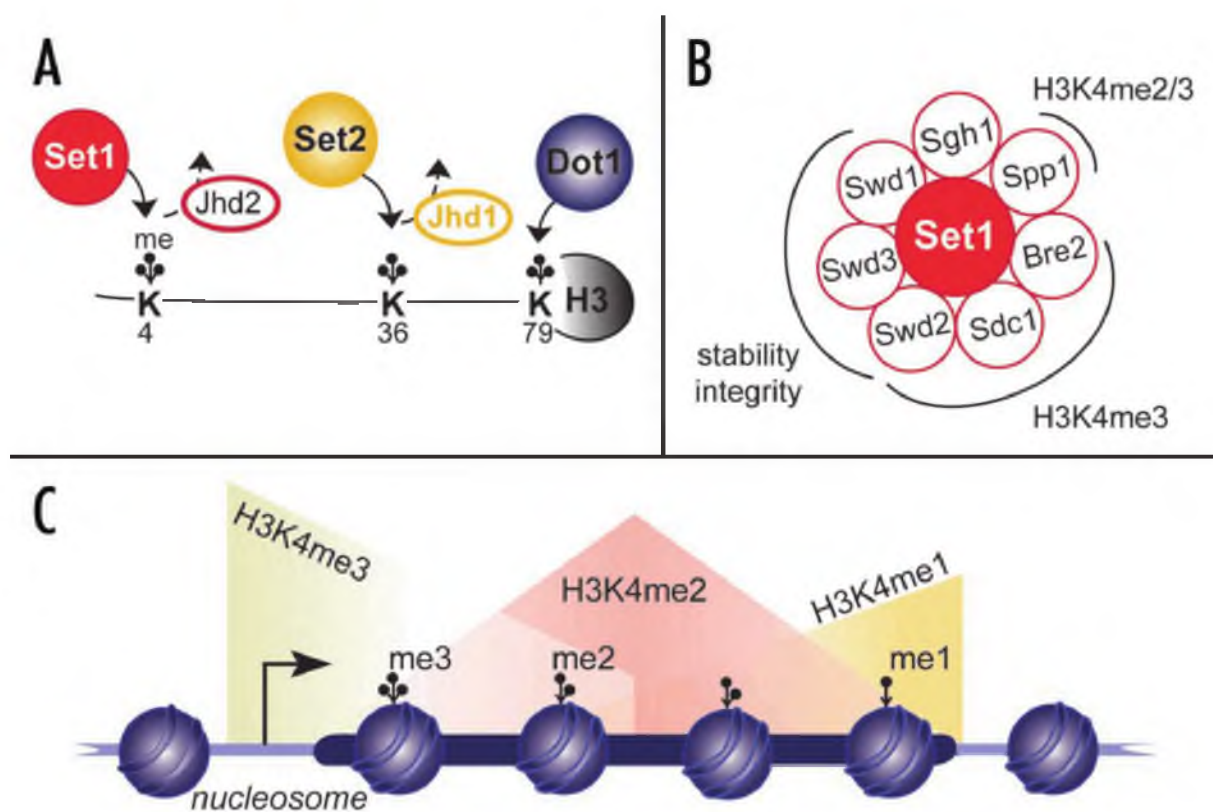


Figure 6 : Méthylation de H3K4 chez *S. cerevisiae*.

A) Les HMT Set1, Set2 et Dot1 mono-, di- ou tri-méthylent H3K4, K36 et K79, respectivement chez *S. cerevisiae*. Les histones déméthylases JHD2 and JHD1 déméthylent H3K4me3 and H3K36me3, respectivement.

B) Le complexe SET1C consiste en 8 sous-unités ayant des propriétés régulatrices distinctes.

C) Distribution différentielle des marques H3K4me1, me2 and me3 le long d'un gène transcrit. Tiré de Pinskaya et Morillon, 2009.

Chez l'homme, l'acétylation de H3K9 près d'un *Transcriptional Start Site (TSS)* est essentiellement corrélée à l'activation transcriptionnelle (Nishida *et al.*, 2006). Par exemple, GCN5 et TIP60 acétylent H3K9, ce qui entraîne le recrutement de TFIID sur le promoteur des gènes cibles (Agalioti *et al.*, 2002 ; Rybtsova *et al.*, 2007). Chez la drosophile, l'acétylation de H3K27 est médiée par CBP/p300 et contre l'activité des complexes PcG (Tie *et al.*, 2009).

2.2.4. Les histones méthyltransférases (HMT)

Parmi les histones méthyltransférases, on distingue les KMT (Lysines Méthyltransférases) et les PRMT (Protéines Arginines Méthyltransférases) (pour revue voir Zhang *et al.*, 2012).

2.2.4.1. Les lysines méthyltransférases

Ces enzymes catalysent le transfert de un, deux ou trois groupements méthyles au résidu lysine, à partir d'un donneur SAM (S-Adénosyl Méthionine). La plupart des lysines méthyltransférases possèdent un domaine catalytique, le domaine SET, qui permet la mono-, di- ou tri-méthylation des lysines cibles. Ce domaine tire son nom des premières enzymes identifiées possédant ce domaine, à savoir : *Su(var)3-9* (diméthyle H3K9), *Enhancer of Zeste* (triméthyle H3K27) et *Trithorax* (triméthyle H3K4). Ce domaine catalytique est très conservé au cours de l'évolution (Rea *et al.*, 2000).

Les histones mono-, di-, ou triméthylées ont pour effet d'activer (H3K4me2/3, H3K36me3, H3K79me3...) ou de réprimer (H3K27me3, H3K9me2/3...) la transcription. Certaines de ces marques épigénétiques sont présentées dans les Tableaux 1 (marques activatrices) et 2 (marques répressives).

2.2.4.2. Les protéines arginine méthyltransférases (PRMT).

Ces enzymes peuvent mono- ou di-métyler des résidus arginine. Les PRMT sont généralement des activateurs transcriptionnels mais certaines, comme PRMT6 chez l'homme, catalysent des marques épigénétiques répressives. PRMT6, en diméthylant H3R2me2, empêche la sous-unité Spp1 de la méthylase SET1 de se fixer à la queue N-terminale de l'histone H3 et de métyler la lysine 4 (Figure 6B). Les deux marques H3R2me2 et H3K4me3 sont mutuellement exclusives (Kirmizis A *et al.*, 2007).

Marque	Enzyme	Organisme	Fonctions	Référence
H3K4	SET1	<i>Sc</i>	COMPASS (<i>Complex Proteins Associated with Set1</i>) peut mono-, di- et triméthyliser H3K4.	Miller <i>et al.</i> , 2001 Krogan <i>et al.</i> , 2002 ; Roguev <i>et al.</i> , 2001 ; Shilatifard, 2006 ; Wood <i>et al.</i> , 2007
	dSET1	<i>Dm</i>	Responsable des di- et tri-méthylations de H3K4 dans les stades tardifs du développement larvaire.	
	TrX, TrR, ASH1	<i>Dm</i>	Réguleraient des gènes ou des voies de signalisation clés du développement; joueraient un rôle plus précoce que dSET1 dans le développement.	Hallson <i>et al.</i> , 2012
H3K36	ASH1	<i>Dm</i>	Triméthylation de H3K36, marque associée à l'activation de la transcription; prévient la propagation de la méthylation de H3K27 par le complexe PRC2.	Tanaka Y <i>et al.</i> , 2007
	SET2	<i>Sc</i>		Yuan W <i>et al.</i> , 2011
H3K79	DOT1L DOT1	<i>Hs</i> <i>Sc, Dm</i>	HMT sans domaine SET. La diméthylation de H3K79 dépend du cycle cellulaire. Elle décroît durant la phase S, atteignant son niveau le plus bas en phase G2, et augmente en mitose pour se maintenir à un niveau élevé durant la phase G1.	Feng <i>et al.</i> , 2002

Tableau 1 : Histones Méthyltransférases activatrices

Marque	Enzyme	Organisme	Fonctions	Référence
H3K9	SUV39h1, G9a, GLP, et SETDB1	<i>Hs, Dm, Sc</i>	La monométhylation de H3K9 est associée aux promoteurs actifs; les di- et tri-méthylations de H3K9 sont liées à la répression transcriptionnelle.	Fritsch <i>et al.</i> , 2010 Barski <i>et al.</i> , 2007 Wang <i>et al.</i> , 2008 Collins <i>et al.</i> , 2010
H4K20	SUV420H2		Interagit avec HP1 et contribue à la formation de l'hétérochromatine. Le statut de méthylation de H4K20 (mono- ou di-) a un impact sur le comportement du chromosome durant la mitose et dans la cytokinèse.	Souza <i>et al.</i> , 2009 Julien <i>et al.</i> , 2004
H3K27	E(Z)	<i>Dm</i>	me1: Marque plus abondante sur les promoteurs actifs que sur les promoteurs des gènes réprimés. me2/3: Complexe PRC2, rôle dans la répression transcriptionnelle	Wang <i>et al.</i> , 2008 Barski A <i>et al.</i> , 2007

Tableau 2 : Histones Méthyltransférases répressives

2.2.5. Les polyADP ribosylases

La polyADP ribosylation est l'ajout d'une chaîne d'ADP ribose à certaines lysines de la queue N-terminale des histones. Chez les mammifères, PARP1 (*PolyADP Ribose Protein 1*) aurait pour cible les lysines K13 de H2A, K30 de H2B, K27 et K37 de H3, et K16 de H4. PARP1 poly ADP-ribosyle également l'histone H1 en contexte de réparation des lésions de l'ADN (Kreimeyer, 1984). L'acétylation de H4K16 inhibe sa poly ADP-ribosylation par PARP1 (Messner *et al.*, 2010). L'enzyme PARP1 est associée sous sa forme inactive au promoteur de certains gènes, comme *hsp70* chez la drosophile. Lors d'un choc thermique, HSF (*Heat Shock Factor*), fixé sur le promoteur d'*hsp70*, est activé ce qui permet l'acétylation de H2AK5 par dTip60. Cette acétylation active PARP1 qui poly ADP-ribosyle la chromatine, entraînant une restructuration et la transcription rapide du gène (Petesch et Lis, 2011)

2.2.6. Les ubiquitines-ligases

L'ubiquitination est la ligation d'un groupement ubiquitine (polypeptide constitué de 76 acides aminés) sur les résidus lysine. La mono-ubiquitination des histones est associée à la répression ou à l'activation de la transcription (alors que la poly-ubiquitination cible généralement les protéines pour leur dégradation par le protéasome). Chez la drosophile, le complexe Polycomb dRAF (*related dRing-associated factors*) contient une E3 ubiquitine ligase, dRING/PSC, qui mono-ubiquitine H2AK119 (Scheuermann *et al.*, 2010). dRING/PSC fait également partie du complexe PRC1 et lui confère son activité E3 ubiquitine ligase (Saurin *et al.*, 2001), (voir Tableau des complexes PcG, TrxG et de leurs recruteurs en Annexe 5).

2.3. Le code histone

Les modifications post-traductionnelles des histones permettent une communication entre la chromatine et l'environnement nucléaire; selon les marques apposées, la chromatine se condense, prenant une structure non permissive pour la transcription, ou au contraire, se relâche, facilitant la transcription.

L'hypothèse du code histone, proposé par Strahl et Allis en 2000, établit un lien direct entre la combinatoire des différentes marques épigénétiques de certains résidus de la queue des histones et l'état transcriptionnel de la chromatine. Ce « code », en étant lu par d'autres protéines, permettrait le recrutement de protéines ou complexes protéiques agissant sur la structure de la chromatine. Par exemple, les lysines acétylées ou méthylées sont spécifiquement reconnues par certaines protéines grâce à des domaines de reconnaissance particuliers. De plus, le recrutement de certaines protéines sur la chromatine fait intervenir non seulement des histones modifiées, mais aussi d'autres protéines ou complexes protéiques. Le code histone est donc interprété dans un contexte intégré, dans lequel de nombreux facteurs interviennent.

2.3.1. Writers, Readers et Erasers

Les enzymes qui apposent les modifications, enzymes citées ci-dessus (histones méthyltransférases, histones acétylases *etc...*), sont appelées *Writers*. Le concept de code histone implique également l'existence de protéines qui interprètent ces modifications et servent de plateforme d'ancrage à d'autres protéines qui agiront à leur tour sur la chromatine, les *Readers*, et de protéines qui effacent ces modifications, les *Erasers*. La grande diversité de *Writers*, *Readers* et *Erasers* et leur spécificité augmentent la complexité du code.

Par exemple HP1 (*Heterochromatin Protein 1*) participe à l'initiation du processus d'hétérochromatinisation en reconnaissant la marque H3K9me2/3 (Schotta *et al.*, 2002). Chez l'homme, H4K20me3 et H3K9me3 sont enrichies dans l'hétérochromatine péricentromérique, alors que les formes diméthylées sont enrichies sur les bras chromosomiques. De plus, H3K9me1 et H4K20me1 définissent des régions distinctes de l'hétérochromatine chez les mammifères (Sims *et al.*, 2006).

Chez la drosophile, la protéine Enhancer of Zeste [E(Z), homologue de EZH1/2 chez les mammifères], qui fait partie du complexe PcG PRC2 (*Polycomb Repressive Complex 2*), triméthyle H3K27 et joue ainsi un rôle dans la répression transcriptionnelle. En effet, H3K27me3 est reconnue par Polycomb (PC), un composant du complexe PcG PRC1 (*Polycomb Repressive Complex 1*); cette interaction permet le recrutement de PRC1 et l'établissement de la répression (Cao *et al.*, 2002).

2.3.2. Histone crosstalk

La dynamique du code histone repose sur l'existence de nombreuses « conversations croisées » entre les histones (*Histone crosstalk*). Deux revues récentes décrivent ces interactions (Figures 7 et 8). Elles se déclinent en divers schémas :

(1) Plusieurs enzymes de modification ciblant le même site peuvent entrer en compétition. Ceci est particulièrement vrai pour les lysines qui peuvent être acétylées, méthylées ou ubiquitinylées. C'est le cas par exemple de H3K9ac et H3K9me3. Lorsque H3K9 est acétylée, l'affinité entre l'histone et l'ADN diminue et la chromatine devient permissive pour la transcription. Lorsque H3K9 est triméthylée au contraire, la protéine HP1 se fixe et participe avec d'autres interacteurs à l'hétérochromatinisation du locus et ainsi à sa répression.

(2) Une modification post-traductionnelle peut être dépendante d'une autre. Un exemple ce type de *trans*-régulation est observé chez la levure où la méthylation de H3K4 par COMPASS et celle de H3K79 par Dot1 sont totalement dépendantes de l'ubiquitination de H2BK123 par l'enzyme Rad6/Bre1 (Lee *et al.*, 2007). Chez l'homme, l'ubiquitination de l'histone H2BK120 est un prérequis pour la méthylation de H3K79 (Zhu *et al.*, 2005).

(3) La fixation d'une protéine sur une modification particulière peut être inhibée par une modification adjacente. Par exemple, la protéine HP1 se fixe à la marque H3K9me2/3, mais durant la mitose, la liaison est rompue à cause de la phosphorylation de la sérine 10 adjacente (Fischle *et al.*, 2005). Ce mécanisme, décrit comme « *phospho/méthyl switch* », permettrait la transcription des régions hétérochromatiques lors de la phase S et la production de petits ARN non-codants spécifiques de ces régions.

De même, lors d'un stress cellulaire, le recrutement du complexe PRC1 sur la marque H3K27me3 est inhibé par la phosphorylation de la sérine 28 voisine par la kinase MSK1/2 (Gehani *et al.*, 2010).

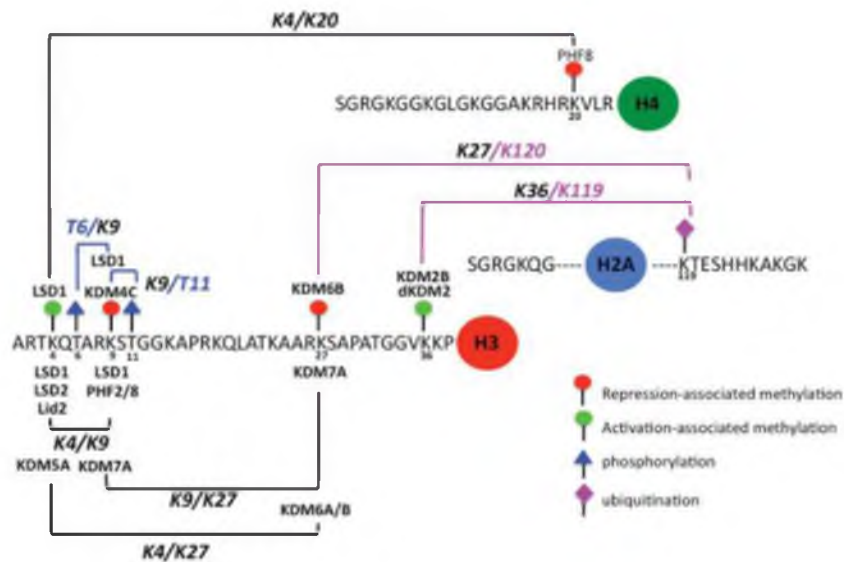


Figure 7 : Conversations croisées impliquant des lysines déméthylases.

Les lignes relient les modifications qui “conversent” (trait noir : méthylation/méthylation, trait bleu : méthylation/phosphorylation, trait violet : méthylation/ubiquitination). Les différentes lysines déméthylases impliquées sont mentionnées au-dessus ou au-dessous du résidu qu’elles déméthylent spécifiquement. Tiré de Verrier *et al.*, 2011.

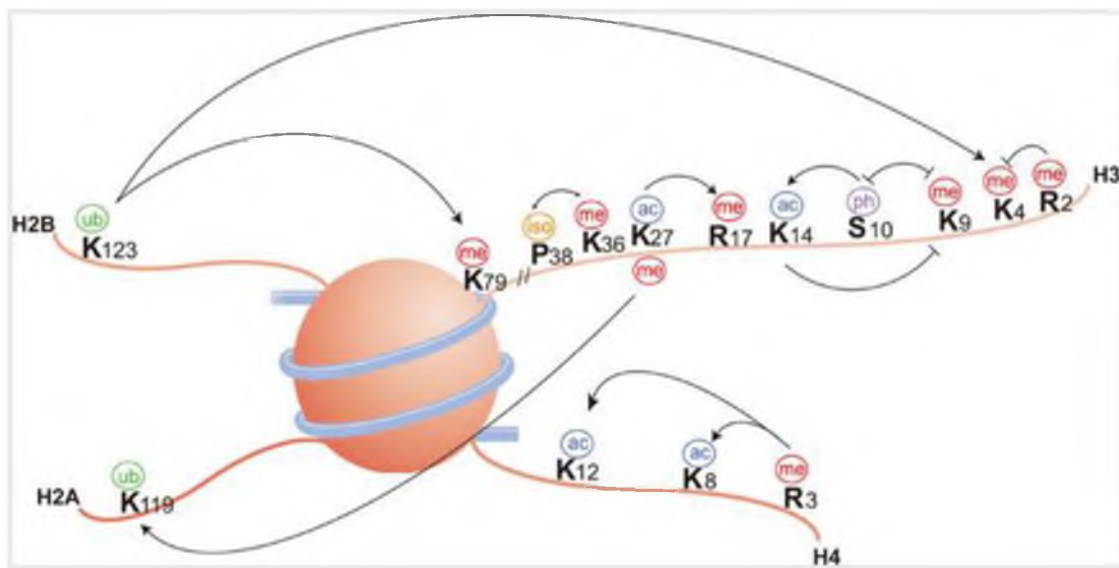


Figure 8 : Conversations croisées entre modifications d’histones.

Les modifications des histones peuvent affecter positivement ou négativement d’autres modifications. Un effet positif est indiqué par une flèche et un effet négatif est indiqué par un trait à tête plate. Tiré de Bannister et Kouzarides, 2011.

2.4. Les gommages épigénétiques ou *Erasers*

La dynamique et la spécificité du code histone sont dues non seulement à une régulation spatio-temporelle précise de son écriture, mais également à la possibilité d'effacer ces marques de façon spécifique.

2.4.1. Les phosphatases

Les phosphatases catalysent l'élimination d'un groupement phosphate. Les sérine/thréonine phosphatases sont des métallo-enzymes; leur site catalytique contient des ions Mn^{2+} , Fe^{2+} , ou Zn^{2+} . Chez les mammifères, la phosphatase PP1 (Protéine Phosphatase 1) agit de façon antagoniste à Aurora-B, une des kinases responsables des marques H3S10ph et de H3S28ph (Sugiyama *et al.*, 2002 ; Goto *et al.*, 2002) qui diminue la phosphorylation de H3S28ph jusqu'à un niveau indetectable juste avant l'entrée en mitose.

2.4.2. Les histones désacétylases (HDAC)

Chez les eucaryotes, le niveau d'acétylation est établi et maintenu par les HAT et les HDAC (Histone Désacétylases). Les HDAC contiennent un domaine catalytique « histone désacétylase » responsable de leur fonction. Elles sont le plus souvent associées à des complexes multimériques répresseurs. Elles ont été classées en 4 groupes en fonction de leur mécanisme d'action (Figure 9).

Chez la drosophile, comme chez la levure, l'HDAC la plus étudiée est Rpd3, elle est responsable de la désacétylation de plusieurs lysines de la queue des histones. Au contraire de l'acétylation, la désacétylation des histones est généralement liée à la répression de la transcription (Yang et Seto, 2008). Rpd3 fait partie des facteurs fréquemment associés au complexe PRC2 (De Rubertis *et al.*, 1996), ainsi qu'au complexe NURD (Murawsky *et al.*, 2001), voir Tableau des complexes PcG, TrxG et de leurs recruteurs en Annexe 5.

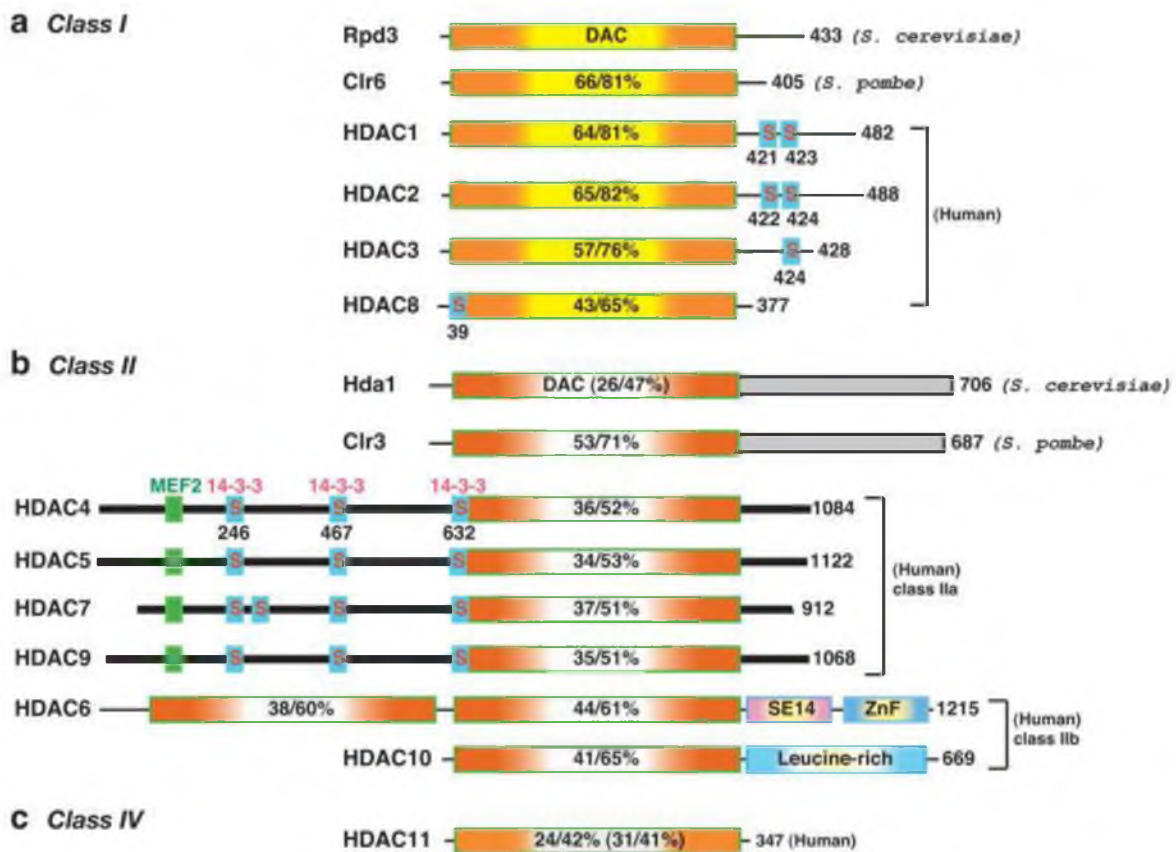


Figure 9 : Domaines d'organisation des HDAC de la levure à l'homme.

Les désacétylases sont groupées en fonction de leur similarité de séquence avec les HDAC de levure. Chez les mammifères, les HDAC de classe I (Rpd3-like) incluent HDAC1, 2, 3 et 8; les HDAC de classe II sont HDAC4, 5, 6, 7, 9 et 10 (similaires à Hda1); et les HDAC de classe IV ne sont représentées que par HDAC11. Beaucoup de HDAC ont des isoformes résultant de l'épissage alternatif (le nombre en C-ter représente le nombre d'acides aminés de l'isoforme la plus longue). Le domaine désacétylase (DAC) est représenté par un rectangle orange, avec au centre le pourcentage d'identité par rapport à l'enzyme de référence de la levure (*i.e.* Rpd3 pour la classe I ou Hda1 pour la classe II/IV). Les motifs de fixation à MEF-2 (Myocyte Enhancer Factor 2) sont représentés par les carrés verts, alors que les motifs de fixation 14-3-3 (décrits plus tard dans le manuscrit) sont représentés par des carrés bleus avec la lettre S pour sérine. Le motif SE14 est une répétition de 14 Ser-Glu; ZnF représente un motif zinc finger qui fixe les régions ubiquitinées. Tiré de Yang et Seto, 2008.

Les HDAC ont de très nombreuses cibles. Je ne citerai ici que quelques exemples. Chez l'homme, HDAC3 déacétyle H3K4ac spécifiquement sur les centromères, permettant la cohésion des chromatides sœurs lors de la méiose (Eot-Houllier *et al.*, 2008). Dans les lignées MCF10A et rat12 humaines, HDAC3 et CBP/p300, sont recrutées sur le promoteur de *c-Myc* où elles entraînent la déacétylation et la répression du gène (Sankar *et al.*, 2008). Chez l'homme, SIRT1 est impliquée dans la formation de l'hétérochromatine facultative en déacétylant H3K9Ac et H4K16Ac (Vaquero *et al.*, 2004). SIRT1, en collaboration avec la méthylase SUV39H1, entraîne la répression du locus des *ADNr* en réponse au niveau d'énergie intra-cellulaire (ratio AMP/ATP), jouant ainsi un rôle crucial dans l'homéostasie cellulaire (Murayama *et al.*, 2008).

2.4.3. Les histones déméthylases (HDMases)

La méthylation des histones a des conséquences importantes sur la régulation des gènes et est soumise à une régulation très dynamique. Deux familles d'histones déméthylases (HDMases) éliminent les groupements méthyls des histones. Les lysines déméthylases 1 (KDM1, aussi connue sous le nom de LSD1) sont des Flavine Adénine Dinucléotide (FAD)-enzymes qui éliminent les mono- et di-méthylations. Les histones déméthylases *Jumonji C-terminal domain* (JmjC) éliminent tous les états de méthylation existants (Hou et Yu, 2010).

LSD1 déméthyle les mono et di-méthylations de H3K4 et H3K9 (Shi *et al.*, 2004 ; Metzger *et al.*, 2005). LSD1, qui fait partie du complexe REST (*REI-Silencing Transcription factor*), réprime les gènes cibles de ce complexe (Lee *et al.*, 2005). LSD1 peut également coopérer avec JMJD2C pour réaliser une déméthylation complète de H3K9me3 (Metzger *et al.*, 2005 ; Wissmann *et al.*, 2007).

2.4.4. La déribosylase PARG (polyADP-ribose glycohydrolase)

Elle catalyse la dégradation de la chaîne poly ADP-ribose sur toutes les histones. PARG agit de façon synchrone avec PARP pour coordonner la régulation des événements de réparation de l'ADN (Fisher *et al.*, 2007).

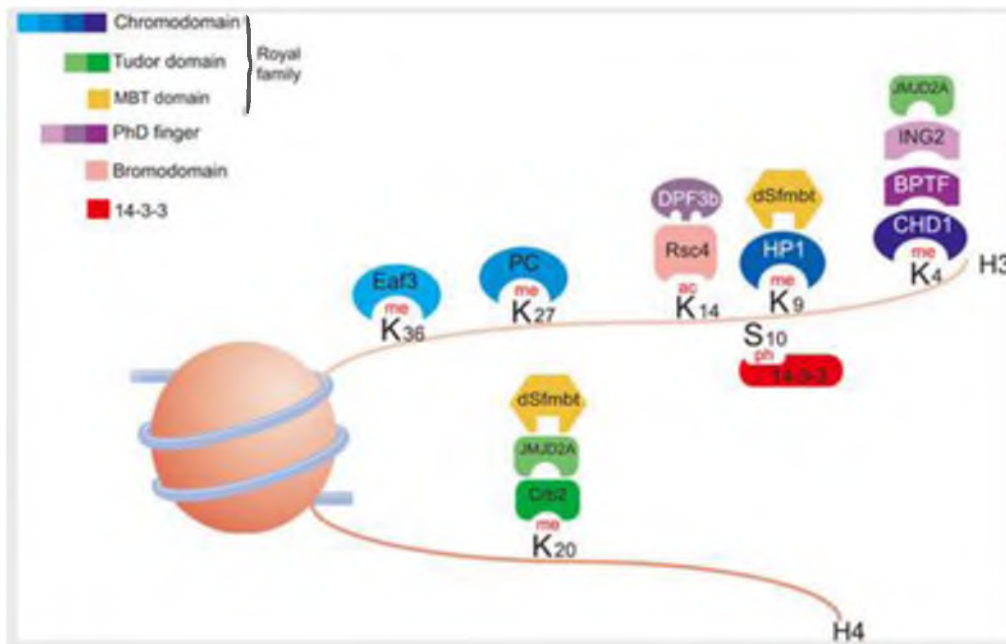


Figure 10 : Exemples de *Readers*.

Exemples de protéines dont les domaines fixent spécifiquement les histones modifiées. Les domaines spécifiques sont notés de différentes couleurs. Tiré de Bannister et Kouzarides, 2011

2.4.5. La déubiquitine MYSM1

Chez l'homme, MYSM1 (également appelée 2A-DUB), déubiquitine la lysine 119 de H2A. Elle facilite également l'exclusion de l'histone H1 et joue donc un rôle important dans la régulation de la transcription (Zhu *et al.*, 2007). Chez la drosophile, le complexe Polycomb PR-DUB est associé à la répression de l'expression des gènes. La déubiquitine du complexe, Calypso, est responsable de la déubiquitination de la lysine 119 de H2A (Scheuermann *et al.*, 2010).

2.5. Les lecteurs du code histone ou *Readers*

Les *Readers* du code histone se différencient des *Writers* par le fait qu'ils n'induisent aucune modification directe sur la chromatine, mais reconnaissent une marque épigénétique particulière et participent au recrutement d'autres protéines ou complexes protéiques sur la chromatine. Leur spécificité de reconnaissance est liée aux différents domaines spécialisés qu'ils contiennent (Figure 10).

2.5.1. Les domaines 14-3-3

Les protéines à domaine 14-3-3 reconnaissent les sérines phosphorylées. Elles forment une famille très conservée avec au moins deux isoformes exprimées chez la levure et jusqu'à 15 chez les plantes. La famille 14-3-3 comprend 7 orthologues chez les mammifères et deux chez la drosophile (pour revue, voir Winter *et al.*, 2008a).

Les protéines 14-3-3 reconnaissent H3S10p et H3S28p. La fixation à H3S10ph est stabilisée si la même queue d'histone est acétylée sur la lysine 9 ou la lysine 14. Ces associations semblent liées à l'activation de la transcription (Winter *et al.*, 2008b). Chez la drosophile, cette famille de protéines est impliquée dans le recrutement à la chromatine de composants des complexes d'élongation de la transcription comme ELP3 (*Elongator protein 3*) qui interagit avec 14-3-3 (Karam *et al.*, 2010), et qui possède elle-même une activité acétyltransférase facilitant la transcription.

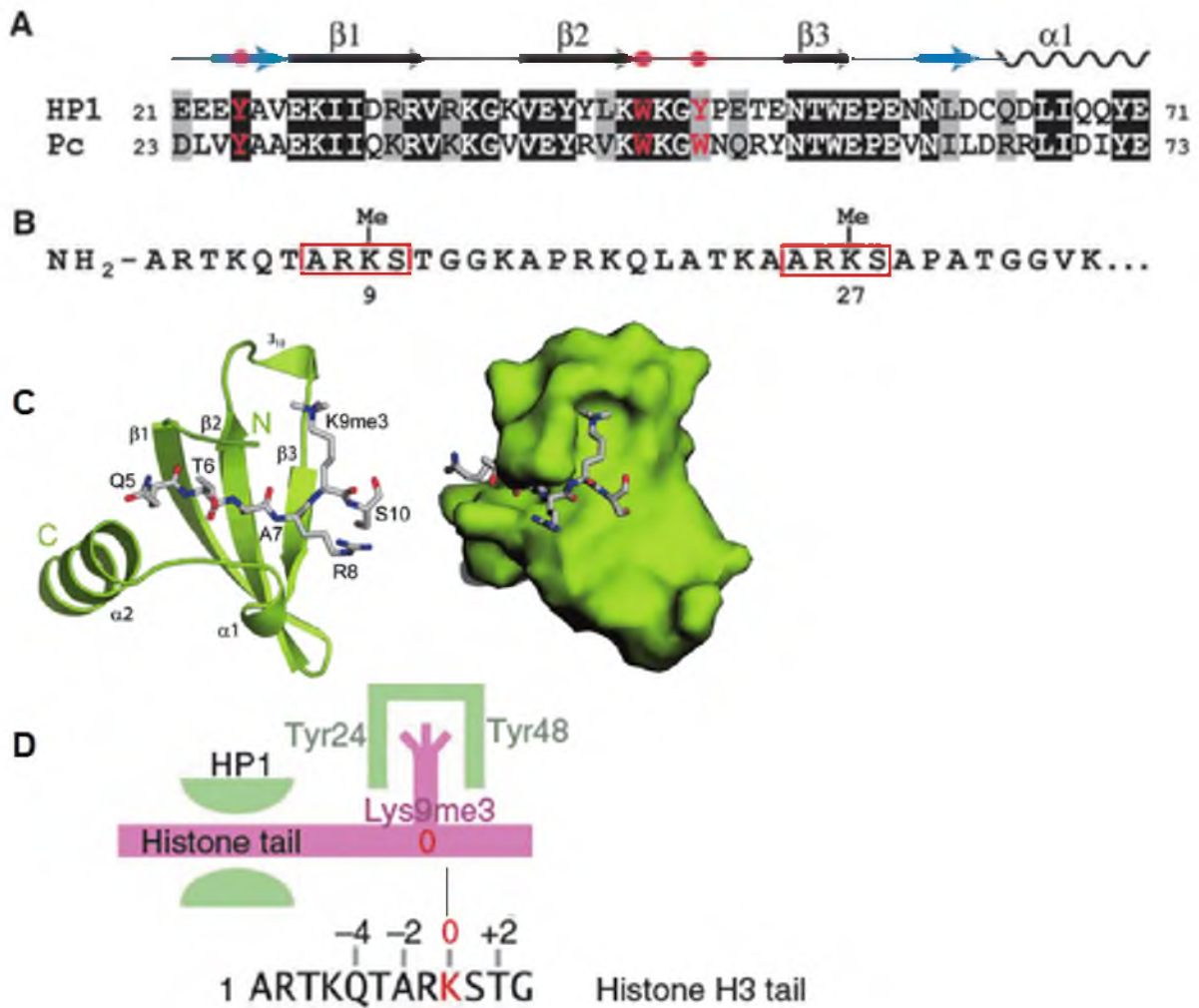


Figure 11: Chromodomain de HP1

A Alignement des séquences primaires des chromodomains de HP1 et PC. Les acides aminés aromatiques conservés sont écrits en rouge. Tiré de Fischle *et al.*, 2003.

B Séquence de la queue N-terminale de l'histone H3. La séquence entourant les lysines 9 et 27 méthylées sont similaires. Tiré de Fischle *et al.*, 2003.

C Représentation de la structure tridimensionnelle du chromodomaine de HP1 liant la lysine 9 triméthylée de l'histone H3. Tiré de Blus *et al.*, 2011.

D Schéma d'interaction entre la lysine 9 triméthylée de l'histone H3 et les acides aminés formant la cage aromatique du chromodomaine de HP1. Adapté de Holdermann *et al.*, 2012.

2.5.2. Les bromodomains

Les bromodomains tirent leur nom de la protéine du complexe TrxG Brahma (BRM) de la drosophile chez qui ils ont initialement été découverts (Tamkun *et al.*, 1992). Les bromodomains reconnaissent les lysines acétylées (Dhalluin *et al.*, 1999).

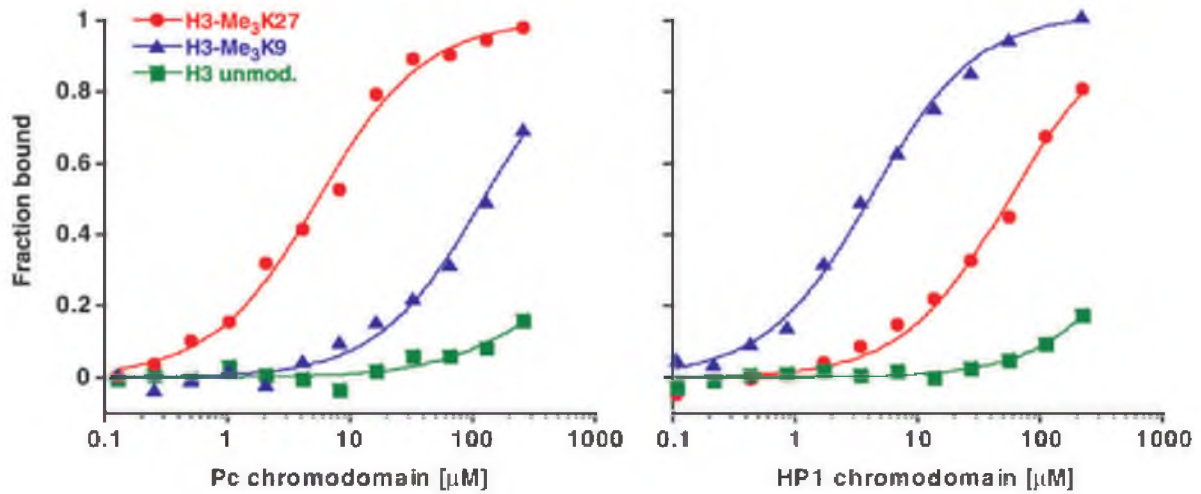
Plusieurs complexes chromatiniens contiennent des protéines à bromodomaine (Mujtaba *et al.*, 2007 et Annexe 1 et 3). Par exemple, le complexe RSC contient trois protéines présentant un bromodomaine (Rsc1, Rsc2 et Rsc4) (Cairns *et al.*, 1999), le complexe HAT SAGA contient deux protéines à bromodomaine (GCN5 et SPT7).

Chez l'homme, TAFII250, la plus grande sous-unité de TFIID, contient deux bromodomains en tandem qui fixent l'histone H4 acétylée (Jacobson *et al.*, 2000), permettant ainsi la liaison de TFIID aux promoteurs. Dans les cellules NIH/3T3, BRD4 reconnaît la marque épigénétique H4K5ac associée aux gènes activés *via* ses 2 bromodomains et marquerait ainsi les gènes transcrits durant la mitose (*Bookmarking*; voir « Exemples de processus épigénétiques »). Ceci permettrait de reprendre la transcription dès la sortie de la mitose dans les cellules filles et donc de maintenir la mémoire transcriptionnelle (Dey *et al.*, 2009).

Les bromodomains ne reconnaissent pas toujours les lysines acétylées de façon spécifique. L'affinité pour leurs cibles peut être accrue par l'environnement du site de liaison (pour revue, voir Zeng et Zhou, 2002). De plus, leur répétition en tandem, jusqu'à 6 bromodomains dans la protéine *polybromo* (PB), augmente leur affinité pour la cible (Charlop-Powers *et al.*, 2010).

2.5.3. Les chromodomains

Historiquement, les chromodomains ont été identifiés dans les protéines Polycomb (PC) et Hétérochromatine Protéine 1 (HP1) (Paro et Hogness, 1991 et Figure 11). L'acronyme « Chromo » pour *Chromatin organization modifier* a été proposé car ce domaine est un domaine d'adressage à la chromatine. En effet, des mutations dans le chromodomaine de PC ou d'HP1 abolissent la fixation de la protéine à la chromatine (Messmer *et al.*, 1992 ; Platero *et al.*, 1995).



	Me ₁ K9	Me ₂ K9	Me ₃ K9	Me ₁ K27	Me ₂ K27	Me ₃ K27
Pc	>1000	>1000	125 ± 28	20 ± 3	28 ± 4	5 ± 1
HP1	46 ± 9	7 ± 2	4 ± 1	n.d.	n.d.	64 ± 7

Figure 12: Affinité des chromodomaines de PC et HP1 pour leurs substrats respectifs.

Affinité du chromodomaine de PC (résidus 1 à 98) et de HP1 (résidus 17 à 76) pour différents peptides méthylés ou non. Les valeurs de Kd (en μM) sont présentées dans le tableau. *nb* : aucun des chromodomaines ne fixe les peptides non méthylés de l'histone H3. Adapté de Fischle *et al.*, 2003.

2.5.3.1. Structure des chromodomaines

Des comparaisons structurales ont placé les chromodomaines dans le groupe des protéines de la famille Royale, qui contient également les domaines Tudor, Agenet, PWWP et MBT (Maurer-Stroh *et al.*, 2003; Taverna *et al.*, 2007; Yap and Zhou, 2010). Ces différents domaines fixent les lysines méthylées avec une forte affinité (de l'ordre de 1 à 10 μ M) (Figure 12). Les chromodomaines canoniques sont formés de trois feuillets β anti-parallèles flanqués d'une hélice α du côté C-terminal (Ball *et al.*, 1997 et Figure 11A).

La structure des chromodomaines liés aux lysines méthylées a été résolue par cristallographie. La lysine 9 méthylée de l'histone H3 est imbriquée dans une région du chromodomaine de HP1 qui forme la « cage aromatique » (Figure 11D). Chez la drosophile, cette cage est formée par les tyrosines 24 et 48, et le tryptophane 45 (Hughes *et al.*, 2007). La lysine 27 triméthylée de l'histone H3 s'insère dans une cage formée par la tyrosine 26, et les tryptophanes 47 et 50 du chromodomaine de Polycomb. Les lysines 9 et 27 de l'histone H3 sont au centre d'une séquence conservée d'acides aminés : ARKS (Figure 11B). Cette séquence, flanquant la lysine triméthylée, serait également importante pour la liaison du chromodomaine, augmentant son affinité pour le ligand (Fischle *et al.*, 2003).

2.5.3.2. Classification des chromodomaines

Les protéines à chromodomaine sont classées en trois groupes en fonction de leur structure globale : (1) les protéines possédant un seul chromodomaine, comme PC; (2) les protéines possédant un chromodomaine en partie N-terminale et un domaine chromoshadow (domaine structurellement similaire au chromodomaine), comme HP1; (3) les protéines possédant deux chromodomaines en tandem, comme les protéines CHD (*Chromodomain Helicase DNA-binding domain*). Un troisième type de protéine fixant les lysines méthylées est le groupe des protéines à domaine *ChromoBarrel*. Leur structure tridimensionnelle diffère des chromodomaines : seuls deux des trois acides aminés formant la cage aromatique sont conservés (pour revue, voir Yap et Zhou, 2011). Des exemples de protéines à chromodomaine chez la drosophile sont regroupés dans le Tableau 3 (pour revue, voir Eisenberg, 2012).

Chromodomain protein (yeast and human orthologs)	Chromodomain type (a.a.)	Mutant phenotype	Chromodomain target
Chromodomain + chromo shadow domain SU(VAR)205/HP1a (<i>H. sapiens</i> = HP1 α /CBX5) HP1b (<i>S. pombe</i> = Swi6; <i>H. sapiens</i> = HP1 β /CBX1) HP1c (<i>S. pombe</i> = Chp2; HP1 γ /CBX3) RHINO (no ortholog in yeast or vertebrates) HP1e (no ortholog in yeast or human?)	Chromo (24-73) + chromo shadow (141-201) Chromo (4-53) + chromo shadow (97-154) Chromo (8-58) + chromo shadow (83-135) Chromo (24-74) + chromo shadow (360-415) Chromo (27-76) + chromo shadow (110-167)	Lethal ^a Female-sterile ^c	H3K9me2/3 ^b
Single chromodomain* POLYCOMB (no <i>S. pombe</i> ortholog; <i>H. sapiens</i> = CBX2, CBX4, CBX7 and CBX8) SU(VAR)3-9 (<i>S. pombe</i> = clr4; <i>H. sapiens</i> = Suv39a, b) HP6 (no orthologs in yeast or vertebrates) CG8289 (no orthologs in yeast or vertebrates) Chromator (no orthologs in yeast or vertebrates) CG18186 A16	Single chromo (26-75) Single chromo (219-268) Chromo shadow (22-79) Single chromo (233-282) Single chromo (221-272) Single chromo (23-86) Chromo shadow (301-360)	Lethal ^d Viable ^f Lethal ^g	H3K27me2/3 ^e
Tandem chromodomains CHD1 (<i>S. pombe</i> = hrp3; <i>H. sapiens</i> = CHD1, CHD2) CHD3 (<i>S. pombe</i> = mit1; <i>H. sapiens</i> = CHD5) MI-2 (<i>S. pombe</i> = mit1; <i>H. sapiens</i> = CHD3, CHD4) KISMET-L (no <i>S. pombe</i> ortholog; <i>H. sapiens</i> = CHD7)	Double chromo (318-414; 439-501) Double chromo (84-156; 179-240) Double chromo (490-557; 612-664) Tandem chromo (1879-1921; 1941-1993)	Sterile ^h Viable ⁱ Lethal ^k Lethal ^l	H3K4me ^d Does not bind methylated histone tails <i>in vitro</i> ^m
Chromo barrel domain MSL-3 (no <i>S. pombe</i> homolog; <i>H. sapiens</i> = MSL3) MOF (no <i>S. pombe</i> homolog; <i>H. sapiens</i> = MYST1) MRG15 (<i>S. pombe</i> = alp13; <i>H. sapiens</i> = MORF4L1) Tip60 (<i>S. pombe</i> = mst1; <i>H. sapiens</i> = KAT5) CG34422 (no <i>S. pombe</i> homolog; <i>H. sapiens</i> = ARID4A)	Single chromo (-90) Single chromo (376-434) Single chromo (22-75) Single chromo (38-89) Single chromo (535-585)	Male lethal ⁿ Male-lethal ^o Lethal ^r	H4K20me1 + DNA ^o ; H3K36me ^p roX1 and roX2 RNA ^r H3K36me3 ^q

Tableau 3 : Exemples de protéines à chromodomaine chez la drosophile

a Eissenberg *et al.*, 1992.; b Bannister *et al.*, 2001; Lachner *et al.*, 2001; Nielsen *et al.*, 2002; Jacobs and Khorasanizadeh, 2002.; c.Volpe *et al.*, 2001.; d Lewis, 1947; e.Min *et al.*, 2003.; f.Tschiersch *et al.*, 1994 ; g.Rath *et al.*, 2004; 2006.; h.Konev *et al.*, 2007; McDaniel *et al.* 2008.; i.Flanagan *et al.*, 2005; 2007.; j;Cooper *et al.*, 2010.;k.Kehle *et al.*, 1998 ; l.Daubresse *et al.*, 1999 ; m Srinivasan *et al.*, 2008 ; n.Uenoyama *et al.*, 1982 ; o.Kim *et al.*, 2010 ; p.Sural *et al.*, 2008 ; q.Hilfiker *et al.*, 1997 ; r.Akhtar *et al.*, 2000; Nielsen *et al.*, 2005 ; s.Zhang *et al.*, 2006a, 2006b ; t.Zhu *et al.*, 2007.

* Corto est également classée parmi les protéines à chromodomaine (Salvaing *et al.*, 2003), mais la faible similarité de séquence avec les autres chromodomains et l'absence d'analyse cristallographique le maintiennent hors de cette liste. Tiré de Eisenberg, 2012.

2.5.3.3. Fixation des acides nucléiques

Plusieurs protéines à chromodomaine fixent les acides nucléiques, ARN ou ADN, *via* leur chromodomaine. La chromo-acétyltransférase MOF (*Male absent On the First*) a été le premier exemple d'une protéine dont le chromodomaine se lie aux ARN (Akhtar *et al.*, 2000). Chez la drosophile, MOF fait partie du complexe ribonucléoprotéique MSL (*Male Specific Lethal*) requis pour la compensation de dose du chromosome X chez le mâle (pour revue, voir Rea *et al.*, 2007). Ce complexe cible de nombreux sites sur le chromosome X du mâle (appelés sites d'entrée) et se répand en *cis* à partir de ces sites. Il contient les deux ARN non codants *roX1* et *roX2*. MOF fixe *roX1* et *roX2* avec peu de spécificité de séquence, et dans le cas de *roX2*, l'interaction est dépendante du chromodomaine. L'adressage de MOF au chromosome dépend de sa liaison à ces ARN (Akhtar *et al.*, 2000). Par ailleurs, MOF ne semble pas interagir avec des histones modifiées.

Chez la drosophile, la protéine MSL3 porte un chromodomaine en N-terminal. Ce chromodomaine fixe la marque H3K36me3 (marque d'élongation de la transcription), tout comme les chromodomains des homologues de MSL3 chez la levure et l'homme (Eaf3 et MRG15, respectivement) (Joshi et Struhl, 2005; Zhang *et al.*, 2006a, 2006b; Sural *et al.*, 2008). *In vitro*, le chromodomaine de MSL3 fixe également l'ADN et H4K29me (Kim *et al.*, 2010).

Les chromodomains de la plupart des protéines Polycomb humaines (CBX2, CBX4, CBX6, CBX7 et CBX8) fixent les ARN *in vitro* sans spécificité de séquence (Bernstein *et al.*, 2006). En particulier, CBX7, l'un des homologues de Polycomb chez l'homme, est une sous-unité du complexe PRC1, elle fixe les ARN et H3K27me3 *in vitro* (Yap *et al.*, 2010).

Le chromodomaine de HP1 n'est pas clairement impliqué dans la fixation aux ARN. Il semblerait que ce soit la région charnière (*hinge region*), située entre le chromodomaine et le chromoshadow domaine, qui en soit responsable. Chez la souris, la localisation de HP1 α sur l'hétérochromatine péricentromérique (marquée par H3K9me2), dépend également des ARN (Maison *et al.*, 2002).

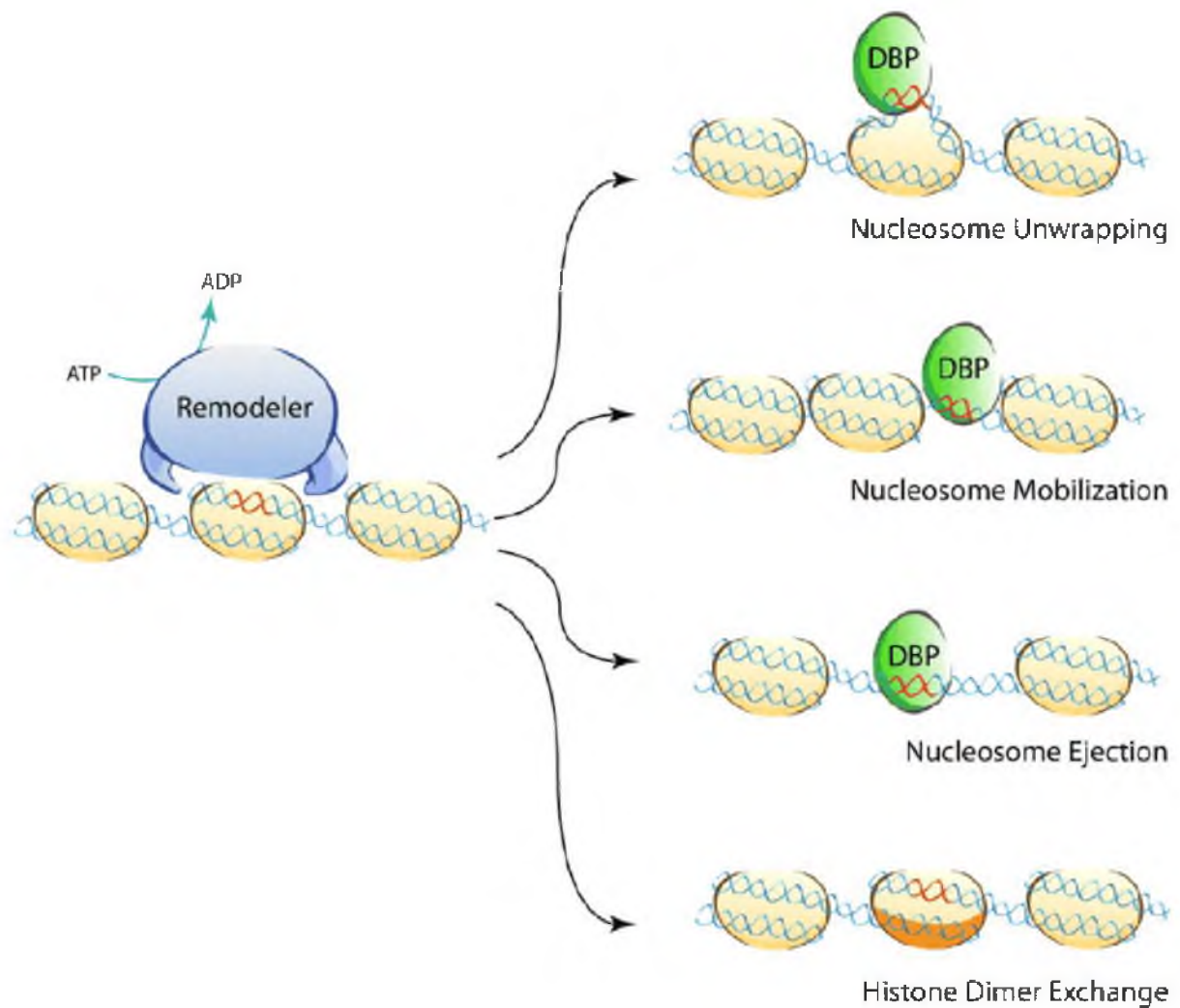


Figure 13 : Remodelage de la chromatine ATP-dépendant.

Après hydrolyse de l'ATP, une région protégée de la chromatine peut devenir permissive pour des complexes de fixation à l'ADN (DBP), comme les facteurs de transcription (en vert). Les nucléosomes peuvent être désassemblés, déplacés ou éjectés pour permettre ce processus. Dans certains cas, les complexes de remodelage ATP-dépendants introduisent des variants d'histones dans le nucléosome par un procédé appelé « dimer exchange ». Tiré de Tang *et al.*, 2010.

2.5.3.4. Adressage à la chromatine

Le chromodomaine est un module de fixation à la chromatine spécifique de son substrat méthylé. Par exemple, le chromodomaine de HP1 présente une forte affinité pour H3K9me3 (Bannister *et al.*, 2001 ; Lachner *et al.*, 2001). Une perte de la méthylation de H3K9 entraîne la délocalisation de HP1 chez la levure, la drosophile et dans les cellules de mammifères (Jacobs *et al.*, 2001 ; Lachner *et al.*, 2001 ; Nakayama *et al.*, 2001 ; Schotta *et al.*, 2004 ; Ebert *et al.*, 2004).

Chez la drosophile, la spécificité de liaison du chromodomaine (CD) de PC a été démontrée en remplaçant le chromodomaine de HP1 α par celui de PC, résultant en une protéine chimérique HP1/PC-CD qui est adressée aux sites euchromatiques de PC (Platero *et al.*, 1995). En reconnaissant les lysines triméthylées des queues N-terminales des histones, les chromodomaines permettent donc l'adressage de la protéine à la chromatine.

2.6. Les complexes de remodelage de la chromatine

La chromatine est une structure dynamique. On entend par remodelage de la chromatine le déplacement, voire l'éviction, des nucléosomes.

Une première famille de gènes impliqués dans le remodelage de la chromatine, *SWI/SNF*, a été découverte chez *Saccharomyces cerevisiae* lors de deux cribles génétiques indépendants dont le but était d'identifier des gènes impliqués dans le changement de type sexuel (*mating type*) et la fermentation du sucrose (*SWI* pour *mating type SWItch* et *SNF* pour *Sucrose Non-Fermenting*) (Laurent *et al.*, 1991 ; Peterson et Herskowitz, 1992). Ces gènes codent les protéines du complexe SWI/SNF. Plusieurs familles de complexes de remodelage ont depuis été identifiées principalement chez la levure, ISWI (pour *Imitation of SWItch*), CHD (pour Chromodomaine, Hélicase et DNA binding) et INO80 (pour *INOsitol requiring 80*) (pour revue, voir Clapier et Cairns, 2009). Les complexes de remodelage de la chromatine sont impliqués dans différents processus tels que le « désenroulement » de l'ADN autour des histones, le glissement des nucléosomes, l'éjection des nucléosomes et l'échange de dimères d'histones avec des dimères de leurs variants (par exemple H2A-H2B remplacé par H2A.Z-H2B) (Figure 13).

Ils ont pour propriété principale de modifier l'affinité entre l'ADN et les nucléosomes en utilisant de l'énergie (ATP). Ils contiennent (1) une ou plusieurs protéines reconnaissant certaines marques épigénétiques (*reader*) (par exemple, les complexes de la famille SWI/SNF comportent une protéine à bromodomaine qui reconnaît les lysines acétylées), (2) une ATPase ADN-dépendante qui mobilise l'ADN et élimine le contact entre l'ADN et les histones, (3) une sous-unité qui régule l'activité ATPase, (4) et plusieurs sous-unités qui interagissent avec d'autres facteurs de la chromatine (pour revue, voir Clapier et Cairns, 2009).

Chez la drosophile, le complexe TrxG Brahma (BRM, appelé BRG1 chez les mammifères), homologue du complexe SWI/SNF de la levure, contient l'ATPase BRM, qui reconnaît les lysines acétylées *via* son Bromodomaine. Les protéines Brahma, Osa, Moira, Zeste et SNR1 forment le cœur du complexe et sont associées à d'autres protéines appelées BAP (*Brahma Associated Protein*). Ce complexe faciliterait l'accès des séquences régulatrices aux facteurs de transcription généraux (Kal *et al.*, 2000). Il est requis pour l'initiation de la transcription de la plupart des gènes (Armstrong *et al.*, 2002).

Le complexe INO80, qui intervient dans la réparation de l'ADN; contient la protéine Pho (Pleiohomeotic) chez la drosophile, ou YY1 (Ying Yang 1) chez les mammifères (Morrisson et shen, 2009). La protéine Pho est également présente dans le complexe PcG PhoRC (Klymenko, *et al.*, 2006). Cette protéine cible le complexe dans lequel elle se trouve sur une séquence d'ADN *cis*-régulatrice spécifique et médie ainsi un remodelage local de la chromatine.

Les différentes familles de complexe de remodelage de la chromatine sont globalement très conservées de la levure à l'homme, bien qu'il y ait quelques variations dans leur composition (Voir Tableau en Annexe2, Clapier et Cairns, 2009).

2.7. Les complexes Polycomb et Trithorax.

Les protéines Polycomb et Trithorax forment respectivement les complexes PcG et TrxG qui s'associent à la chromatine et modulent sa structure. Ces complexes sont des acteurs importants du code histone dans la mesure où ils contiennent *Writers*, *Readers* ou même *Erasers* (voir Tableau en Annexe 5).

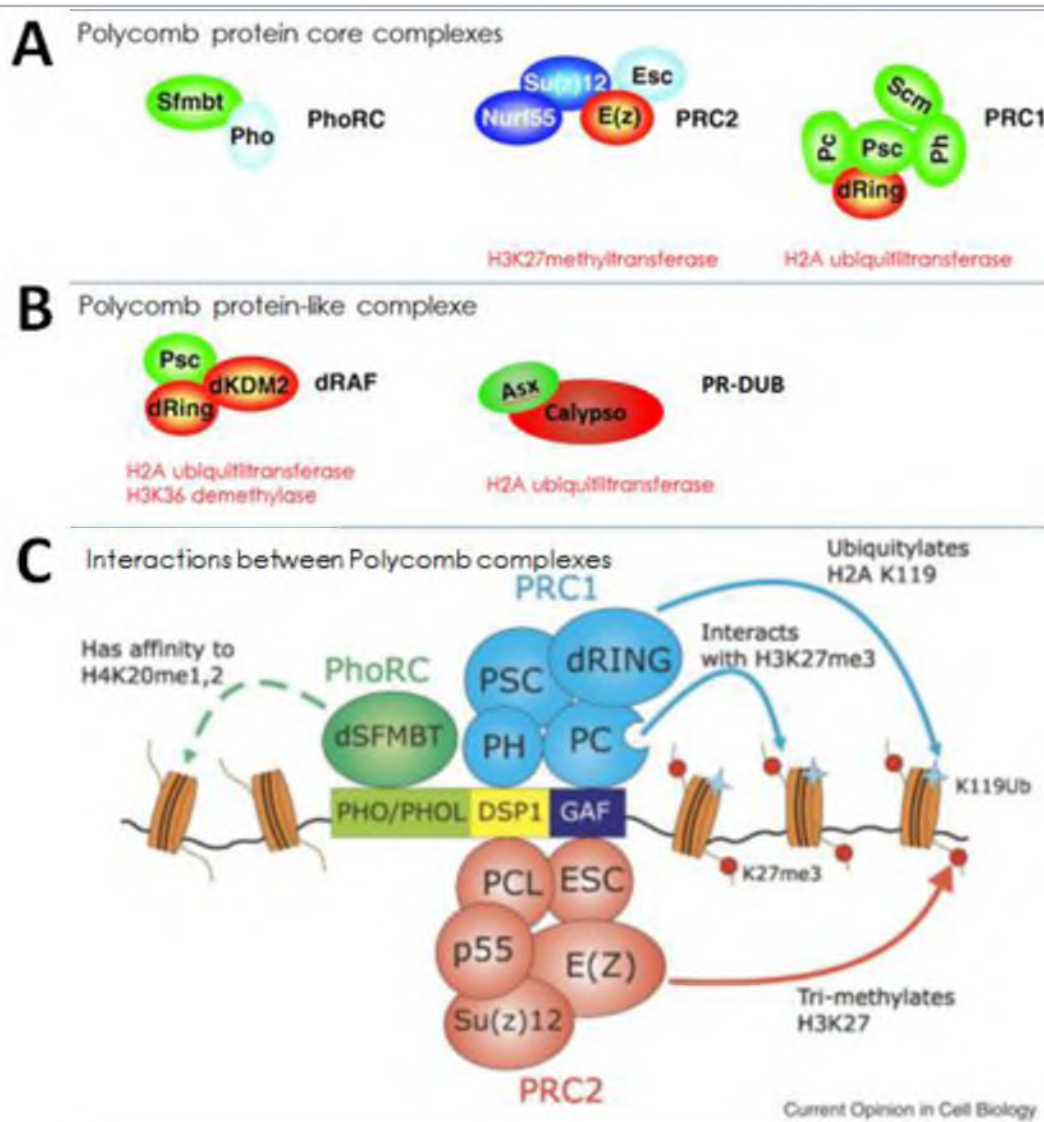


Figure 14 : Les différents complexes PcG et leurs interactions chez la drosophile.

A Protéines du cœur des complexes PhoRC, PRC2 et PRC1.

B Autres complexes PcG (Adapté de Schuettengruber et Cavalli, 2009).

C Interactions entre les complexes PRC1, PRC2 et PhoRC (tiré de Schwartz et Pirota, 2008).

2.7.1. Les complexes Polycomb (PcG)

Les gènes du groupe *Polycomb* ont initialement été décrits comme des régulateurs négatifs de l'expression des gènes homéotiques (Hox). Le gène *Polycomb*, membre fondateur du groupe, est unique chez la drosophile, alors qu'il existe 5 homologues chez les mammifères (*CBX2, 4, 6, 7 et 8*) (Tajul-Arifin *et al.*, 2003). Leurs mutations induisent des transformations des segments antérieurs en segments plus postérieurs chez la drosophile et chez les vertébrés (Akasaka *et al.*, 1996, Core *et al.*, 1997 ; del Mar Lorente *et al.*, 2000).

Les complexes PcG maintiennent la répression de leurs gènes cibles durant le développement (pour revue, voir Martinez et Cavalli, 2006). Les complexes Polycomb principaux (Figure 14A) sont PRC1 (*Polycomb Repressive Complex 1*, Francis *et al.*, 2001 ; Saurin *et al.*, 2001), PRC2 (*Polycomb Repressive Complex 2*, Ng *et al.*, 2000) et PhoRC (*Pho Repressive Complex* Klymenko, 2006). Chez la drosophile, le cœur du complexe PRC1 (PCC : *Polycomb core complex*) contient quatre protéines : Polycomb (PC) (*reader* qui reconnaît la marque H3K27me3 via son chromodomaine), Posterior Sex Combs (PSC), Polyhomeotic (PH), et dRING (*Writer* qui ubiquitine la lysine 119 de l'histone H2A). De nombreuses autres protéines co-purifient avec ce complexe (Francis *et al.*, 2001; Saurin *et al.*, 2001). Le complexe PRC2 comprend la méthyltransférase E(Z) (*Writer* qui appose la marque H3K27me3), Su(Z)12, et Extra sex combs (ESC), ou son paralogue, ESCL (Ng *et al.*, 2000). Le complexe PhoRC (Klymenko, 2006) contient la protéine de liaison à l'ADN Pho, homologue du facteur YY1 des mammifères, ainsi que la protéine dSfmbt, qui se lie à H3K9me1/2 et H4K20me1/2 (*reader*).

D'autres complexes Polycomb ont été purifiés plus récemment (Figure 14B). Le complexe PR-DUB (*Polycomb Repressive DeUBiquitinase*) contient la protéine Calypso (*eraser* qui déubiquitine la lysine 119 de l'histone H2A) et la protéine ASX (Scheuermann *et al.*, 2010). Le complexe dRAF (dRing-associated factors) comprend dRING, associée à la protéine PSC (co-activateur de dRING) et à la déméthylase dKDM2 (*eraser* qui déméthyle H3K36me2). *In vivo*, dKDM2 partage de nombreuses cibles transcriptionnelles avec Polycomb et contrebalance l'effet des méthyltransférases TRX et ASH1 (Lagarou *et al.*, 2008).

Les différents complexes PcG ont des fonctions complémentaires (Figure 14C). Ils maintiennent l'état réprimé de leurs gènes cibles. Bien que le cœur de ces complexes soit très conservé, la caractérisation des complexes PcG chez plusieurs organismes montre une très grande hétérogénéité des protéines secondaires associées. Ces résultats suggèrent qu'il n'existe pas de complexe PcG type et que ces derniers sont probablement beaucoup plus hétérogènes et dynamiques que cela n'a été décrit jusqu'à présent. Leur composition pourrait varier d'un type cellulaire à l'autre et au cours du développement.

2.7.2. Les complexes Trithorax (TrxG)

Le gène éponyme du groupe, *trithorax* (*trx*), a été isolé à partir d'un mutant spontané dans lequel certains des segments sont transformés en segments plus antérieurs (Ingham, 1983 et 1998), reflétant une perte de fonction de certains gènes homéotiques. Deux autres gènes, *ash1* et *ash2* (*absent, small or homeotic 1 et 2*), ont été isolés car leurs mutants présentaient des phénotypes semblables. Ces gènes forment le groupe trithorax (*trxG*). L'association de plusieurs mutations de gènes *trxG* augmente les phénotypes *trxG*. Par ailleurs, les mutations des gènes *trxG* suppriment les phénotypes des mutants PcG : ces deux familles de gènes sont antagonistes (Shearn, 1989 ; LaJeunesse et Shearn, 1995 ; Tripoulas *et al.*, 1996). Ainsi, d'autres gènes *trxG* ont été isolés pour leur qualité de supprimeurs de mutations des gènes PcG (Kennison et Tamkun, 1988).

Les protéines TrxG forment des complexes multimériques qui modifient les histones comme les complexes TRX ou TAC1, ASH1 et ASH2 (voir Tableau en Annexe 5), ou remodelent la chromatine comme le complexe BRM (voir remodelage de la chromatine).

Chez la drosophile, le complexe TAC1 (*Trithorax Acetylation Complex 1*) contient les protéines TRX (homologue MLL chez l'homme) (*Writer qui méthyle la lysine 4 de l'histone H3*), dCBP, également appelée Nejire (*Writer qui acétyle H3K18 et H3K27*) et Sbf1 (SET domain binding factor 1 qui stabilise la fixation du complexe à la chromatine) (Petruk *et al.*, 2001). La composition des complexes MLL chez les mammifères est différente de celle des complexes TRX chez la drosophile.

Le complexe ASH1 empêche l'action des complexes PcG en maintenant une conformation permissive de la chromatine. La protéine ASH1 (*Writer qui triméthyle H3K4, et H3K36*) et la protéine dCBP ou Nejire forment le complexe ASH1 (Papoulas *et al.*, 1998 ; Bantignies *et al.*, 2000). Chez la drosophile comme chez l'homme, le complexe ASH2 comprend la protéine ASH2 (*Writer qui triméthyle H3K4*) et d'autres protéines dont Sin3a (désacétylase) et HCF (Host Cell Factor) (Papoulas *et al.*, 1998 ; Beltran *et al.*, 2007). La protéine ASH2 est également trouvée dans d'autres complexes, associée à TRX, TRR (Trithorax-related) et SET1 (pour revue, voir Schuettengruber *et al.*, 2011).

2.7.3. Les éléments de maintien de la mémoire épigénétique

Chez la drosophile, les complexes TrxG se fixent à des séquences d'ADN appelées TRE (*Trithorax Response Elements*). Ces éléments coïncident en grande partie avec des PRE (*Polycomb Response Elements*) et sont ainsi appelés PRE/TRE (*Polycomb or Trithorax Response Elements*) (Bloyer *et al.*, 2003). Fonctionnellement, les PRE étant indissociables des TRE, il a été proposé de renommer les PRE/TRE *Maintenance Elements* (ME), et de façon générique, les protéines PcG et TrxG qui s'y fixent Maintenance Proteins (MP) (Brock et Fischer, 2005). Différentes protéines de liaison à l'ADN comme par exemple DSP1 (*Dorsal Switch Protein 1*), GAF (*GAGA Associated Factor*), Pho et Zeste se fixent sur les ME et sont impliquées dans le recrutement des complexes PcG et TrxG. Les ME sont situés dans les régions *cis*-régulatrices de leurs gènes cibles, et parfois localisés à plusieurs centaines de kb des promoteurs. Les différents ME identifiés n'ont pas de similarité de séquence mais ils sont enrichis en séquences de fixation de DSP1, GAF, Pho, PhoL (Pleiohomeotic-like), Zeste, GRH (GrainyHead) et PSQ (PipSQueak) (Ringrose et Paro, 2007; pour revue, voir Grimaud *et al.*, 2006, Beck *et al.* 2010).

Les PRE/TRE n'ont été que rarement identifiés chez les mammifères (Sing *et al.*, 2009), chez lesquels il semble que les îlots CpG jouent un rôle dans le recrutement des complexes PcG et TrxG. En effet, les îlots CpG non méthylés seraient reconnus par les protéines MLL, et au contraire, les îlots CpG méthylés serviraient de plateforme de recrutement des complexes PcG (Mendenhall *et al.*, 2010).

PcG complexes		trxG complexes	
PRC1	PC PH PSC dRING SCM	TAC1	TRX dCBP SBF1
PRC2	E(Z) ESC Su(Z)12 NURF-55	ASH1	ASH1 dCBP ...
		ASH2	ASH2 ...
PHO/PHOL Pipsqueak Grainyhead	DNA-binding PcG/trxG recruiters		Zeste GAF
PcG/trxG cofactors			
Asx E(Pc) Su(Z)2 Corto Lola/Batman PCL Domino dMi2	ACF ISWI ACF	BRM BRM MOIRA OSA SNR1	Kismet Tonalli Skuld Kohtalo NURF NURF-301 ISWI NURF-55 NURF-38

Figure 15 : Nouvelle classification des protéines impliquées dans les fonctions PcG et TrxG

Tiré de Grimaud *et al.*, 2006.

2.7.4. Les Enhancers de Trithorax et Polycomb ou ETP

Au cours d'un crible génétique visant à isoler des gènes dont les mutations aggravent (*enhancers*) ou suppriment (*suppressors*) les phénotypes d'une mutation perte de fonction du gène *trxG ash1*, Gildea et ses coll. ont mis en évidence une nouvelle classe de gènes se comportant génétiquement à la fois comme des gènes PcG et comme des gènes *trxG* (Gildea *et al.*, 2000). En effet, de manière inattendue, plusieurs gènes isolés dans ce crible et initialement classés parmi les gènes PcG aggravent le phénotype du mutant *ash1*. Ce sont les gènes *Asx* (*Additional sex combs*), *Scm* (*Sex combs on midleg*), *E(Pc)* (*Enhancer of Polycomb*), *Psc* (*Posterior sex combs*) et *Su(Z)2* (*Suppressor of Zeste 2*). Les auteurs de cette étude ont proposé d'appeler cette famille de gènes *Enhancers of Trithorax and Polycomb* ou ETP.

Les mutants des ETP présentent des phénotypes similaires à ceux des mutants PcG et *trxG*. D'autres gènes, préalablement définis comme PcG ou *trxG*, ont été reclassés parmi les ETP en se basant sur ces mêmes critères (Figure 15). C'est le cas de *pho* (Mohd-Sarip *et al.*, 2002), *GAF* (*GAGA Factor*, Horard *et al.*, 2000 ; Bejarano et Busturia, 2004), *dsp1* (Decoville *et al.*, 2001; Salvaing *et al.*, 2006), *CAF1/p55* (Anderson *et al.*, 2011), *dHSF* (Rodriguez-Jato *et al.*, 2011) et *corto* (Salvaing *et al.*, 2003).

3 La transcription

Le code histone et la conformation de la chromatine qui en découle jouent un rôle prépondérant dans la régulation de l'expression des gènes. En effet, la structure locale de la chromatine influence l'activité de la machinerie transcriptionnelle. Pour comprendre ces mécanismes, je décrirai ici la machinerie transcriptionnelle et son fonctionnement.

3.1. Les ARN polymérasés.

L'enzyme clé de la transcription est l'ARN polymérase. Dans les cellules eucaryotes, on dénombre trois types d'ARN polymérasés (ARN Pol).

L'ARN Pol I est composée de 8 à 14 sous-unités. Elle transcrit l'ADN codant les ARN ribosomiques (ARNr) à l'exception de l'ARNr 5S, transcrit par l'ARN polymérase III. La transcription de l'ADNr est confinée au nucléole, lieu de l'assemblage des pré-ribosomes, où plusieurs centaines de copies des gènes d'ADNr sont présentes. L'ARN Pol I produit un grand transcrit d'ARNr qui est ensuite clivé par des snARN en ARNr 18S, 5,8S et 28S (pour revue chez les mammifères, voir Russell J, 2005).

L'ARN Pol II est composée de 12 sous-unités formant le cœur d'un complexe holoenzymatique de 550 kDa. Elle catalyse la transcription des gènes codants (ARNm) ainsi que de nombreux gènes non codants (ARNnc) tels que des précurseurs de snARN et de micros ARN. L'ARN polymérase II de la levure comprend 12 sous-unités, nommées RPB1 à RPB12, de taille comprise entre 6 et 220 kDa.

Une particularité du complexe holoenzymatique de l'ARN pol II est le domaine C-terminal de la plus grande sous-unité : RPB1. Ce domaine, très conservé entre espèces et communément appelé CTD (*C-Terminal Domain*), est constitué de multiples répétitions (52 chez l'homme, 43 chez la drosophile, 26 chez la levure) d'un heptapeptide de séquence consensus YSPTSPS (Hampsey et Reinberg, 2003).

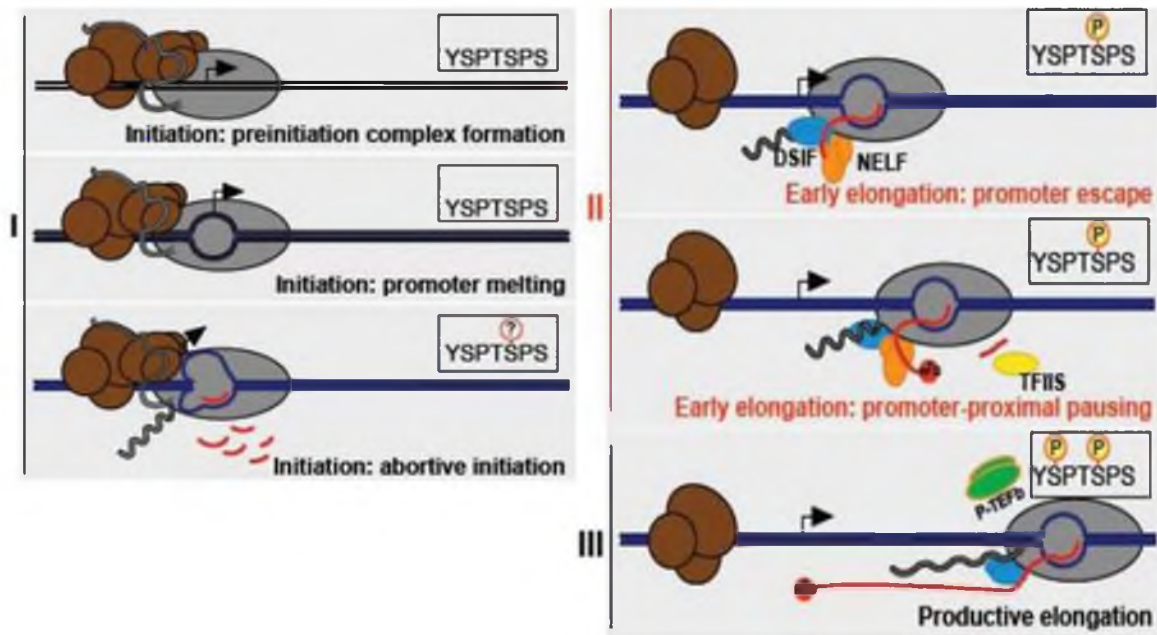


Figure. 16 : Etapes et facteurs impliqués dans la génération d'un complexe d'élongation productive

L'ARN pol II est représentée en gris, avec le domaine CTD saillant de la plus grosse sous-unité RPB1. L'ADN est indiqué en bleu foncé et l'ARN en rouge. Le statut de phosphorylation du CTD est représenté dans l'insert à droite.

I, TFIID se fixe sur la boîte TATA (environ 10nt avant le TSS) *via* TBP, créant un angle dans la double hélice d'ADN. Une boucle d'ADN s'enroule autour de l'ARN polymérase II et du domaine C-terminal de TFIIB. L'écart entre la boîte TATA et le TSS permet le positionnement favorable de l'ARN polymérase. Le domaine N-terminal de TFIIB place l'ADN dans une position adaptée pour entrer dans le site actif de l'ARN polymérase II. TFIIE rejoint le complexe et recrute TFIIH (complexe contenant, entre autres, le complexe CDK7 (*Cyclin Dependant Kinase 7*) / Cycline H et une ADN hélicase) qui crée une tension en surenroulant l'ADN. Cette tension ouvre la double hélice d'ADN et forme la bulle de transcription. TFIIF se fixe au brin transcrit de l'ADN simple brin ainsi formé et maintient la bulle ouverte. Le simple brin non transcrit de l'ADN peut ainsi entrer dans le site actif de l'ARN polymérase. Stabilisé par le complexe Médiateur, TFIIH phosphoryle les sérines 5 et 7 du CTD de la sous-unité RPB1 de l'ARN polymérase II (Buratowski, 2009), ce qui va permettre la transcription de 2 à 3 nucléotides. Cette structure est encore très instable et peut facilement avorter (Liu X, 2011). Lorsque le transcrit naissant atteint une taille de 7 nucléotides, ce qui correspond à la sortie du promoteur, sa taille provoque l'effondrement de la bulle de transcription (Pal *et al.*, 2005). Ce phénomène est appelé « promoter clearance » ou « promoter escape ». TFIID reste fixé au promoteur alors que TFIIB, E et H quittent le complexe PIC et TFIIF s'associe à la polymérase qui entre en élongation. (Zawel *et al.*, 1995).

II, P-TEFb est recruté durant l'élongation précoce et phosphoryle Spt5 (sous-unité de DSIF), ce qui libérerait NELF (facteur négatif de l'élongation).

III, P-TEFb induit le relargage des facteurs de pause en phosphorylant la sérine 2 du CTD et permet ainsi l'entrée en élongation productive.

Adapté de Nechaev and Adelman, 2011

Le CTD est une plateforme d'interactions protéiques et un substrat pour de nombreuses kinases. En effet, il peut être phosphorylé sur les sérines 2, 5 et 7 (RNAPIIS2p, -S5p, -S7p). Ces phosphorylations jouent un rôle majeur dans la régulation de l'activité de l'ARN polymérase II. L'analyse de la dynamique de la phosphorylation du CTD sur les gènes révèle un gradient de phosphorylation avec un ratio S5p/S2p élevé quand la polymérase est en 5' du gène et faible quand elle se trouve en 3' (Komarnitsky *et al.*, 2000). Les protéines impliquées dans des événements de transcription précoce, comme celles de la coiffe, fixent préférentiellement la S5p du CTD, alors que les protéines impliquées dans les événements tardifs de la transcription, comme la terminaison, fixent préférentiellement la S2p du CTD (Ahn *et al.*, 2004). Le rôle de la phosphorylation de la S7 n'est pas clairement établi, son profil suit généralement celui de la S5, mais sa mutation ne modifie la transcription que de quelques ARN non codants (Kim *et al.*, 2010). De plus, au sein des répétitions de l'heptapeptide composant le CTD, la S7 est l'acide aminé le moins conservé. Chez l'homme, elle est présente dans seulement 52% des heptapeptides (contre 83% et 100% pour S2 et S5 respectivement), et chez la drosophile, elle n'est présente que dans 23% des heptapeptides (contre 82% pour S2 et S5) (Chapman *et al.*, 2008).

D'autres facteurs généraux de la transcription font également partie du complexe holoenzymatique ARN Pol II, ce sont les TFIIX (TFIIA à TFIIH), chacun potentiellement composé de plusieurs protéines, par exemple, TFIID est composé des sous-unités TBP et de protéines TAF cibles spécifiques. Les complexes Mediator sont des complexes multi-protéiques de grande taille (de l'ordre du MDa) qui servent d'adaptateur entre les activateurs transcriptionnels et la machinerie transcriptionnelle (pour revue, voir Rachez et Freedman, 2001). Les protéines faisant partie du complexe Mediator, appelées SRB (*Suppressors of RNA polymerase B*), ont été caractérisées par Koleske et Young, en 1994 (pour revue, voir Myers et Young, 1998).

L'ARN Pol III transcrit les ARNr 5S, les ARN de transfert (ARNt) et d'autres petits ARN non codants dans tous les types cellulaires. Elle interagit avec beaucoup moins de protéines régulatrices que l'ARN Pol II. Cependant, il semble que les gènes d'ARNt ne soient pas tous exprimés de façon ubiquitaire, mais régulés de façon tissu-spécifique (pour revue, voir White, 2011). Ainsi, la régulation de l'ARN Pol III est fortement liée à la croissance et au cycle cellulaire.

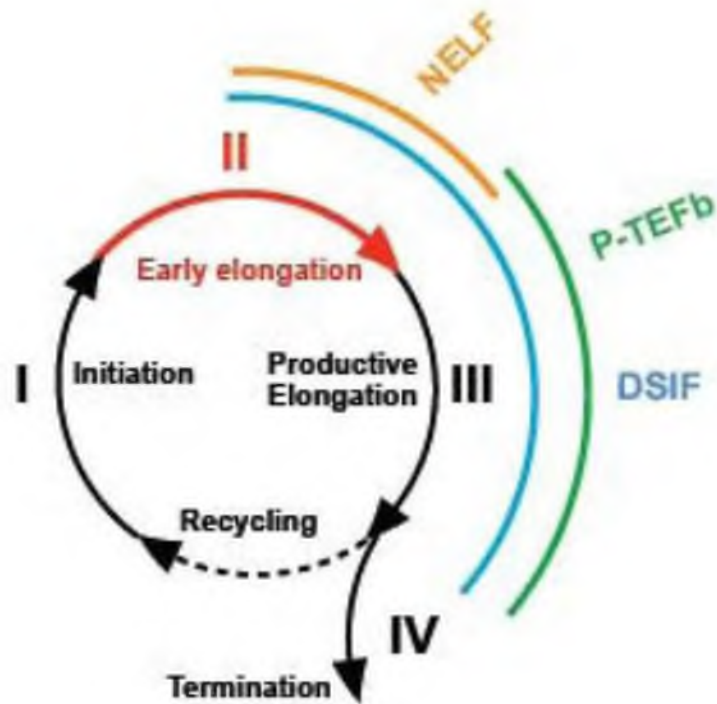


Figure. 17: Vue schématique du cycle de transcription de l'ARN polymérase II.

Les étapes « conventionnelles » du cycle sont montrées en noir, et l'élongation précoce en rouge. Les pointillés représentent la capacité de l'ARN polymérase à réinitier la transcription sur le même gène. Les facteurs impliqués dans la régulation de la transition entre l'élongation précoce et l'élongation productive sont montrés en couleur, avec des arcs indiquant les étapes auxquelles les dits facteurs sont associés avec le complexe Pol II. Adapté de Nechaev and Adelman, 2011

3.2. Le cycle de transcription

Le cycle de transcription de ces trois ARN polymérases comprend trois étapes : l'initiation, l'élongation, la terminaison. Au cours de l'initiation, le complexe de pré-initiation de la transcription (ou PIC) et différents facteurs de transcription sont mis en place de façon séquentielle sur le promoteur du gène. L'élongation correspond à la synthèse du transcrit. Enfin, la terminaison met fin à la production du transcrit et désassemble le complexe ARN Polymérase. L'initiation et l'élongation sont hautement régulées. Une phase de pause intervient très souvent juste après l'initiation. Les facteurs associés aux trois polymérases dans les différentes étapes de la transcription sont pour certains spécifiques et pour d'autres communs, néanmoins, le principe de la transcription étant globalement le même, je me baserai sur l'exemple de l'ARN polymérase II.

3.2.1. L'initiation

La transcription commence avec le recrutement et l'assemblage de l'ARN polymérase et de différents facteurs de transcription sur le promoteur du gène pour former le PIC. Le PIC minimal de l'ARN polymérase II est composé de la polymérase hypophosphorylée et des facteurs TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF et TFIIH. Le complexe TFIID s'assemble séquentiellement, il est lui-même composé de TBP (*TATA box Binding Protein*) et de 15 TAF différents (*TBP Associated Factors*). Cependant d'autres facteurs de transcription peuvent intervenir. Parmi eux, CTF/NF1 (CCAAT-binding transcription factor/NFIC nuclear factor I) se lie à la boîte CAAT (70 à 80 nt en amont du point de départ de la transcription ou TSS (*Transcriptional Start Site*), et Sp1 se lie aux boîtes GC : ce sont des trans-activateurs transcriptionnels. De plus, le complexe Mediator se fixe aux séquences *enhancers* et forme une boucle avec l'ADN polymérase non phosphorylée pour entrer en contact avec la boîte TATA *via* TBP (Buratowski, 2009).

En 2007, Kornberg a proposé un modèle d'assemblage séquentiel du PIC sur les promoteurs des gènes ayant une boîte TATA, ce modèle est résumé sur la Figure 16, I.

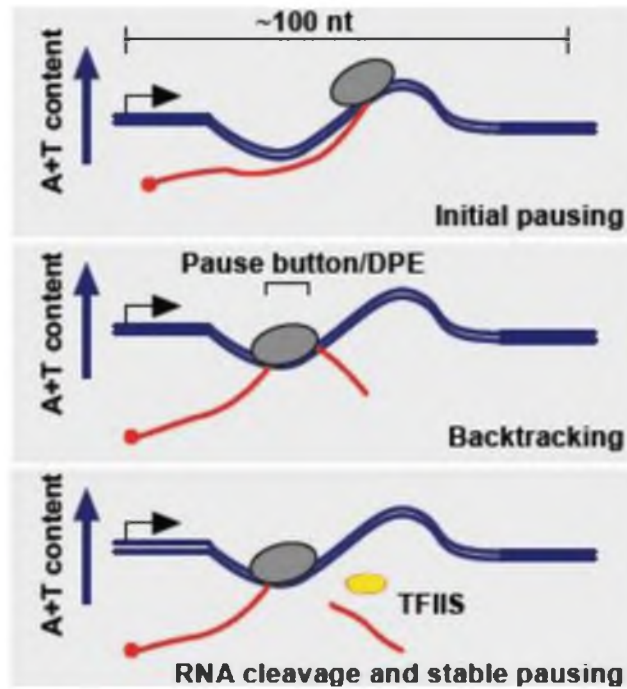


Figure 18 : Mécanisme de *Backtracking*.

Modèle d'un mécanisme de pause à proximité du promoteur en deux étapes. L'axe vertical représente le contenu en A-T. L'ARN synthétisé est en rouge. La transcription d'une région riche en A-T induit la pause (panneau du haut). L'ARN polymérase recule alors jusqu'à ce qu'elle rencontre une séquence riche en G-C qui contient le motif DPE (*downstream promoter element*) (panneau du milieu). Le facteur de transcription TFIIS (en jaune) intervient dans le clivage de l'extrémité 3' de l'ARN naissant (panneau du bas). Le clivage de l'ARN par TFIIS est nécessaire mais pas suffisant pour permettre la reprise d'une élongation productive. Adapté de Nechaev et Adelman, 2011.

3.2.2. L'élongation précoce

La transition entre l'initiation et l'entrée en élongation est accompagnée d'un échange très contrôlé de facteurs (Figure 16) qui est en partie orchestré par la phosphorylation du CTD de RPB1 (Figure 16, II).

L'élongation précoce est une étape lente et peu efficace. Le complexe d'élongation précoce montre une forte tendance à s'arrêter dans les 50 premières paires de bases après le TSS. P-TEFb (*Positive Transcriptional Elongating Factor b*), hétérodimère de la kinase Cdk9 (*Cyclin dependent kinase 9*) et de la Cycline T (Peng *et al.*, 1998), s'associe avec l'ARN polymérase II. Ceci n'est pas suffisant pour induire une élongation effective, l'effet positif de P-TEFb étant contrebalancé par des facteurs négatifs. Ces facteurs sont l'hétérodimère DSIF (*DRB Sensitivity Inducing Factor*), composé de SPT4 et SPT5, et le complexe négatif d'élongation NELF (*Negative Elongation Factor*). Les gènes de la famille *SPT* (*Suppressor of Ty*) ont été identifiés par un crible génétique qui visait à identifier des mutations restaurant l'expression de gènes éteints par l'insertion du rétrotransposon *Ty* chez *Saccharomyces cerevisiae* (Yamaguchi *et al.*, 2001). DSIF est nécessaire à l'association de NELF avec le complexe d'élongation précoce, et la présence de ces deux complexes inhibe l'élongation de la transcription (Renner *et al.*, 2001). La quantité et l'activité de P-TEFb sont contrôlées par sa séquestration dans un complexe inactif avec la protéine HEXIM et l'ARN non codant 7SK (Peterlin *et al.*, 2006).

P-TEFb peut être recruté directement par des activateurs de la transcription tels que NFkB et c-Myc (Barboric *et al.*, 2001 ; Rahl *et al.*, 2010), ou par la protéine à bromodomaine Brd4 (Ai *et al.*, 2011). Le recrutement de P-TEFb est un point crucial pour l'entrée en élongation productive car il induit le relargage des facteurs de pause. Par exemple, P-TEFb phosphoryle SPT5, ce qui libère NELF, et il phosphoryle la sérine 2 du CTD. Cette modification induit un changement conformationnel qui favorise les échanges de facteurs interagissant avec l'ARN polymérase II (Peterlin *et al.*, 2006).

L'ARN naissant est coiffé durant la phase d'élongation précoce. SPT5 active l'enzyme de *capping* (Wen *et al.*, 1999). En effet, quand le transcrit naissant atteint environ 20 nucléotides, son extrémité 5' est modifiée par l'addition d'un résidu 7-méthyl-guanosine appelé coiffe (Rasmussen et Lis, 1993).

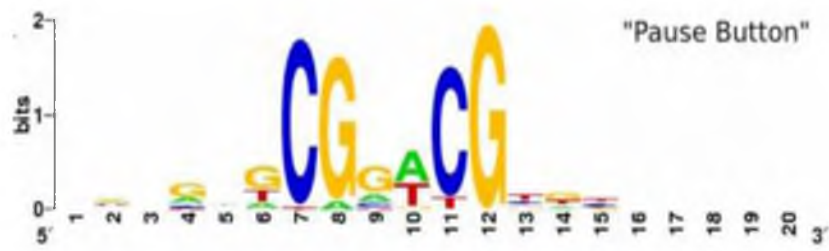


Figure 19: Pause button (PB)

Séquence consensus du motif *Pause Button* (PB), défini *in silico* à partir des gènes en pause. Adapté de Hendrix *et al.*, 2008.

Cette modification est critique pour la stabilité des ARN, leur prise en charge ultérieure, leur export hors du noyau et leur traduction en protéines.

3.2.3. La pause transcriptionnelle

Un promoteur en pause transcriptionnelle est fixé par l'ARN polymérase (dont le CTD est phosphorylé sur la sérine 5) entre 30 et 50 nucléotides après le TSS, est associé à un transcrit naissant coiffé, et présente au moins 10 fois plus de polymérase à proximité du promoteur que dans la moyenne du corps du gène. On parle aussi d'index de pause qui est le rapport entre la quantité de polymérase dans la région proximale du promoteur et la quantité de polymérase sur l'ensemble du gène (Zeitlinger *et al.*, 2007 ; Muse *et al.*, 2007).

En anglais la terminologie concernant la pause transcriptionnelle est plus précise, les différents états « *poised, backtraked, paused* » sont décrits ci-après. Ces différents états sont regroupés sous le terme générique de « *stalled* », qui se réfère à l'engagement d'un promoteur dans la transcription avec un blocage de l'élongation productive (Arndt and Kane, 2003).

On dispose de quantités croissantes d'informations sur la pause transcriptionnelle. En effet, les données de ChIPseq (*Chromatin Immunoprécipitation and sequencing*) montrent une sur-représentation de l'ARN polymérase, ainsi que de TFIID et de marques épigénétiques activatrices en position 5' de gènes qui ne produisent pas de transcrits de taille complète et subissent donc une transcription abortive (Kim TH, *et al.*, 2005). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer la présence d'ARN polymérase sur le promoteur :

(1) L'ARN polymérase s'associe et se dissocie de l'ADN de façon dynamique, de sorte que les données de ChIPseq représenteraient l'occupation moyenne (pour revue, voir Fuda *et al.*, 2009; Gilchrist *et al.*, 2009). En absence de données complémentaires de RNAseq, ces données reflètent la présence d'ARN polymérase II à proximité d'un promoteur mais n'établissent pas de relation avec le cycle transcriptionnel, on emploie en anglais le terme de « *poised* ».

(2) Plus précisément, il a été décrit que la polymérase se fixe à l'ADN et commence la transcription puis recule le long de l'ADN par un effet de « *backtracking* » jusqu'à une

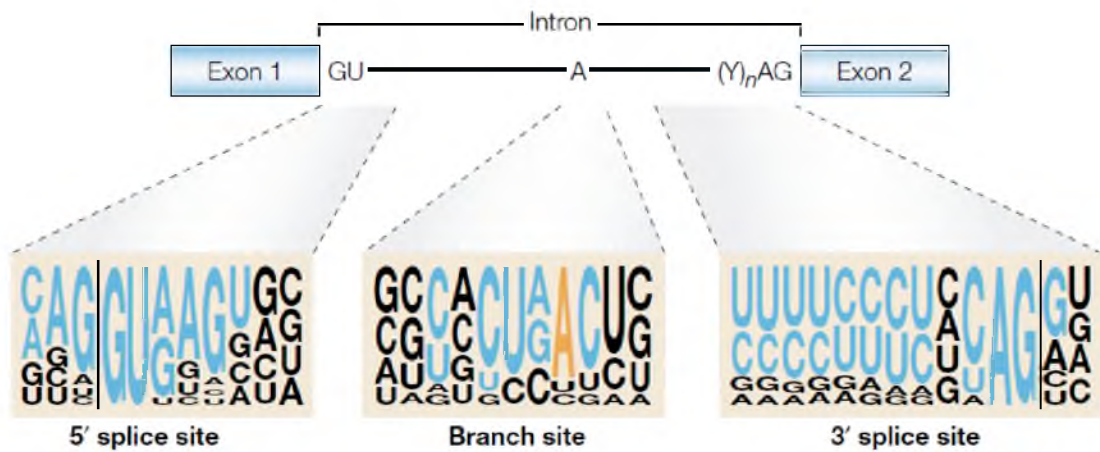


Figure 20 : Séquences consensus des sites donneur et accepteur de l'épissage alternatif.

Représentation d'un site d'épissage avec le site donneur en 5', le site de branchement au centre et le site accepteur en 3'. Adapté de Cartegni *et al.*, 2002.

séquence appelée DPE (*Downstream Promoter Element*) (Figure 18). Cette séquence de 7nt a été décrite en 1996 par Burke et Kadonaga chez la drosophile. Elle correspond à un site de fixation de TFIID environ 28nt après le TSS (Figure 19). On parle alors de polymérase "*backtracked*". Sans intervention de TFIIIS, qui clive le transcrit naissant en 3' de la polymérase, la structure (polymérase, ARN, ADN) est instable et la polymérase peut se dissocier. Plus récemment, des études de séquençage à haut débit ont mis en évidence une séquence, préférentiellement associée aux gènes en pause chez la drosophile, située 28 à 32 nt après le TSS. Elle a été nommée *pause button* et correspond à la séquence DPE initialement caractérisée par Burke et Kadonaga en 1996.

(3) Enfin, la polymérase peut être complètement engagée, liée de façon stable à l'ADN, stabilisée après avoir produit un transcrit naissant de 30 à 50 nucléotides, et en attente d'un stimulus pour repartir en élongation productive (Nechaev *et al.*, 2010). Ce type de pause, appelée « *paused* » en anglais, peut être également appelé pause constitutive. La pause constitutive permettrait l'induction rapide et efficace de la transcription des gènes. Longtemps considérée comme un type de régulation particulière des gènes de stress, comme les gènes de choc thermique, elle semble être un processus général au cours du développement, ainsi que des expériences de séquençage à haut débit des transcrits naissants (*GROseq : Global Run On sequencing*) l'ont montré (Core LJ *et al.*, 2008 ; Nechaev S *et al.*, 2010).

La première preuve de pause transcriptionnelle (*stalled*) a été donnée en 1986 par David Gilmour et John Lis chez la drosophile sur le gène de choc thermique *hsp70* avant choc thermique. L'ARN polymérase II est en pause constitutive en aval du promoteur de *hsp70*. Le choc thermique engendre une cascade d'événements responsables de l'activation de l'ARN polymérase qui entre en élongation productive et qui produit rapidement une grande quantité de transcrits du gène *hsp70* (Rougvie AE et Lis JT, 1988). D'autres gènes soumis à la pause transcriptionnelle, comme *c-Myc* chez l'homme et les gènes précoces d'HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), seraient également soumis à une pause constitutive plutôt qu'à un phénomène de *backtracking* (Krumm *et al.*, 1992 ; Kao *et al.*, 1987). Chez la drosophile, il a récemment été montré qu'environ un tiers des gènes serait soumis à une pause transcriptionnelle à proximité du promoteur.

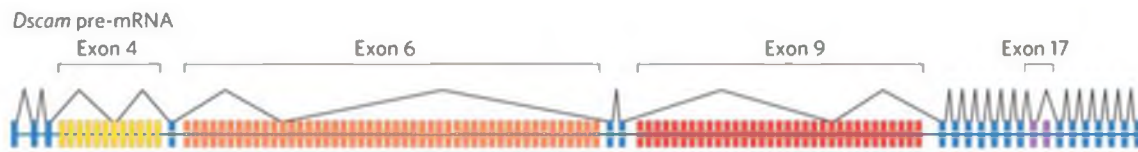


Figure 21 : exemple du pre-ARNm du gene *Dscam* chez *Drosophila melanogaster*

Dscam est représenté avec les exons constitutifs en bleu, et les exons alternatifs des groupes exons 4, 6, 9 et 17, en jaune, orange, rouge et violet, respectivement. Le patron d'épissage d'une des isoforms de l'ARNm est montré en exemple. Adapté de Nielsen et Graveley, 2010.

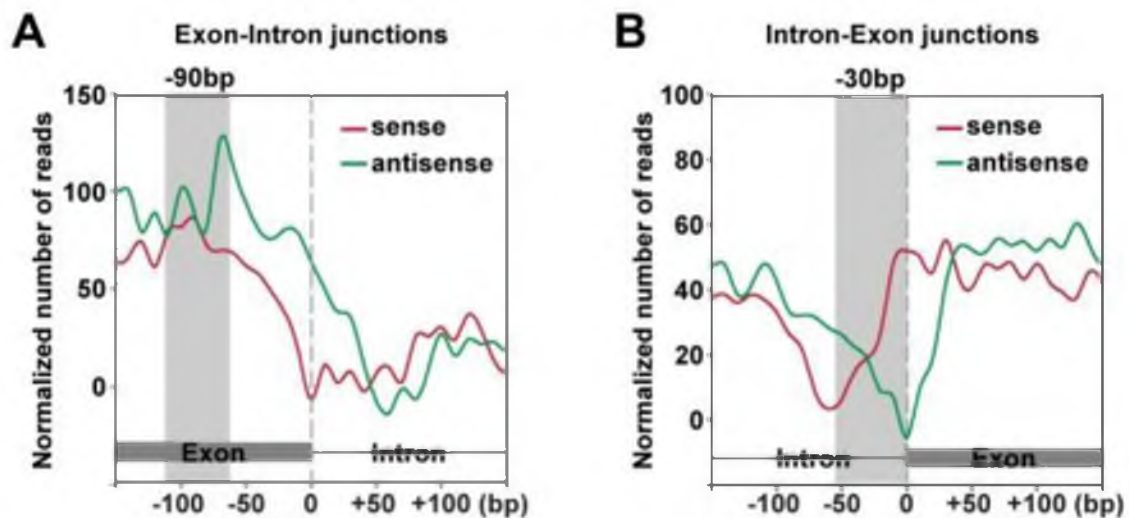


Figure 22 : Enrichissement de l'ARN polymérase II du côté de l'exon à la jonction exon-intron.

- A. La zone en gris montre la région enrichie en ARN polymérase II par CHIPseq chez la drosophile, centrée -90nt en amont de la jonction exon-intron.
- B. La zone en gris indique que l'ARN polymérase II est sous-représentée dans une région centrée -30nt en amont de la jonction intron-exon. Adapté de Yin *et al.*, 2011.

Ces gènes seraient impliqués dans le développement et la réponse à divers stimuli, suggérant que la pause de l'ARN polymérase durant l'élongation précoce jouerait un rôle important dans le contrôle rapide et précis de l'expression des gènes (Nechaev S, Adelman K, 2008).

3.2.4. L'épissage alternatif

L'élimination des introns du pré-ARNm et la ligation des exons constituent l'épissage. L'épissage est réalisé au cours de la transcription par le spliceosome, un complexe d'environ un mégadalton qui comprend 5 petits ARN nucléaires non codants (*snARN U1* à *U5*) assemblés de façon stable avec des protéines PRPF spécifiques (*pre-mRNA processing factor*), formant ainsi les *small nucleolar RiboNucleoProtein* ou snRNP (pour revue, voir Will *et al.*, 2011 ; Oesterreich *et al.*, 2011). A la jonction exon-intron, dans l'intron, se trouvent des séquences consensus servant à l'excision et au raboutage des exons par les complexes EJC (*Exon Junction Complex*). Ces sites sont conservés et sont appelés : site donneur d'épissage pour celui qui est situé en 5' de la liaison (consensus: AGGUA-AGU; représenté par l'extrémité, GU), et site accepteur d'épissage pour celui qui est situé en 3' de la liaison (consensus: (C)CAG/G; représenté par l'extrémité, AG) (Figure 20). A une trentaine de nucléotides en amont du site accepteur, le site de branchement du complexe snRNP est constitué par une adénine localisée dans une séquence riche en pyrimidines. Les nucléotides entourant les dinucléotides donneur (GU) et accepteur (AG) varient ; ceci crée des sites d'épissage forts (séquence consensus très conservée) ou des sites d'épissages faibles (séquence consensus peu conservée) et permet, le cas échéant, l'épissage alternatif (Cartegni *et al.*, 2002).

L'épissage alternatif est le processus par lequel plusieurs ARNm sont générés à partir d'un seul et même gène. On pense qu'au moins 70 % des quelques 30 000 gènes qui composent le génome humain peuvent subir un épissage alternatif et que, en moyenne, un gène donnerait naissance à 4 variants d'épissage. En combinant les possibilités d'épissage du génome humain, 100 000 protéines différentes pourraient être produites. Durant l'épissage alternatif, les exons sont soit conservés dans l'ARNm, soit ciblés en vue de leur élimination. Ceci produit, à partir d'un seul pré-ARNm, des ARNm variés composés de différents exons. Le cas le plus extrême décrit chez la drosophile est celui d'un gène d'un

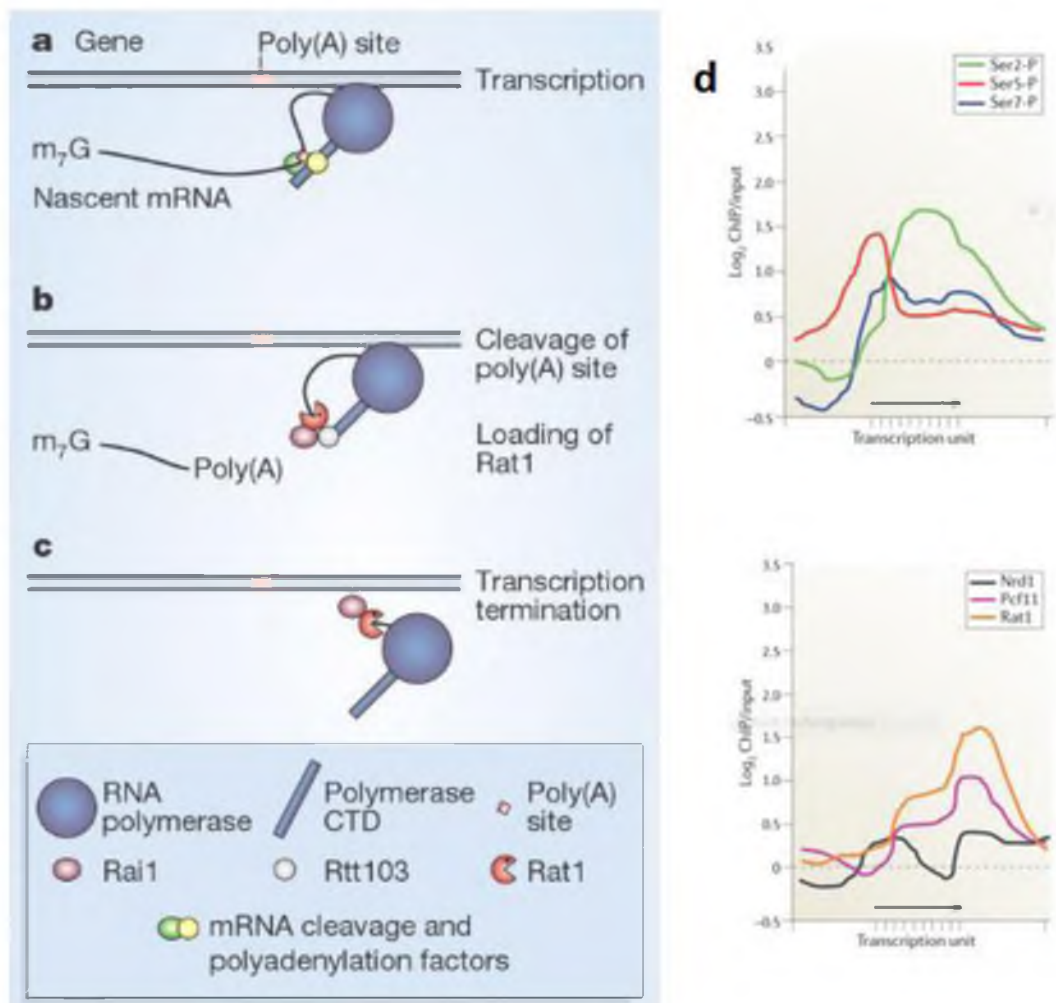


Figure 23 : Modèle torpedo et localisation de la phosphorylation du CTD de l'ARN polymérase II et de facteurs de terminaison

A (a,b,c) Modèle torpedo.

B En fin de production de l'ARNm, qui porte une coiffe (m7G) en 5' et une queue polyA en 3', la protéine Rtt103 fixe le CTD de la polymérase phosphorylée sur la sérine 2 et s'associe à l'exonucléase Rat1 (Xrn2 chez l'homme) et à son co-facteur Rai1. Après le clivage du site polyA, l'ARNm est libéré, Rat1 se fixe sur l'extrémité 5' du reliquat post-polyA de l'ARNm

C La partie libre de l'ARN est dégradée jusqu'à atteindre la polymérase (Kim H *et al.*, 2010).

Tiré de Tollervey, 2004 .

D Chez la levure, distribution moyenne de l'ARN polymérase II par ChIP-chip pour les longs ARNm codants et fortement exprimés (>2000nt, 128 gènes). Les unités de transcription du TSS au signal de polyA, ainsi que 1kb de séquences 3' et 5', sont indiqués par des flèches et divisés en 10 intervalles égaux. Adapté de Kuehner *et al.*, 2011.

récepteur impliqué dans le guidage axonal : *Dscam* (*Down Syndrome Cell Adhesion Molecule*) (Schmucker *et al.*, 2000). Il présente 95 exons alternatifs organisés en 4 groupes d'exons mutuellement exclusifs (un seul exon de chaque groupe est épissé par isoforme de l'ARNm) (Figure 21). Ces quatre groupes sont nommés exons 4, 6, 9 et 17, et contiennent respectivement 12, 48, 33 et 2 exons variables. En combinaison avec les 20 exons constitutifs de *Dscam*, cette structure permettrait la synthèse de 38 016 ARNm différents à partir d'un seul pré-ARNm. Chaque neurone présente une seule protéine *Dscam* à sa surface (Wojtowicz *et al.*, 2004).

La progression de la transcription n'est pas uniforme. Ainsi, des expériences de ChIPseq montrent que l'ARN polymérase n'est pas distribuée uniformément, elle apparaît concentrée dans les exons, avec un pic plus important centré 90 nt en amont de la jonction exon-intron (transcription ralentie) (Figure 22A). La quantité d'ARN polymérase détectée chute fortement lorsque la machinerie de transcription traverse un intron (transcription rapide). La région 30 nt en amont de la liaison intron-exon est dépourvue d'ARN polymérase, qui s'accumule du côté de l'exon (transcription ralentie) (Figure 22B) (Yin *et al.*, 2011). Ce profil de distribution de l'ARN polymérase suit la distribution des nucléosomes autour de la jonction exon-intron chez la drosophile (Schwartz *et al.*, 2009), impliquant une influence de la structure de la chromatine sur la vitesse d'élongation de la transcription. Ces données supportent l'idée qu'une densité plus grande en nucléosomes dans les exons ralentirait la transcription aux jonctions d'épissage et permettrait l'épissage de l'ARNm de façon co-transcriptionnelle. De plus, la vitesse d'élongation de l'ARN polymérase semble être cruciale pour l'épissage alternatif. Une diminution uniforme de la vitesse d'élongation favorise l'inclusion d'exons normalement faiblement représentés (contenant un site accepteur d'épissage faible) (Howe *et al.*, 2003). Chez l'homme, le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF est impliqué dans l'épissage *via* la sous-unité BRM qui interagit de façon co-transcriptionnelle avec des facteurs d'épissage et qui favorise l'inclusion d'exons alternatifs dans certains gènes (Batsche *et al.*, 2006). A l'inverse, une augmentation locale de la vitesse d'élongation défavorise leur inclusion (Hnilicova J *et al.*, 2011). L'épissage serait donc régulé de façon

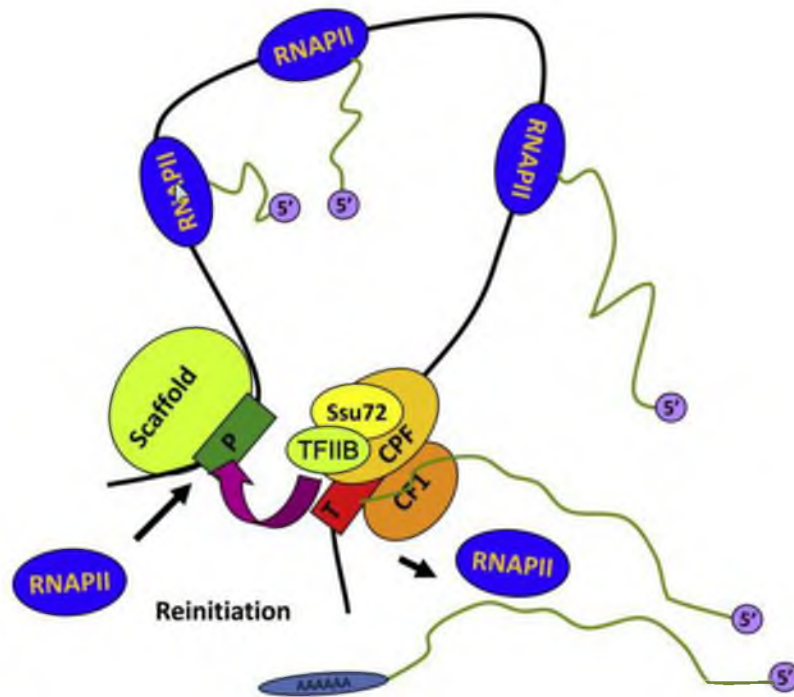


Figure 24 : Processus du *gene looping* .

Une boucle se forme entre le promoteur et le terminateur à la fin du premier cycle de transcription. La boucle est une structure labile, maintenue par l'interaction physique entre les composants des complexes d'initiation de la transcription (TFIIB) et les complexes de terminaison CPF (clivage and polyadenylation factor) et CF-1A (clivage factor 1A) respectivement *via* les sous-unités Ssu72 et Rna15.

L'ARN polymérase réaliserait ainsi plusieurs cycles de transcription sans se décrocher de l'ADN. Tiré de Hampsey *et al.*, 2011.

co-transcriptionnelle où facteurs d'épissages et complexes de remodelage de la chromatine seraient impliqués. (Allemand *et al.*, 2008).

3.2.4. La terminaison

La terminaison est la dernière étape du cycle de transcription. Elle correspond au clivage du transcrit puis à sa polyadénylation avec relargage de l'ARN polymérase II et son éventuel recyclage.

La polyadénylation est l'ajout d'adénines (jusqu'à 200) à l'extrémité 3' du transcrit primaire par la polyA-polymérase. Ce processus fait intervenir un certain nombre d'autres facteurs comme le complexe CPSF (*Cleavage/Polyadenylation Specificity Factor*) qui se fixe au signal AAUAA et clive l'ARNm à l'endroit où démarre la polyadénylation, soit 20 nucléotides en aval. Le signal de polyadénylation est une séquence en deux parties, constituée d'un hexamère AAUAAA situé 10 à 30 nt en amont du site de clivage et de polyadénylation, et d'une région riche en GU qui se trouve en aval de ce site (Colgan et Manley, 1997). Il est reconnu co-transcriptionnellement par des protéines du complexe de clivage et de polyadénylation (Guo *et al.*, 2011).

Deux modèles non exclusifs sont proposés pour la terminaison de la transcription. Dans le modèle « allostérique », le complexe d'élongation serait déstabilisé par l'interaction de facteurs tels que Pcf11 et Nrd1 qui fixent le CTD (Figure 23d) et l'ARN polymérase relarguerait le transcrit. Dans le modèle « torpedo », l'exonucléase Rat1 se fixe après clivage de l'ARN sur l'extrémité 5' du reliquat post-polyA de l'ARNm (Figure 23c) et dégrade la partie libre de l'ARN jusqu'à atteindre la polymérase (Kim H *et al.*, 2010).

Enfin, une boucle peut se former entre le promoteur et le site de terminaison *via* la protéine TFIIB qui permettrait le recyclage de l'ARN polymérase et de différents facteurs du complexe d'élongation. Ce phénomène est appelé *gene looping* (Figure 24) (pour revue, voir Kuehner *et al.*, 2011).

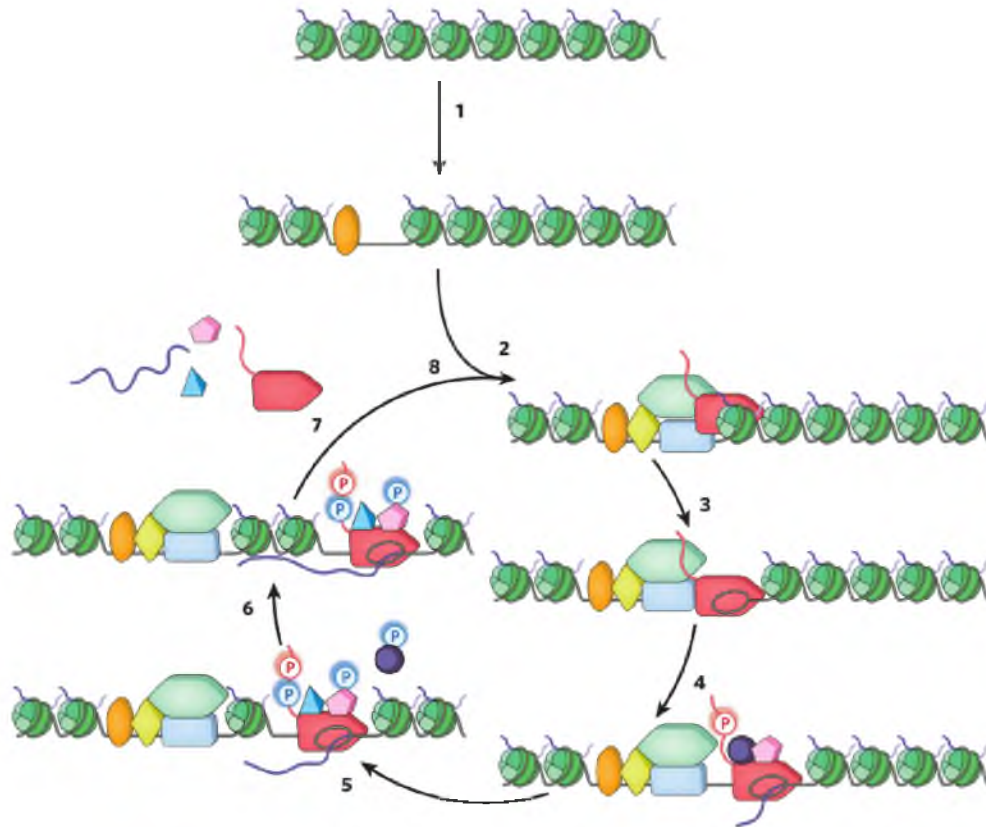


Figure 25 : Cycle de transcription dans un contexte chromatinien.

L'étape 1 débute à partir d'un gène qui n'était pas exprimé précédemment, la chromatine n'est pas permissive pour la transcription, il est donc nécessaire de « l'ouvrir », sachant que le locus est entièrement emballé en nucléosomes condensés (vert).

L'étape 2 correspond à la formation du PIC grâce à la fixation d'un premier activateur (orange) qui va fixer l'ADN et recruter des remodeleurs de nucléosomes pour libérer le promoteur. Un second activateur (losange jaune) fixe le promoteur, recrute les GTF (facteurs de transcription généraux, hexagone vert clair). Les étapes 3 à 5 ont été décrites précédemment (3 : initiation, 4 : échappement du promoteur, 5 : échappement de la pause). A l'étape 6, lors de l'élongation productive, les nucléosomes sont désassemblés puis réassemblés, au passage de l'ARN polymérase. Tiré de Fuda *et al.*, 2011.

3.3. Chromatine, organisation nucléaire et contrôle de la transcription

Ces étapes de la transcription sont intrinsèquement très régulées, et permettent un premier niveau de régulation de la transcription.

Cependant, comme nous l'avons vu précédemment, il existe un second niveau de régulation de la transcription, plus global, qui est intimement lié à la structure de la chromatine et au code histone. La chromatine a, en effet, un impact fort sur l'activité transcriptionnelle des gènes par le biais des modifications post-traductionnelles des histones dites "marques épigénétiques" qui induisent le recrutement d'autres facteurs directement impliqués soit dans la compaction de la chromatine, soit dans l'interaction avec la machinerie transcriptionnelle.

Enfin, un troisième niveau de régulation de la transcription, également lié à la conformation de la chromatine, est l'organisation de structures particulières dans le noyau.

3.3.1. Structure de la chromatine et régulation de la transcription

On peut intégrer le niveau de régulation chromatinien au cycle de transcription décrit précédemment (Figure 25). Dans un contexte chromatinien répressif, la densité en nucléosomes et en histone de liaison H1 est élevée alors que, dans un contexte chromatinien permissif pour la transcription (chromatine "ouverte"), elle est beaucoup plus faible. Le passage de la machinerie transcriptionnelle à travers la chromatine "ouverte" impose néanmoins le déplacement des nucléosomes. Ce déplacement peut être facilité par les complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendants décrits précédemment. Ainsi, la vitesse d'élongation de l'ARN polymérase dépend en partie de la vitesse de remodelage de la chromatine. Par ailleurs, certaines marques épigénétiques portées par les nucléosomes peuvent également influencer l'épissage alternatif.

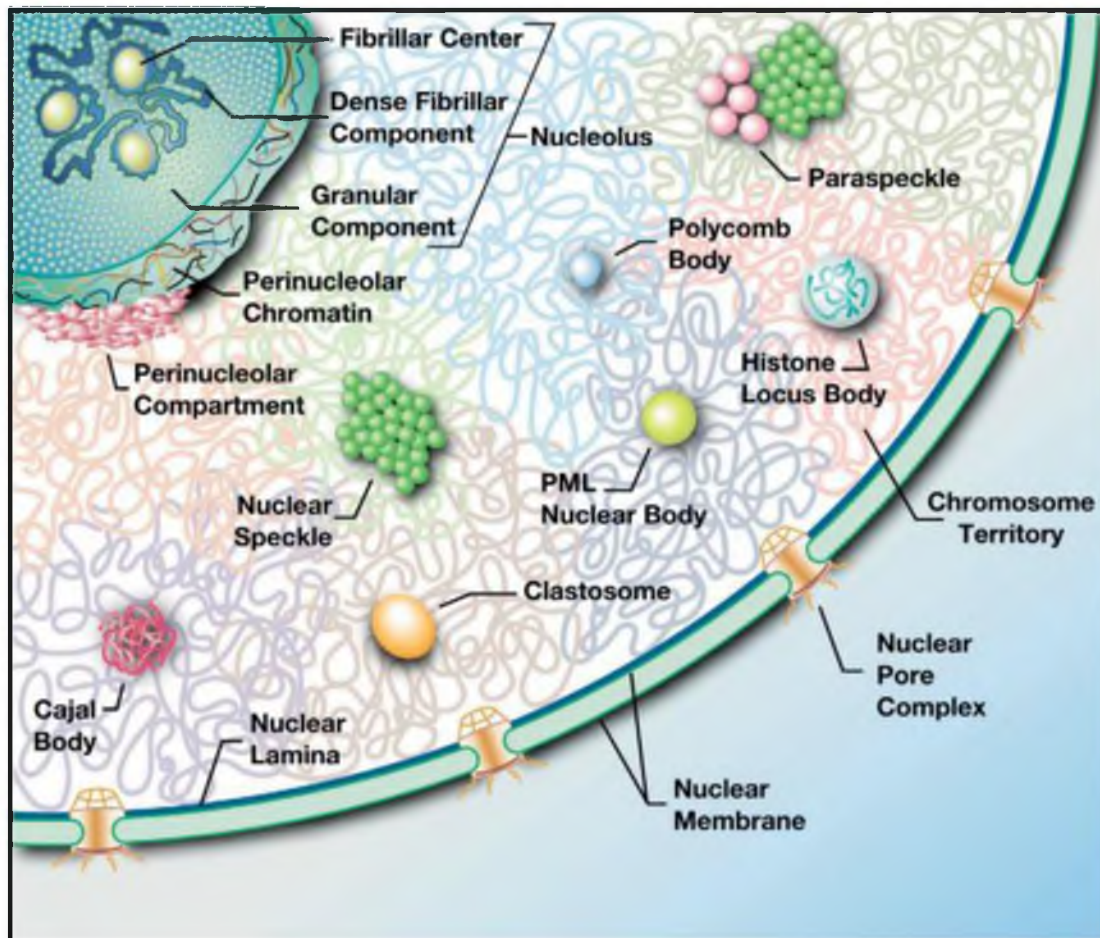


Figure 26 : Diversité des corps nucléaires.

Le dessin représente le paysage d'un noyau de mammifère en interphase. Sous la face intérieure de l'enveloppe nucléaire, la lamina fournit un support mécanique et participe à l'organisation de la chromatine. Les chromosomes en interphase occupent différents territoires. L'espace interchromatinien est très organisé, hautement dynamique et contient de nombreux corps nucléaires tels que les corps de Cajal, les *histones locus bodies*, le nucléole, les *Polycomb bodies*, les *PML bodies*, les clastosomes... Tiré de Mao YS *et al.*, 2011.

3.3.2. Compartimentation nucléaire

Le noyau est une structure très dynamique où se déroulent réplication et réparation de l'ADN, transcription et traitement des ARN (épissage, polyadénylation, ...), transport des ARN du site de transcription vers le pore nucléaire *etc...* La plupart des fonctions nucléaires sont associées à des compartiments nucléaires distincts sans barrière physique (Figure 26). Citons par exemple, le nucléole, lieu de transcription des ARNr et de l'assemblage des pré-ribosomes, les *transcriptional factories*, l'association de gènes en cours de transcription (Cook PR, 1995), les *Polycomb bodies*, l'association de gènes réprimés pris en charge par les complexes PcG (Buchenau P *et al.*, 1998), les corps de Cajal (CB), sites d'assemblage des snRNPs impliquées dans l'épissage des ARNm, le *Histone Locus Body*, lieu de transcription et de traitement des pré-ARNm codant les différentes histones, les *ProMyelocytic Leukemia nuclear bodies* (PML), impliqués dans la réponse au stress, la défense contre les virus et la stabilité du génome (Takahashi JH *et al.*, 2003), et enfin, les clastosomes, qui contiennent des composants du protéasome et se forment en réponse à des stimuli qui activent la protéolyse dépendante du protéasome (Lafarga M *et al.*, 2002). Ces structures sont très dynamiques. Leur présence en quantité anormalement élevée peut être indicative de pathologies (pour revue, voir Mao YS *et al.*, 2011).

Grâce aux techniques de DNA FISH (*DNA Fluorescence In Situ Hybridization*) ou de capture 3C (*Chromosome Conformation Capture*) couplée à l'analyse à haut débit (Dekker *et al.*, 2002; Simonis *et al.*, 2006; Lieberman-Aiden *et al.*, 2009), il est possible d'explorer les interactions chromatiniennes *in vivo* à l'échelle d'un génome (Sexton *et al.*, 2012). Les données ainsi obtenues suggèrent que des gènes distants l'un de l'autre, localisés en *cis* sur le même chromosome, ou en *trans* sur un autre chromosome, ne sont pas des entités indépendantes mais interagissent au contraire dans un même corps nucléaire. Par exemple, dans l'embryon de drosophile, les complexes homéotiques ANT-C et BX-C, bien que situés à plusieurs mégabases l'un de l'autre sur le même chromosome, sont préférentiellement rassemblés au sein de *Polycomb bodies* dans un tissu où ils sont simultanément réprimés (Bantignies *et al.*, 2011).

4 La biogenèse des ribosomes

Chez la drosophile, les mutants *Minute* présentent un cycle développemental plus long, sont peu fertiles et ont une durée de vie réduite. La taille globale du corps est réduite et les soies sont plus fines. Ces mutants présentent une perturbation générale de l'homéostasie. Kongsuwan et coll. (1985) furent les premiers à relier sans équivoque les *loci Minute* aux gènes codant des protéines ribosomiques. Plus récemment, une analyse à l'échelle du génome a montré que la plupart des gènes des protéines ribosomiques, à l'exception de quelques uns, peuvent être reliés aux phénotypes *Minute* (Marygold *et al.*, 2007). Les phénotypes *Minute* s'observent chez des individus hétérozygotes, soit pour des délétions chromosomiques, soit pour des allèles perte de fonction, ce qui indique que les gènes des protéines ribosomiques sont haplo-insuffisants (Lindsley *et al.*, 1972 et 1992; Lambertsson, 1998). Les protéines ribosomiques étant présentes en quantité équimolaire dans les ribosomes, la perte d'un allèle produirait un déséquilibre stoechiométrique qui conduirait à la diminution du nombre de ribosomes fonctionnels de la cellule et perturberait la traduction dans son ensemble (Lambertsson, 1998). Ainsi, le contrôle de l'homéostasie cellulaire passe par une régulation précise des différents composants ribosomiques.

4.1. Le ribosome

Les ribosomes sont présents dans les cellules eucaryotes et procaryotes. Ils forment des complexes ribonucléoprotéiques au sein desquels la synthèse protéique a lieu. Ils sont constitués d'ARN ribosomiques (ARNr), et de nombreuses protéines ribosomiques (RPs). Ils sont assemblés en deux sous-unités, la plus petite (40S) qui décode l'ARN messager et la plus grosse (60S) qui synthétise le polypeptide correspondant.

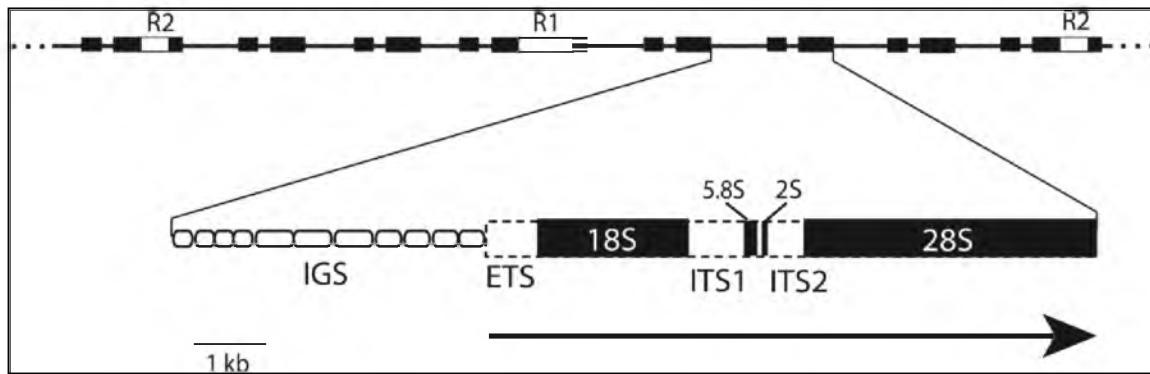


Figure 27 : Schéma du locus des ADNr de la drosophile.

La polymérase I transcrit un pré-ARNr qui contient des séquences ETS (*External Transcribed Spacer*) et ITS (*Internal Transcribed Spacer*) en blanc et IGS (*Inter Genic Spacer*) séquences répétées représentées par des formes arrondies, ainsi que des séquences codant les ARNr en noir. Les séquences R2 et R1 correspondent à des rétrotransposons insérés dans environ 50% des gènes d'ADNr de la drosophile. Tiré de Stage *et al.*, 2007.

La biogenèse des ribosomes représente une part importante de l'activité cellulaire. Dans un tissu en développement, les cellules se divisent rapidement, et jusqu'à 60% des événements de transcription sont dédiés à la production des ARN ribosomiques. Chez la levure, on estime que 50% de la transcription par l'ARN polymérase II et 90% des événements d'épissage sont dédiés à la synthèse de RPs. La coordination de la régulation des gènes des ARNr et des RPs est essentielle pour l'homéostasie de la cellule. De nombreuses voies de transduction du signal sont engagées dans cette régulation et peuvent rapidement induire ou réprimer la transcription de ces gènes, impliquant en parallèle des modifications majeures dans l'expression d'autres gènes (Warner, 1999).

4.1.1. Structure du ribosome

Les ribosomes mitochondriaux se rapprochent des ribosomes procaryotes et leur biogenèse ne sera pas présentée ici. Chez les eucaryotes, la grande sous-unité du ribosome (60S) est constituée de trois molécules d'ARNr (5S, 28S et 5,8S) et de 49 RPs. La petite sous-unité (40S) est constituée de la molécule d'ARNr 18S et de 32 RPs. La biogenèse des ribosomes a été très étudiée, en particulier chez la levure. Les voies de biogenèse des ribosomes et leurs composants sont très conservés. Cependant, il existe des différences entre eucaryotes, comme le nombre de copies des différents gènes codant les RPs.

4.1.2. Les ARN ribosomiques

Les gènes des ARNr sont répétés en tandem, regroupés dans des régions chromosomiques appelées régions organisatrices du nucléole ou NOR (*Nucleolar Organizer Region*). Le nucléole s'organise autour du NOR et dans certaines espèces comme par exemple chez l'homme, plusieurs NOR coopèrent pour former un nucléole. Chez la drosophile, les NOR sont situés sur le bras long des chromosomes sexuels (Roy *et al.*, 2005). Le nombre de gènes des ARNr varie de 100 à plusieurs centaines chez les mammifères, on en trouve 96 copies sur le chromosome X et 144 sur le chromosome Y de *Drosophila melanogaster* (Lyckegaard et Clark, 1991).

RP genes for <i>Drosophila melanogaster</i>				RP genes for <i>Homo sapiens</i>				RP genes for <i>Saccharomyces cerevisiae</i>					
Small Subunit		Large Subunit		Small Subunit		Large Subunit		Small Subunit		Large Subunit		Large Subunit	
S1A	sta	L3	Rpl.3	S1A	RPSA	L3	RPL3	S1A	RPS0A	L3	RPL3	L27A	RPL28
S2	sop	L4	Rpl.4	S2	RPS2	L4	RPL4	S2	RPS0B	L4	RPL4A	L28	RPL29
S3	RpS3	L5	Rpl.5	S3	RPS3	L5	RPL5	S3	RPS2	L4	RPL4B	L29	RPL30
S3A	RpS3A	L6	Rpl.6	S3A	RPS3A	L6	RPL6	S3	RPS3	L5	RPL5	L30	RPL31
S4	RpS4	L7	Rpl.7	S4	RPS4X	L7	RPL7	S3A	RPS1A	L6	RPL6A	L31	RPL31A
S5	RpS5a	L7A	Rpl.7A	S4	RPS4Y	L7A	RPL7A	S3A	RPS1B	L6	RPL6B	L32	RPL32
S6	RpS5b	L8	Rpl.8	S5	RPS5	L8	RPL8	S4	RPS4A	L7	RPL7A	L33	RPL34
S6	RpS6	L9	Rpl.9	S6	RPS6	L9	RPL9	S4	RPS4B	L7	RPL7B	L34	RPL34A
S7	RpS7	L9	Om	S7	RPS7	L10	RPL10	S5	RPS5	L7A	RPL8A	L34	RPL34B
S8	RpS8	L10A	Rpl.10Ab	S8	RPS8	L10A	RPL10A	S6	RPS6A	L8	RPL8B	L35	RPL35A
S9	RpS9	L10A	Rpl.10Aa	S9	RPS9	L11	RPL11	S6	RPS6B	L8	RPL2A	L35	RPL35B
S10	RpS10b	L11	Rpl.11	S10	RPS10	L12	RPL12	S7	RPS7A	L9	RPL2B	L35A	RPL33A
S10	RpS10a	L12	Rpl.12	S11	RPS11	L13	RPL13	S7	RPS7B	L9	RPL3A	L35A	RPL33B
S11	RpS11	L13	Rpl.13	S12	RPS12	L13A	RPL13A	S8	RPS8A	L9	RPL3B	L36	RPL36A
S12	RpS12	L13A	Rpl.13A	S13	RPS13	L14	RPL14	S8	RPS8B	L10	RPL10	L36	RPL36B
S13	RpS13	L14	Rpl.14	S14	RPS14	L15	RPL15	S9	RPS9A	L10A	RPL1A	L36A	RPL42A
S14	RpS14a	L15	Rpl.15	S15	RPS15	L17	RPL17	S9	RPS9B	L10A	RPL1B	L36A	RPL42B
S14	RpS14b	L17	Rpl.17	S15A	RPS15A	L18	RPL18	S10	RPS10A	L11	RPL11A	L37	RPL37A
S15	RpS15	L18	Rpl.18	S16	RPS16	L18A	RPL18A	S10	RPS10B	L11	RPL11B	L37	RPL37B
S15A	RpS15Ab	L18A	Rpl.18A	S17	RPS17	L19	RPL19	S11	RPS11A	L12	RPL12A	L37A	RPL43A
S15A	RpS15Aa	L19	Rpl.19	S18	RPS18	L21	RPL21	S11	RPS11B	L12	RPL12B	L37A	RPL43B
S16	RpS16	L21	Rpl.21	S19	RPS19	L22	RPL22	S12	RPS12	L13	RPL13A	L38	RPL38
S17	RpS17	L22	Rpl.22	S20	RPS20	L23	RPL23	S13	RPS13	L13	RPL13B	L39	RPL39
S18	RpS18	L23	Rpl.23	S21	RPS21	L23A	RPL23A	S14	RPS14A	L13A	RPL14A	L40	RPL40A
S19	RpS19a	L23A	Rpl.23A	S23	RPS23	L24	RPL24	S14	RPS14B	L13A	RPL14B	L40	RPL40B
S19	RpS19b	L24	Rpl.24	S24	RPS24	L26	RPL26	S15	RPS15	L14	RPL14A	L41	RPL41A
S20	RpS20	L26	Rpl.26	S25	RPS25	L27	RPL27	S15A	RPS22A	L14	RPL14B	L41	RPL41B
S21	oho23B	L27	Rpl.27	S26	RPS26	L27A	RPL27A	S15A	RPS22B	L15	RPL15A	LP0	RPP0
S23	RpS23	L27A	Rpl.27A	S27	RPS27	L28	RPL28	S16	RPS16A	L15	RPL15B	LP1	RPP1A
S24	RpS24	L28	Rpl.28	S27A	RPS27A	L29	RPL29	S16	RPS16B	L17	RPL17A	LP1	RPP1B
S25	RpS25	L29	Rpl.29	S28	RPS28	L30	RPL30	S17	RPS17A	L17	RPL17B	LP2	RPP2A
S26	RpS26	L30	Rpl.30	S29	RPS29	L31	RPL31	S17	RPS17B	L18	RPL18A	81 gènes	
S27	RpS27	L31	Rpl.31	S30	RPS30	L32	RPL32	S18	RPS18A	L18	RPL18B	dont 34 gènes dupliqués	
S27A	RpS27A	L32	Rpl.32			L34	RPL34	S18	RPS18B	L18A	RPL20A	et 13 gènes uniques	
S28	RpS28b	L34	Rpl.34a	33 gènes		L35	RPL35	S19	RPS19A	L19	RPL19A		
S28	RpS28a	L34	Rpl.34b	dont 1 gène dupliqué		L35A	RPL35A	S19	RPS19B	L19	RPL19B		
S29	RpS29	L35	Rpl.35	et 31 gènes uniques		L36	RPL36	S20	RPS20	L21	RPL21A	Small Subunit	
S30	RpS30	L35A	Rpl.35A			L36A	RPL36A	S21	RPS21A	L21	RPL21A	S28	RPS28A
		L36	Rpl.36			L37	RPL37	S21	RPS21B	L21	RPL21B		RPS28B
		L36A	Rpl.36A			L37A	RPL37A	S23	RPS23A	L22	RPL22A	S29	RPS29A
		L37	Rpl.37a			L38	RPL38	S23	RPS23B	L22	RPL22B		RPS29B
		L37A	Rpl.37A			L39	RPL39	S24	RPS24A	L23	RPL23A	S30	RPS30A
		L38	Rpl.38			L40	RPL40	S24	RPS24B	L23	RPL23B		RPS30B
		L39	Rpl.39			L41	RPL41	S25	RPS25A	L23A	RPL25	56 gènes	
		L40	Rpl.40			LP0	RPLP0	S25	RPS25B	L24	RPL24A	dont 24 dupliqués	
		L41	Rpl.41			LP1	RPLP1	S26	RPS26A	L26	RPL26A	et 8 gènes uniques	
		LP0	RpLP0			LP2	RPLP2	S26	RPS26B	L26	RPL26A		
		LP1	RpLP1					S27	RPS27A	L27	RPL27A		
		LP2	RpLP2					S27	RPS27B	L27	RPL27B		
								S27A	RPS31				

Figure 28 : Conservation des protéines ribosomiques

Gènes conservés et dupliqués de protéines ribosomiques chez la drosophile, l'homme et la levure. Les gènes sont notés en noir, et leur produit en bleu. Les protéines dont les gènes sont dupliqués sont encadrées en noir. Noter que les numéros de noms des gènes ne correspondent pas toujours au numéro du nom de leur produit. Par exemple chez la levure, les gènes *RPL43A* et *B* produisent la protéine ribosomique RPL37A. Les listes proviennent de la base de données « *ribosomal protein database* ».

La synthèse des ARNr suit de multiples étapes avant la construction d'un ribosome mature. Dans le nucléole, l'ADNr est transcrit par l'ARN polymérase I en un ARNr 45S chez la levure et 47S chez les autres eucaryotes. La maturation de cet ARNr 45/47S a lieu en plusieurs étapes : tout d'abord il subit de nombreuses méthylations et pseudo-uridylation, puis il est clivé par le complexe U3 snRNP au niveau des sites ETS (*External Transcribed Spacer*) et ITS (*Inter Genic Spacer*) pour donner les ARN fonctionnels 28S, 18S, 5,8S (et 2S chez la drosophile : Figure 27) qui seront ensuite intégrés dans le ribosome (Venema et Tollervey, 1999 ; Filipowicz et Pogacic, 2002). Présent uniquement chez les insectes, l'ARNr 2S s'hybride à l'ARNr 5,8S pour former une structure tige-boucle conservée au sein de l'ARNr 5,8S des autres espèces (Pavlakakis *et al.*, 1979). L'ARN 5S est transcrit au niveau d'un site chromosomique extra-nucléolaire par l'ARN polymérase III (pour revue, voir White, 2011) et intégré au ribosome dans le cytoplasme.

4.1.3. Les protéines ribosomiques (RPs)

Pendant la maturation de l'ARNr 45/47S, les protéines ribosomiques (RPs) de la grande sous-unité (L) et de la petite sous-unité (S) sont importées vers le nucléole et s'associent à celui-ci.

Les RPs de la grande sous-unité (RPL) et de la petite sous-unité (RPS) sont très conservées chez les eucaryotes. La nomenclature des protéines ribosomiques tend aujourd'hui à être harmonisée (McConkey *et al.*, 1979 ; Wool *et al.*, 1991). On dénombre 47 RPL et 32 RPS de la levure à l'homme. (Figure 28) Chez la levure, la plupart des gènes codant les RPS sont dupliqués : 72% pour les RPL et 75% pour les RPS. Les différents paralogues ont parfois évolué en acquérant des fonctions distinctes (Komili *et al.*, 2007). De plus, les RPs subissent de nombreuses modifications post-traductionnelles (méthylations, ubiquitinations, phosphorylations, acétylations,...) qui peuvent moduler leur fonction. Ceci a suggéré à Komili et coll. l'hypothèse du "code ribosome" dans laquelle l'assemblage de différents variants de RPs, porteurs de différentes modifications post-traductionnelles, conférerait au ribosome une certaine spécificité fonctionnelle (Komili *et al.*, 2007). Cette hypothèse n'est pas sans rappeler celle du code histone.

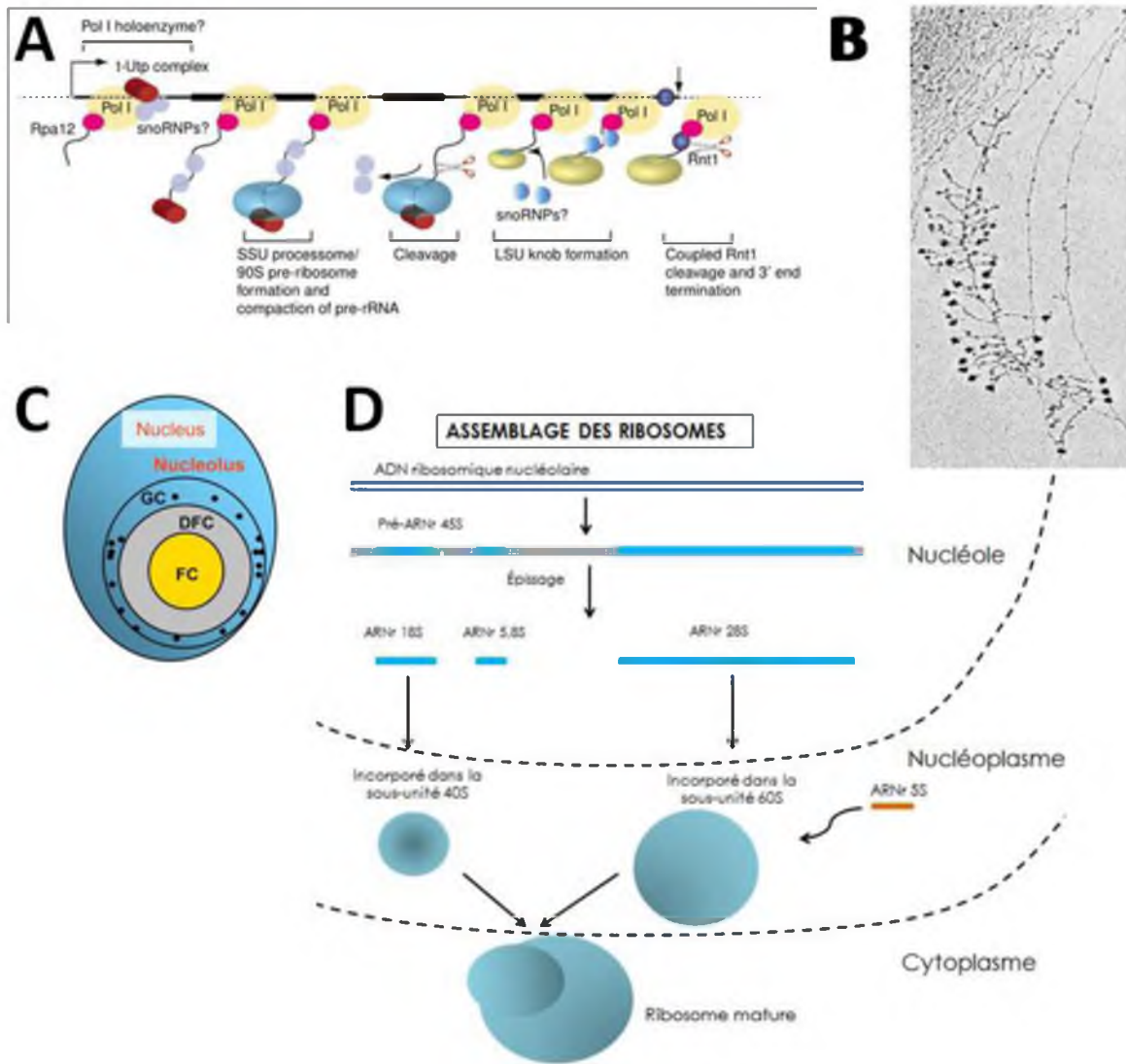


Figure 29 : Assemblage des ribosomes

A Modèle de transcription de l'ADNr couplée à la modification du pré-ARNr et à son assemblage. Un clivage co-transcriptionnel a lieu au niveau du site ITS1. Une petite pelote est visible sur le pré-ARNr, qui devient plus compacte quand l'ARN polymérase I s'approche du côté 3' de l'ARNr. Cette pelote, appelée « LSU knob » contiendrait les facteurs nécessaires à la synthèse des ARNr 5,8S et 25S, qui participent à la sous-unité 60S. Quand la polymérase I atteint le site de terminaison, l'endonucléase Rnt1 est chargée sur le pré-ARNr et clive la partie 3' de façon co-transcriptionnelle (Granemann et Baserga, 2005). **B** visualisation en microscopie électronique d'ADNr en cours de transcription dans le nucléole. (Adapté de Granemann et Baserga, 2005). **C** Schéma des structures composant le nucléole. **D** Schéma simplifié des étapes de l'assemblage des ribosomes.

Comme les histones, les RPs sont des protéines très basiques. La plupart d'entre elles interagissent avec l'ARN. Certaines RPs présentent des similarités avec les queues des histones. Par exemple, la partie N-terminale des RPs de drosophile RPL22 et RPL23a, et la partie C-terminale de la protéine ribosomique RPS6 du moustique présentent une séquence d'acides aminés *Histone H1-like* (Zhai et Fallon, 2005 ; Hernandez et Fallon, 2007). Les RPs sont présentes en un seul exemplaire dans le ribosome à l'exception des RPs acides P1 et P2 qui forment un hétéro-tétramère. P1 et P2 sont localisés à l'extérieur de la grande sous-unité du ribosome et forment une protubérance appelée *stalk*.

4.1.4. Assemblage des ribosomes

Le pré-ribosome est assemblé dans le noyau (Fromont-Racine *et al.*, 2003). Les RPs sont importées dans le noyau par différents transporteurs nucléaires, comme les karyophérines Pse1p et Kap123p (Rout *et al.*, 1997). Chez la souris, RPL12 est importée dans le noyau par une voie différente, spécifiquement prise en charge par l'Importine 11 (Plafker et Macara, 2002). RPL12 est incorporée tardivement dans le ribosome et les auteurs proposent un rôle régulateur de cette voie d'assemblage différente.

Le processus d'assemblage des ribosomes est très conservé, étroitement régulé en réponse aux stress environnementaux et aux conditions de croissance cellulaire. L'assemblage débute dans le nucléole, se poursuit transitoirement dans le nucléoplasme, et s'achève dans le cytoplasme (Figure 29D).

Le nucléole est organisé en trois sous-structures distinctes, les centres fibrillaires (FCs), le compartiment fibrillaire dense (DFC) et le composant granulaire (GC) (Figure 29C). Ces compartiments contiennent chacun des facteurs d'assemblage du ribosome différents. Il a donc été proposé qu'ils participent à l'organisation spatio-temporelle de la biogenèse des ribosomes (Scheer et Hock, 1999). L'analyse du DFC montre la présence de fibrillarine (Nop1 chez la levure), de snoARN (comme *U3*) et des ARNr (Beven *et al.*, 1996). Cette région particulière du nucléole est celle où l'ARN polymérase I transcrit les ARNr (Cmarko *et al.*, 2000). Ainsi, le grand transcrit initial qui est assemblé avec le pré-ribosome est situé dans la région DFC (Figure 29A).

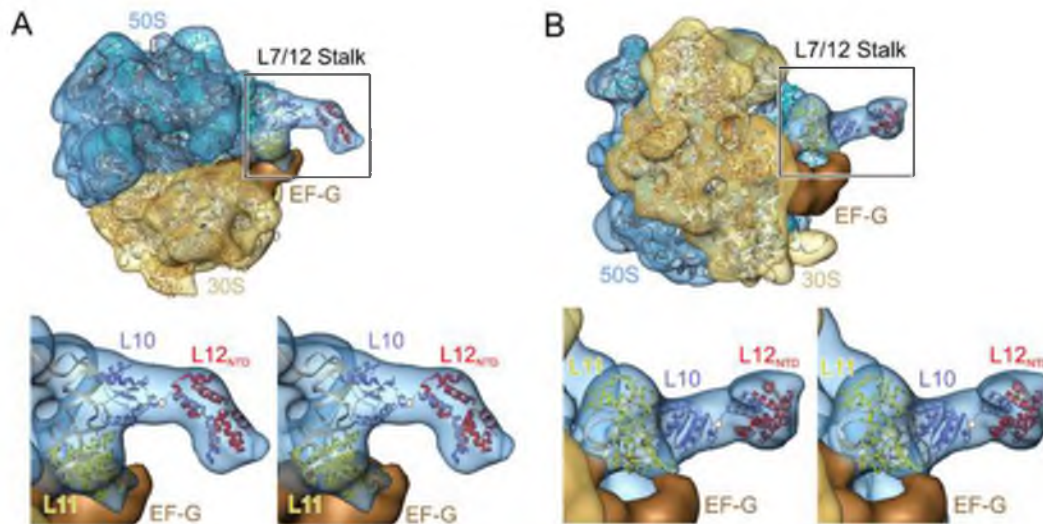


Figure 30: Ribosome stalk du ribosome prokaryote

Structure cristallographique d'une partie du ribosome procaryote associée au facteur d'élongation EF-G. **A** Sous-unité 50S (bleu transparent) en haut et sous-unité 30S en bas (jaune transparent) en bas. Les ARNr 23S et 5S sont les rubans gris dans la sous unité 50S et l'ARNr 16S est le ruban gris clair dans la sous-unité 30S. Le facteur EF-G est coloré en marron. Le stalk est rendu flexible grâce à P0 (RPL10 chez les procaryotes). Le stalk peut être divisé en trois segments structurels et fonctionnels. Le premier segment, considéré comme la base du stalk, est formé par la région de fixation à l'ARNr des protéines L10/L11 (**P0** et **RPL12** chez les eucaryotes). Le second segment est composé de l'hélice $\alpha 8$ de L10 (**P0** eucaryote) complexée aux dimères des parties N terminales de L12 (**P1** eucaryote). Les régions charnières de L10 et C terminale des dimères L12 forment le troisième segment (Diaconu *et al.*, 2005). **B** Vue du ribosome du côté de la sous unité 30S. Adapté de Diaconu *et al.*, 2005.

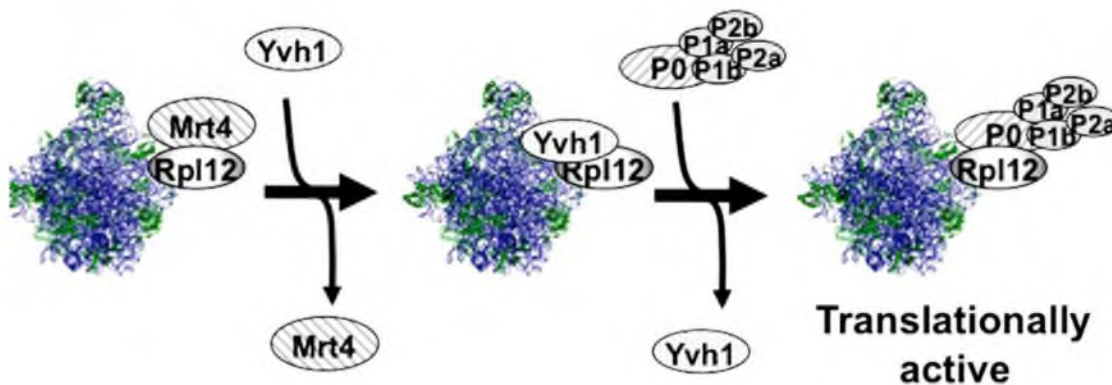


Figure 31 : Assemblage du stalk du ribosome eucaryote

Mrt4 et Rpl12 permettent le repliement de l'ARNr à la base du stalk durant la biogenèse du ribosome dans le nucléole. Yvh1 se fixe à RPL12 ce qui conduit à la libération de Mrt4. Par la suite, Yvh1 est déplacée en même temps que le stalk s'assemble à la sous-unité 60S. Tiré de Lo *et al.*, 2009.

La synthèse des ARNr est immédiatement suivie de l'initiation de leur maturation par épissage réalisé par des snoRNP. De nombreux facteurs d'assemblage du pré-ARNr, comme le *snoARN U3* et le complexe t-UTP, sont recrutés sur le pré-ARNr.

Le complexe d'assemblage de la petite sous-unité (SSU pour *Small-SubUnit Processome*) est un grand complexe ribonucléoprotéique nécessaire à la biogenèse de l'ARNr 18S et correspond vraisemblablement à la pelote terminale visualisée en microscopie électronique en 5' de l'ARNr naissant (Figure 29B). Le pré-ARNr subit des clivages en plus de 10 sites ETS et ITS avant de donner naissance aux ARNr 18S, 25S, et 5,8S matures chez la levure (18S, 28S et 5,8S chez les autres eucaryotes) (Figure 27 pour la drosophile). Plus de 170 facteurs d'assemblage du ribosome ont été purifiés, ils interviennent à différentes étapes de leur maturation. Les RPs s'associent séquentiellement aux pré-ARNr tout au long du processus de maturation. Après translocation indépendante de la grande et de la petite sous-unité par des facteurs d'exports spécialisés, elles sont assemblées dans le cytoplasme (Fromont-Racine *et al.*, 2003). La dernière étape de l'assemblage du ribosome, qui a également lieu dans le cytoplasme, est l'assemblage du *stalk* du ribosome.

Les *stalk* des ribosomes eucaryotes et procaryotes sont composés de protéines très conservées. Cependant, les changements de nomenclature peuvent prêter à confusion : le *stalk* des ribosomes procaryotes est composé de RPL11, RPL10, RPL12 et RPL7 qui correspondent respectivement à **RPL12**, **P0**, **P1** et **P2** dans les ribosomes eucaryotes (protéines eucaryotes notées en **gras**). Le *stalk* des ribosomes procaryotes a été cristallisé, ce qui a permis de comprendre sa structure (Diaconu *et al.*, 2005). Cette protubérance flexible localisée à la surface de la grande sous-unité du ribosome au niveau de la sortie du tunnel peptidique, est formée par **P1** et **P2** (RPL7/RPL12). Le *stalk* sert de plateforme d'interaction entre les facteurs d'élongation de la traduction EF-Tu et EF-G (Figure 30) et le ribosome. Il est indispensable aux mécanismes GTP-dépendants de la traduction (voir paragraphe activité du ribosome) (Diaconu *et al.*, 2005).

Chez la levure, l'assemblage du *stalk* a lieu grâce à l'échange entre la protéine **Mrt4** (facteur d'assemblage) et **RPL12**. Ces deux protéines interagissent avec **P0**. L'assemblage séquentiel du *stalk*, qui est spécifique des ribosomes eucaryotes, serait une voie de régulation supplémentaire de son activité (Figure 31) (Lo *et al.*, 2009 ; Rodriguez-Mateos *et al.*, 2009).

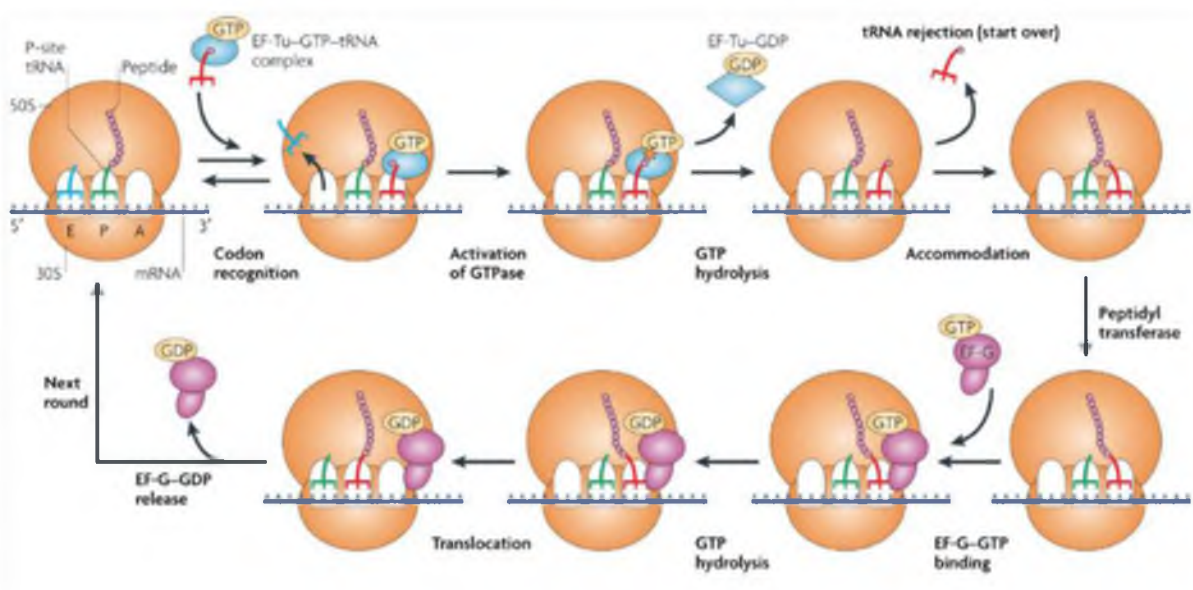


Figure 32. Activité du ribosome durant la traduction chez les procaryotes

La traduction de l'ARN messager est initiée par la liaison de l'ARN de transfert initial (ARN^t_{fmet}) au site P. L'ARN^t suivant est fixé au site A, complexé aux facteurs d'élongation (EF)-Tu-GTP. Un appariement codon-anticodon concordant active le centre GTPase du ribosome formé par le stalk qui hydrolyse la GTP et sépare la partie acide aminé de l'ARN^t. Le changement de conformation de l'ARN^r induit par cette réaction permet à la peptidyl transférase de réaliser le transfert de l'acide aminé du site A à la chaîne d'acides aminés fixée au site P. La chaîne peptidique est donc maintenant fixée au site A. Le ribosome « glisse » ensuite vers le 3' de l'ARN^m pour décoder le codon suivant. La translocation de l'ARN^t et de l'ARN^m est facilitée par la fixation de la GTPase EF-G, qui désacétyle l'ARN^t au site P et le transfère au site E et qui transfère la chaîne peptidique couplée à l'ARN^t du site A vers le site P grâce à l'hydrolyse du GTP. Le ribosome peut ensuite recommencer un nouveau tour d'élongation de la traduction. Tiré de Steitz, 2008.

4.1.5. Activité du ribosome

La grande sous-unité ribosomique forme un tunnel par lequel sort la chaîne protéique en cours de synthèse (*exit tunnel*). Elle présente trois sites de fixation des ARNt porteurs des acides aminés: (A) ou site Aminoacyl, (P) ou site Peptidyl et (E) ou site *exit* (Figure 32). Le site (P) est occupé par un ARNt porteur d'un acide aminé lié à la chaîne polypeptidique néoformée. Le site (A) est occupé par un ARNt porteur d'un acide aminé en attente d'être lié à la chaîne polypeptidique. Enfin, le site (E) permet la libération de l'ARNt déacétylé qui a délivré son acide aminé.

Enfin, le ribosome est un moteur moléculaire qui avance sur l'ARNm en consommant l'énergie fournie par l'hydrolyse du GTP. Plusieurs protéines, appelées facteurs d'élongation, sont associées à cette translocation.

4.2. Fonctions extra-ribosomiques des RPs

Outre leur rôle dans la traduction, des fonctions extra-ribosomiques ont été décrites pour certaines RPs.

4.2.1. Epissage et NMD (*Non-sense Mediated Decay*)

Les gènes codant les RPs sont souvent régulés par épissage alternatif, ou par l'utilisation de promoteurs alternatifs. Certaines RPs bloquent l'épissage de leur propre ARNm et, ce faisant, créent un transcrit alternatif comportant un codon non-sens prématuré (contenu dans l'intron). Ce transcrit est dégradé par la machinerie du NMD (*Non-sense Mediated Decay*).

4.2.1.1. Le NMD

La dégradation des ARNm non-sens, ou NMD, est un mécanisme de contrôle qualité chez les eucaryotes. Il élimine les ARNm aberrants qui comportent un codon stop prématuré résultant, soit d'une erreur de transcription, d'une mutation, d'une erreur d'épissage induisant un changement du cadre de lecture, soit d'un défaut d'épissage laissant l'intron

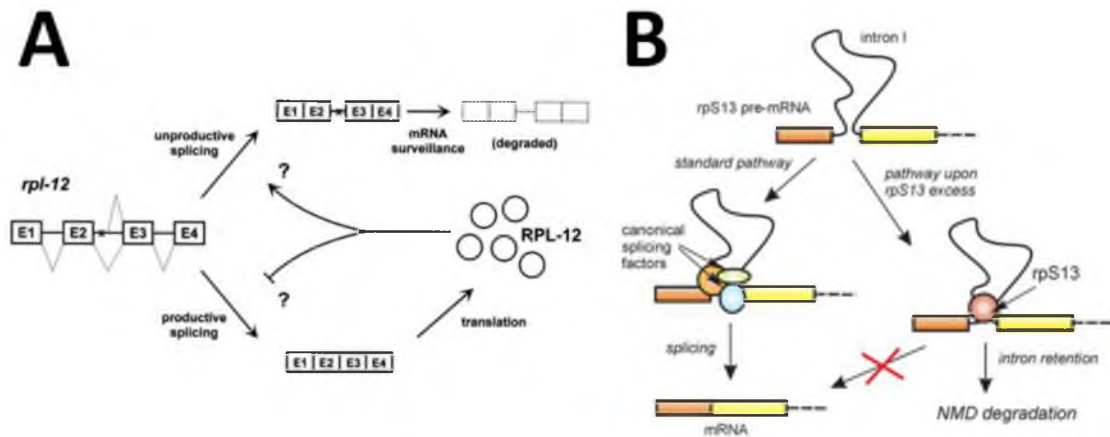


Figure 33 : Modèle de régulation négative de l'épissage alternatif de *RPL12* et de *RPS13*.

A L'ARNm codant RPL12 est épissé. Quand la protéine est présente en excès, la forme libre, non-associée au ribosome régulerait négativement l'épissage de son propre pré-ARNm. Cette boucle de rétro-contrôle négatif réduirait la quantité d'ARNm épissé productif, au profit d'un ARNm non épissé qui serait éliminé par la voie du NMD (Adapté de Mitrovitch *et al.*, 2000). **B** Représentation schématique de l'auto-régulation de la voie de biosynthèse de *RPS13*, par l'épissage imparfait de son premier intron. Adapté de Malygin *et al.*, 2007.

dans le transcrit. Ceci limite la production de protéines tronquées ou mutantes. Dans certains cas particuliers, le NMD participe à la régulation de l'expression des gènes.

Le NMD est déclenché lorsqu'un codon stop est détecté avant le dernier exon de l'ARNm. Lors de l'épissage de l'ARN pré-messager, des complexes protéiques, appelés *Exon Junction Complexes* ou EJC, sont déposés à proximité des jonctions exons-introns par le spliceosome. L'ARN maturé est exporté dans le cytoplasme avec ses EJC. Lors de la traduction, le premier ribosome engagé enlève les EJC durant sa progression. En situation normale, lorsque le ribosome atteint le codon stop, tous les EJC ont été enlevés par son passage. S'il s'agit d'un codon stop prématuré, la persistance d'EJC en aval, c'est à dire entre le ribosome et l'extrémité 3' de l'ARN messager, déclenche l'adressage de celui-ci vers des complexes de dégradation comme l'exosome (pour revue, voir Chang *et al.*, 2007).

En 2000, Mitrovitch et coll. ont montré l'implication de la voie du NMD dans la dégradation des ARNm de *RPL3*, *RPL7a*, *RPL10a* et *RPL12* comportant un codon stop prématuré chez *Caenorhabditis elegans* (Figure 33B). Un vecteur de surexpression du gène *RPL12* dans un contexte mutant pour la voie du NMD (mutants *smg^{-/-}*) produit des transcrits non épissés. De façon inattendue, en contexte sauvage, ce vecteur de surexpression n'induit pas d'augmentation de la quantité totale de protéine RPL12. En effet, un ARNm non épissé est alors produit et ciblé par la voie du NMD, réduisant la quantité de transcrits épissés productifs (Figure 33A). Ainsi, la quantité totale de RPL12 reste stable. Ces résultats ont été confirmés chez l'homme et la souris pour *RPL12* et *RPL3* (Cucurese *et al.*, 2005), suggérant une voie d'auto-régulation conservée de certaines RPs. D'autres ARN codant des RPs, comme RPS13 (Malygin *et al.*, 2007) et RPS16 (Ivanov *et al.*, 2010), sont soumis à ce type d'auto-régulation qui favoriserait la rétention d'un intron contenant un codon stop (Figure 33B).

Chez l'homme, RPS26 inhiberait l'épissage du premier intron de ses transcrits (Ivanov et Malygin, 2005). Une augmentation de la concentration de RPL1 dans des ovocytes de *Xenopus laevis* conduit à la formation d'isoformes d'ARNm *RPL1* contenant les introns 2 et 3 (Caffarelli *et al.*, 1987).

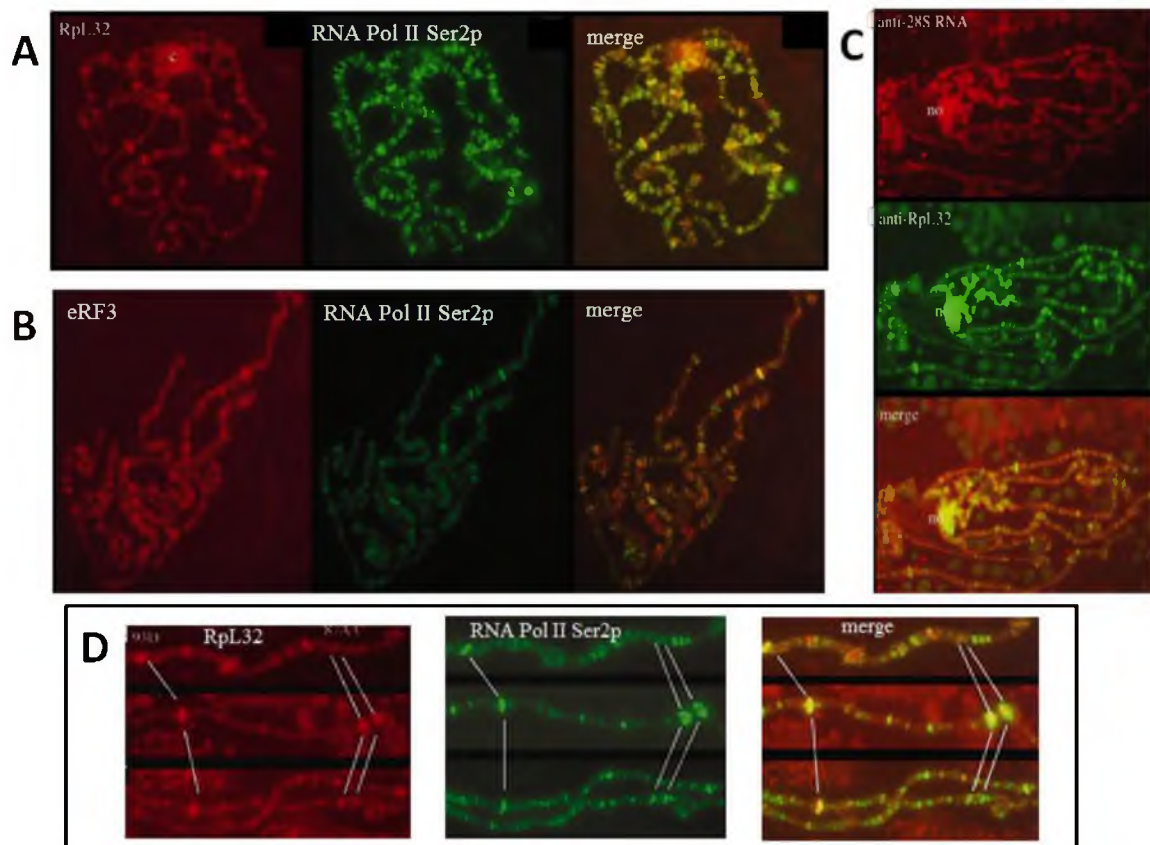


Figure 34 : Les protéines ribosomiques fixent la chromatine.

A co-localisation sur chromosomes polytènes de Rpl32 (en rouge) et de l'ARN Pol II Ser2p (en vert). La superposition des images (merge) montre une co-localisation parfaite.

B co-localisation sur chromosomes polytènes de eRF3, facteur de terminaison de la traduction (en rouge) et de l'ARN Pol II Ser2p (en vert). La superposition des images (merge) montre une co-localisation partielle.

C co-localisation sur chromosomes polytènes de l'ARNr28S (en rouge) et de Rpl32 (en vert). La superposition des images (merge) montre une co-localisation parfaite.

D co-localisation de Rpl32 (en rouge) et de l'ARN pol II Ser2p aux loci 93D et 87A/C sur le chromosome III à température ambiante (panneaux du haut), après 45 min de choc thermique (panneaux du milieu) et après 45 minutes de choc thermique puis 5 minutes de pause après choc (panneaux du bas). Les RPs et l'ARN Pol II Ser2p sont enrichies aux *loci hsp* avec un choc thermique, mais se dissocient rapidement à la fin du choc thermique.

Modifié de Brogna *et al.*, 2002.

Chez la levure, RPL32 (RP49 chez la drosophile) inhibe non seulement l'épissage de son propre ARNm en se fixant sur son premier intron (comme RPS13, Figure 33B) mais également sa traduction en restant fixée sur son propre ARNm (Dabeva *et al.*, 1993).

Ainsi, certaines RPs s'auto-régulent en contrôlant l'épissage de leur propre messager. L'épissage étant un mécanisme co-transcriptionnel, ces données suggèrent qu'elles sont présentes sur leur propre gène pendant la transcription, où elles bloqueraient l'action des facteurs d'épissage. Enfin, cela suggère également que ces RPs participeraient directement au contrôle transcriptionnel de la biogenèse des ribosomes et au maintien de l'homéostasie cellulaire.

4.2.1.2. Régulation transcriptionnelle par des RPs

Longtemps considérées uniquement pour leur fonction dans la traduction, et comme des contaminants lors d'analyse d'interacteurs protéiques par spectrométrie de masse, les RPs remplissent en fait de multiples fonctions, dites "extra-ribosomiques". En particulier, elles participent à la régulation de la transcription. En effet, les RPs se lient à la chromatine et contrôlent la transcription.

Depuis 1995, RPS14 est connue pour réguler la transcription de son propre gène chez l'homme. RPS14 libre (c'est à dire indépendamment du ribosome) se fixe pendant la transcription de son propre gène sur l'ARNm naissant, sur une région qui couvre une centaine de bases en 5'. Elle se fixe également sur des ARN antisens produits à partir de son premier intron. La fixation de RPS14 sur son messager bloque la transcription de *RPS14*, alors que les ARN antisens introniques l'activent (Tasheva et Roufa, 1995).

Cependant, l'implication des RPs dans la régulation transcriptionnelle ne se limite pas à leur propre régulation :

En 2002, Brogna et coll. ont rapporté la fixation de 27 RPs sur les chromosomes polytènes chez la drosophile (Brogna *et al.*, 2002). Les sites de fixation des RPs correspondent à des interbandes de DAPI, régions transcriptionnellement actives. De plus, les RPs co-localisent parfaitement avec l'ARN pol II en cours d'élongation (ARN Pol II Ser2p Figure 34A), ce qui suggère que ces différentes RPs sont potentiellement associées sous forme de pseudo-ribosome (*ribosome-like*) et interagissent avec le transcrit naissant produit par l'ARN pol II.

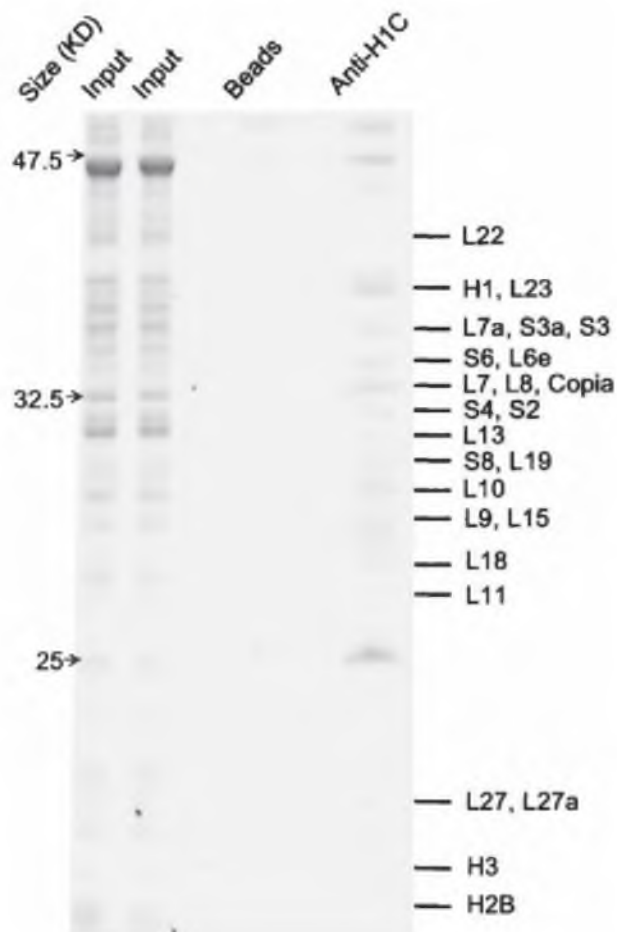


Figure 35 : Protéines ribosomiques nucléaires co-immunoprécipitées par l’histone H1.

Immunoprécipitation d’extraits nucléaires de cellules Kc de drosophile par des anticorps dirigés contre la partie C terminale de l’histone H1 (anti-H1C). Tiré de Ni *et al.*, 2006.

Ces auteurs ont également montré que ces RPs étaient associées sur la chromatine avec des facteurs de traduction (eRF3 et IF2 Figure 34B) et des ARNr des deux sous-unités (Figure 34C), suggérant alors la possibilité d'une traduction nucléaire.

La fixation des protéines RPS7bp, RPL7bp, RPL26ap et RPL34bp sur différents gènes cibles chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* a également été démontrée par ChIP-PCR (Schroder et Moore, 2005). Des transcrits codants, mais également non codants, se fixent aux RPs, ce qui suggère que la présence de RPs ou de pseudo-ribosomes sur la chromatine n'est pas liée à une traduction nucléaire, comme initialement proposé par Iborra et coll. en 2001.

L'étude de la fixation sur la chromatine des RPs RPL11, RPL7 et RPL25 chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* par ChIP-on-chip, révèle la fixation de ces trois protéines en de nombreux sites communs. Dans le cas de RPL7 et RPL11, la fixation dépend de l'ARN. Les trois protéines sont abondantes sur les régions transcrites mais également sur les promoteurs. De façon intéressante, les gènes des ARNt représentent 44% des cibles des trois RPs analysées. Les auteurs suggèrent que ces trois RPs sont associées en pseudo-ribosomes et contrôlent la synthèse des ARNt (De et Brogna, 2011). En accord avec ceci, trois autres RPs (RPL6, RPL26 et RPL14) co-immunoprécipitent avec TFIIE chez *S. cerevisiae* (Dieci *et al.* 2009). De plus, RPL11 réprime la transcription médiée par l'ARN polymérase III dans des cellules de mammifères (Dai *et al.* 2010).

Dans les cellules Jurkat (lignée lymphocytaire T humaine), RPS3 est une sous-unité essentielle du complexe NF- κ B qui interagit avec la sous-unité p65 du complexe. Ce complexe se fixe à des séquences d'ADN nommées κ B motifs, avec peu d'affinité *in vitro*. RPS3, qui possède un domaine KH de liaison à l'ADN, permettrait la fixation spécifique du complexe NF- κ B à ses cibles transcriptionnelles *in vivo* (Wan *et al.*, 2007).

Comme mentionné précédemment, certaines RPs sont impliquées dans la répression transcriptionnelle. Plusieurs RPs nucléaires co-immunoprécipitent avec l'histone H1 dans les cellules Kc de drosophile (Figure 35). En particulier, RPL22 s'associe avec l'histone H1 dans des régions de chromatine condensée. Lorsque l'expérience est réalisée en pré-incubant les extraits nucléaires avec du bromure d'éthidium (qui limite les interactions ADN-protéines), seules RPL7 et RPL22 co-immunoprécipitent avec H1, ce qui suggère que l'interaction entre H1 et les autres RPs n'est pas directe. La surexpression de RPL22

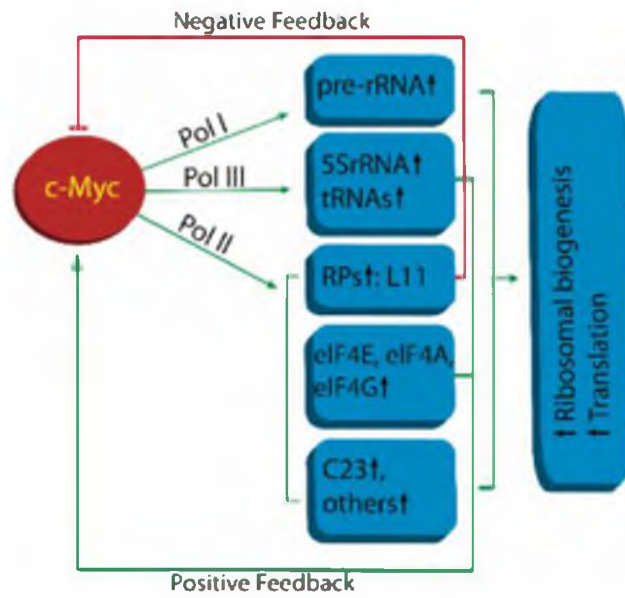


Figure 36 : c-Myc, biogenèse des ribosomes et traduction.

Tiré de Dai et Lu, 2008.

ou H1 réprime la transcription de certains gènes alors que leur inactivation par ARN interférence les active (Ni *et al.*, 2006).

4.3. Les ribosomes, gardiens de l'homéostasie cellulaire

Initialement définie par Claude Bernard, l'homéostasie est la capacité d'un système vivant à conserver son équilibre en dépit des contraintes extérieures (Bernard, 1865). L'homéostasie cellulaire s'appuie sur l'ajustement de la quantité de tous les composants cellulaires en fonction de l'environnement et de l'état physiologique de la cellule. La régulation de la biogenèse des ribosomes est donc cruciale pour le maintien de l'homéostasie cellulaire. La participation des RPs au contrôle de l'expression de leurs propres gènes ou des gènes des ARNt suggèrent qu'elles exercent elles-mêmes un contrôle de la biogenèse des ribosomes et, en conséquence, de l'homéostasie cellulaire. De plus, certaines RPs contrôlent d'autres voies impliquées dans l'homéostasie cellulaire, corroborant leur importance dans ce processus.

4.3.1. La voie Myc

c-Myc est un facteur de transcription essentiel à la croissance et à la prolifération cellulaires. c-Myc forme un hétérodimère avec Max; cet hétérodimère Myc/Max se fixe sur les séquences *E-box* (CACGTG), présentes dans les promoteurs de certains gènes (Adhikary et Eilers, 2005). c-Myc régule, entre autres, la transcription des trois ARN polymérase, contrôlant ainsi indirectement la biogenèse des ribosomes (Adhikary et Eilers, 2005 ; Oskarsson et Trumpp, 2005) (Figure 36).

De plus, c-Myc interagit avec différents facteurs de régulation des ARN polymérase. Par exemple, en se fixant aux TAFs, elle facilite le recrutement de l'ARN pol I sur les promoteurs des gènes des ARNr et augmente ainsi la synthèse des pré-ARNr (Arabi *et al.*, 2005 ; Grandori *et al.*, 2005 ; Grewal *et al.*, 2005). c-Myc augmente également la transcription du pré-ARNr 5S et des ARNt, médiée par l'ARN pol III, en interagissant directement avec TFIIB (Gomez-Roman *et al.*, 2003).

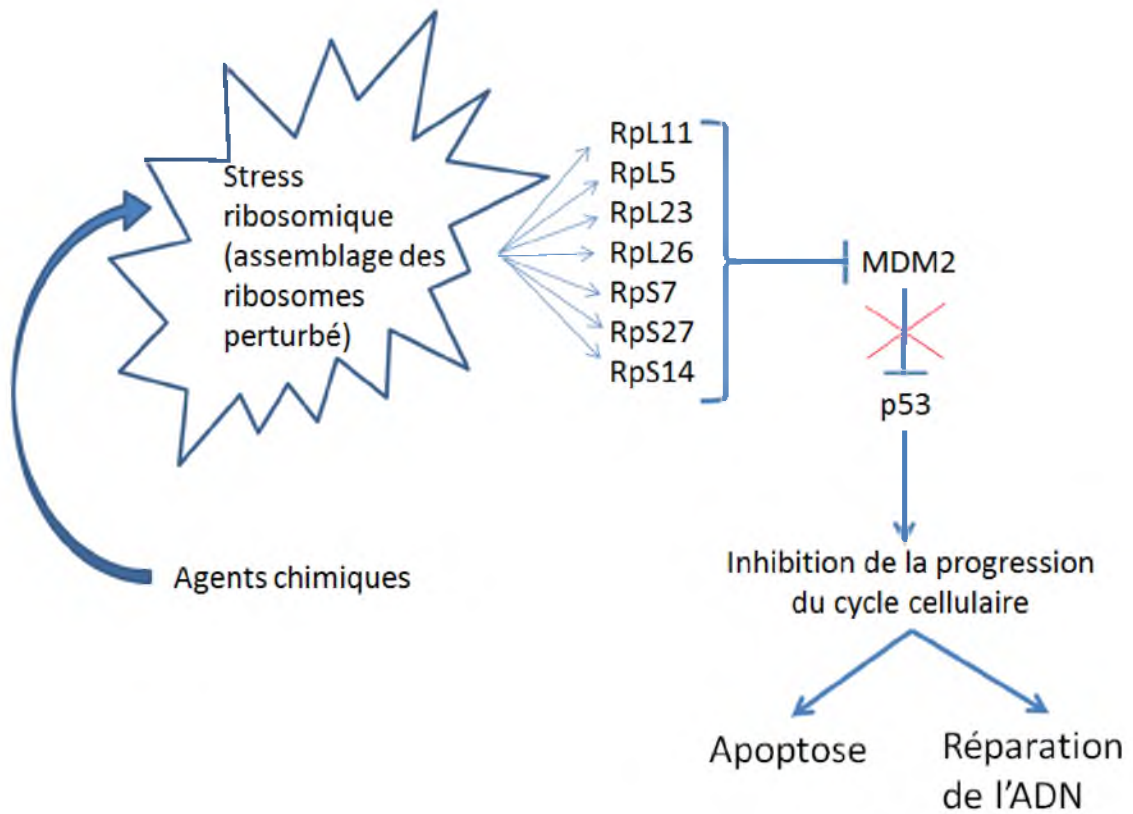


Figure 37 : Modèle de l'activation de p53 par un stress ribosomique

En condition de surexpression de protéines ribosomiques libres, MDM2 est inactivée, ce qui conduit à l'activation de la voie p53.

Enfin, c-Myc active la transcription de nombreux gènes qui codent des protéines impliquées dans la biogenèse des ribosomes et la traduction (Boon *et al.*, 2001 ; Coller *et al.*, 2000 ; Guo *et al.*, 2000 ; Menssen et Hermeking, 2002). c-Myc contrôlerait ainsi directement la biogenèse des ribosomes.

Le gène *RPL11* fait également partie des cibles de c-Myc. De façon intéressante, la protéine RPL11 est impliquée dans une boucle de rétro-contrôle négatif de l'activité de c-Myc dans les cellules Kc de drosophile. En effet, l'inactivation de *RPL11* par ARN interférence augmente l'activité de c-Myc (Dai *et al.*, 2007a). RPL11 régulerait l'activité de c-Myc par différents mécanismes :

(1) RPL11 interagit physiquement avec c-Myc sur les promoteurs de ses cibles et inhiberait le recrutement d'un co-activateur essentiel de c-Myc appelé TRRAP (co-facteur des HATs TIP60 et GCN5). En effet, RPL11 et TRRAP interagissent avec le même domaine de c-Myc et entreraient en compétition (Dai *et al.*, 2007a). En empêchant la fixation de TRRAP, RPL11 réduirait l'acétylation des histones sur les promoteurs des gènes cibles ce qui diminuerait leur transcription.

(2) Un autre mode de régulation de l'activité de c-Myc passerait par sa relocalisation dans le nucléole en cas de surexpression de *RPL11* (Dai *et al.*, 2007b). Alors qu'on s'attendrait à ce que la quantité de c-Myc diminue en cas de surexpression de *RPL11*, le taux de c-Myc insoluble (présent dans les fractions nucléolaires et cytoplasmiques) augmente. En effet, RPL11 le relocaliserait dans le nucléole, empêchant sa dégradation.

(3) Enfin, l'inactivation de *RPL11* induit une augmentation du nombre des transcrits de *c-myc* dans les cellules (Dai *et al.*, 2007b). RPL11 régule les transcrits de *c-myc* via la voie des microARN. RPL11 se fixe au 3' UTR du transcrit *c-myc*, et recrute un complexe RISC chargé de *miR24* qui induit sa dégradation (Challagundla *et al.*, 2011).

D'autres protéines ribosomiques, comme RPL5, RPL23, et RPS7, co-purifient avec c-Myc sans que leur interaction directe et leur fonction dans le contrôle de l'activité de c-Myc n'ait été démontrées (Dai *et al.*, 2007a).

4.3.2. La voie p53

Le rôle du suppresseur de tumeurs p53 a été mis en évidence lors de l'étude du blocage du cycle cellulaire à la suite de lésions de l'ADN.

Dans les conditions normales, chez les mammifères, la quantité de protéine p53 libre dans la cellule est très faible, car p53 est séquestrée par la protéine MDM2, responsable de son ubiquitinylation. Cette modification entraîne la dégradation de p53 en la dirigeant vers le protéasome. En réponse à des lésions de l'ADN, ARF (*ADP ribosylation factor*) est synthétisée et séquestre MDM2 dans le nucléole (Lowe et Sherr, 2003). Ceci contribue indirectement à l'activation de p53 qui est libérée.

Un stress ribosomique ou nucléolaire (maturation anormale des ARNr par exemple) induit l'accumulation de p53. Un tel stress est provoqué par des agents chimiques ou génétiques qui perturbent la biogenèse des ribosomes (Figure 37). Entre autres événements, on peut citer les défauts d'assemblage des petites et grandes sous-unités ribosomiques, ainsi qu'un défaut dans le dosage de certaines protéines ribosomiques. En effet, des mutations des gènes *RPS6* (Fumagali *et al.*, 2009), *RPL29* et *RPL30* (Sun *et al.*, 2010) perturbent l'assemblage des ARNr 18S et 28S dans le ribosome (Hölzel *et al.*, 2010) ce qui conduit à l'activation de la voie p53 et au blocage du cycle cellulaire. En conditions de stress ribosomique, le taux de RPs libres augmente, plusieurs RPs comme RPL11 (Bhat *et al.*, 2004 ; Zhang *et al.*, 2003), RPL5 (Dai et Lu, 2004), RPL23 (Dai *et al.*, 2004 ; Jin *et al.*, 2004), RPL26 (Zhang *et al.*, 2010), RPS7 (Chen *et al.*, 2007 ; Zhu *et al.*, 2009) RPS27 (Xiong *et al.*, 2011) et RPS14 (Zhou *et al.*, 2012) s'associent à MDM2, ce qui conduit à inhiber l'ubiquitination et ainsi la dégradation de p53.

Pour conclure, RPL11 semble jouer un rôle central de biocapteur de l'activité de biogenèse des ribosomes. Chez l'homme, diverses mutations de gènes codant des RPs conduisent à des syndromes regroupés sous le nom de ribosomopathies (Fumagali *et al.*, 2011). Les symptômes de ces pathologies laissent suggérer une action tissu-spécifique. Cependant, les interacteurs protéiques tissus-spécifiques des RPs ne sont pas connus car la plupart des études mettant en évidence l'implication des protéines ribosomiques dans les voies p53 et Myc ont été réalisées en lignées cellulaires ou chez la levure.

4.3.3. Contrôle de la croissance au cours du cycle cellulaire

Lors de la division cellulaire, une grande quantité de composants est partagée entre les deux cellules filles. Puis, en phase G1 du cycle, les cellules grossissent jusqu'à atteindre une taille critique (mis en évidence chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et appelé *setpoint*) à partir de laquelle les cellules entrent en phase S (Hartwell *et al.*, 1974 ; Johnston *et al.*, 1977). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'inactivation de l'assemblage de la petite sous-unité ribosomique conduit à un blocage en phase G1 (Bernstein et Baserga, 2004). D'autres défauts du cycle cellulaire ont été observés lorsque la biogenèse des ribosomes est inhibée (Du et Stillman, 2002 ; Oeffinger et Tollervey, 2003; Jorgensen *et al.*, 2004 ; Saracino *et al.*, 2004). Dans des cellules murines, la déplétion de BOP1, qui est nécessaire pour l'assemblage du pré-ARNr de la grande sous-unité ribosomique, conduit également à un arrêt du cycle en phase G1 (Pestov *et al.*, 2001a, 2001b; Strezoska *et al.*, 2002).

Le volume cellulaire, le contenu protéique des cellules, le taux de synthèse protéique ou le taux de synthèse des ribosomes sont autant de facteurs qui pourraient représenter des "senseurs" de la taille critique de la cellule (*setpoint*) (Jorgensen et Tyers, 2004). Le biocapteur du *setpoint* n'est pas connu à ce jour mais plusieurs facteurs dont les mutants présentent des tailles cellulaires anormales ont été proposés : SFP1, facteur de transcription des ARNr, CDH1, activateur du complexe APC/C, ou WHI5, répresseur transcriptionnel (Jorgensen *et al.*, 2002; pour revue, voir Cook et Tyers, 2007).

De façon intéressante, nous avons montré au laboratoire que l'inactivation du gène codant la Cycline G chez la drosophile conduit à une augmentation de la taille des cellules, alors qu'inversement, sa surexpression conduit à une diminution de celle-ci, suggérant que cette cycline est impliquée dans le contrôle de la croissance cellulaire (Faradji *et al.*, 2011; Debat *et al.*, 2011). La surexpression du gène *Cycline G* rallonge la phase G1 du cycle, permettant d'émettre l'hypothèse que Cycline G participerait au *setpoint*. De façon intéressante, cette cycline possède également une activité transcriptionnelle, interagit avec plusieurs ETP (Corto, ASX) et se fixe sur la chromatine où elle co-localise en de multiples sites avec Corto et ASX (Salvaing *et al.*, 2008 et résultats non publiés). Ainsi, Cycline G et ces ETP pourraient être impliqués dans le contrôle du *setpoint*.

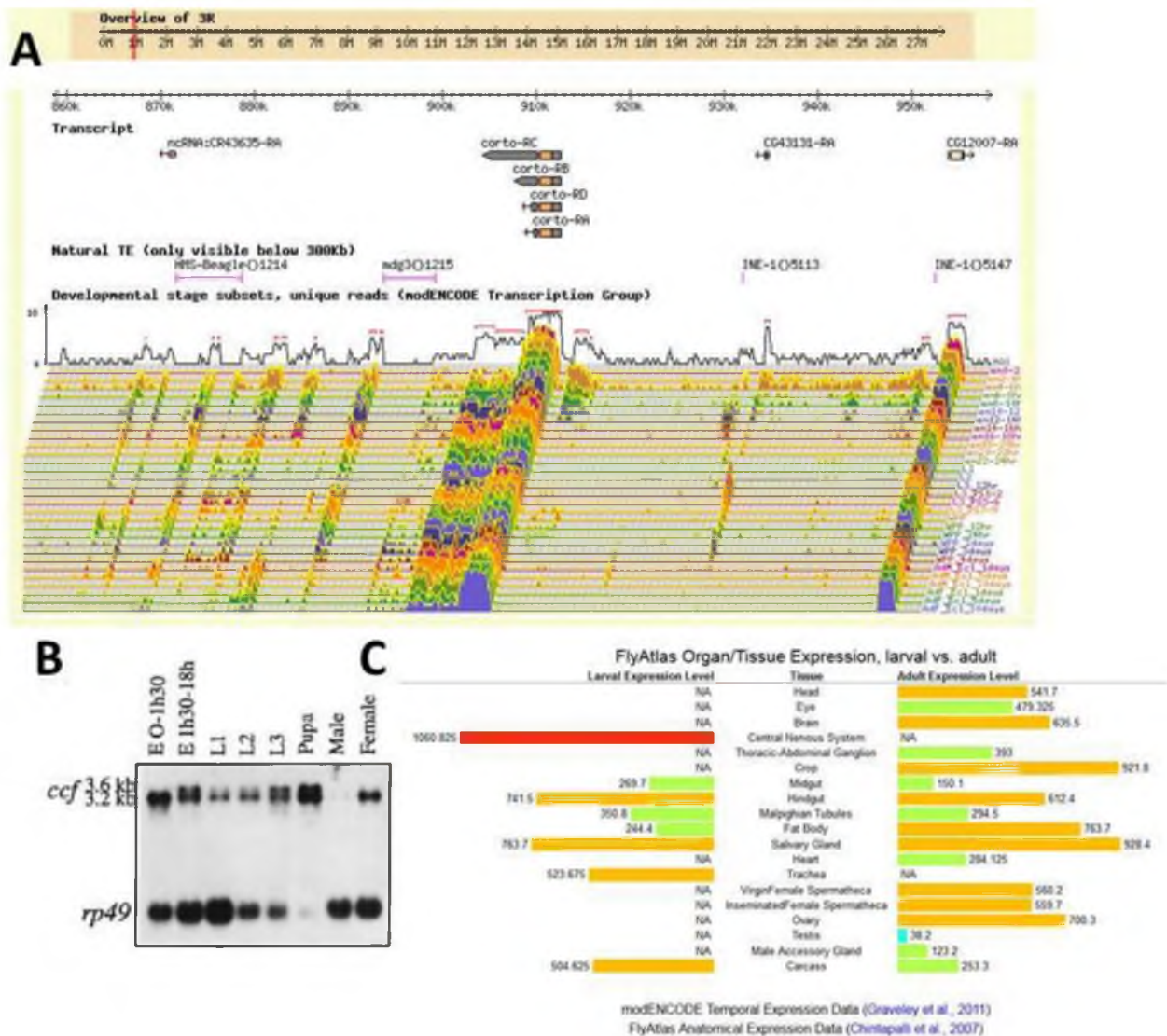


Figure 38 : Région chromosomique du gène *corto*

A Panneau du haut : Région 3R:858497-958496, comprenant les annotations de transcrits où la partie codante est en orange et les parties 5' et 3' UTR en gris, ainsi que les transposons naturels en rose. (d'après Flybase <http://flybase.org>). Panneau du bas : profils d'expression de la même région chromosomique ne montrant que les lectures uniques (issues du séquençage, en position unique dans le génome). Ainsi l'expression des transposons n'est pas indiquée, ceux-ci étant pour la plupart des éléments présents en plusieurs copies dans le génome. **B** Détection par Northern blot des transcrits du gène *corto* à différents stades du développement de la drosophile : embryons de 0-1h30 (présence de l'ARN maternel), embryons de 1h30-18h (ARN maternel et zygotique), et dans des banques de cDNA publiées (Brown and Kafatos, 1988). Adapté de Kodjabachian *et al.*, 1998. **C** Comparaison de l'expression de *corto* dans différents tissus de larve de troisième stade et adulte (Flybase : <http://flybase.org/reports/FBgn0010313.html>)

5 Corto, une protéine à chromodomaine atypique

Le gène *corto* a été mis en évidence dans une lignée "*enhancer-trap*" provenant du crible mené par Christiane Nüsslein-Volhard et Eric F. Wieschaus (prix Nobel de Physiologie et Médecine, 1995) pour identifier des gènes du développement chez la drosophile. Recensé à la fois sous le nom de *corto* et de *ccf* pour *centrosomal and chromosomal factor* (Kodjabachian *et al.*, 1998 et thèse), nous avons conservé le nom de *corto*, la localisation centrosomale de la protéine n'ayant pu être confirmée par la suite.

Comme discuté dans le Tableau 3 (Voir INTRODUCTION 2.5.3.2, Eisenberg, 2012), la protéine Corto présente un domaine structurel qui rappelle les chromodomaines, ou domaines d'adressage à la chromatine. Cependant, la similarité de séquence entre ce domaine et les chromodomaines reconnus comme tels est limitée. De plus, la structure de ce domaine n'a pas été caractérisée précisément (par exemple par cristallographie). Ainsi, la fonctionnalité de ce domaine n'était pas connue lorsque j'ai commencé ce travail.

5.1. Le gène *corto*

Le gène *corto* couvre une région de 3,6 kb sur le chromosome 3R. Il est isolé au sein d'une région chromosomique de 53kb (Figure 38A). Une unique CDS (*coding sequence*) de 1650 bp code une protéine de 550 acides aminés. Deux transcrits de 3,2 et 3,6 kb sont détectés par Northern blot (Figure 38B), correspondant à deux sites d'initiation de la transcription différents, le premier maternel, le second zygotique. L'expression de ces deux transcrits est forte durant l'embryogenèse et maximale aux stades larvaire tardif et pupal. Il faut noter que le transcrit maternel, exprimé dans les embryons précoces est encore détectable au stade pupal.

Des études plus récentes de l'expression de *corto* dans différents organes chez la larve de 3^{ème} stade et chez l'adulte (RNAseq) confirment la présence ubiquitaire des transcrits à l'exception des testicules (ModENCODE, Figure 38C). L'expression dans les ovaires des femelles adultes est en accord avec la grande quantité de dépôt maternel d'ARN dans les embryons.

5.1.1. Mutants de *corto*

L'élément *P* (*P*{*LacZ*, *ry*}) de la souche "*enhancer-trap*" A46 est situé dans le promoteur de *corto* une vingtaine de paires de bases en amont du TSS. L'excision imprécise de A46 a entraîné une délétion de 16kb en aval du promoteur de *corto*, créant ainsi un allèle nul nommé *corto*⁴²⁰ (Kodjabachian *et al.*, 1998). L'allèle *corto*^{L1} a été obtenu par mutagenèse à l'EMS (Ethane Methyl Sulfoxide) (Marenda *et al.*, 2004).

Jusqu'à présent, ces deux allèles mutants n'avaient pas été décrits de façon précise moléculairement. La caractérisation moléculaire par RNAseq des allèles *corto*⁴²⁰ et *corto*^{L1} est présentée dans les données complémentaires de la partie résultats. Ces allèles sont des pertes de fonction (LOF), *corto*⁴²⁰ est un allèle nul alors que *corto*^{L1} est probablement un allèle amorphe.

Un autre allèle mutant, *corto*⁰⁷¹²⁸, caractérisé récemment, correspond à l'insertion d'un élément *P* dans le promoteur du gène 0,5 Kb en amont de la partie 5'UTR (Smulders-Srinivasan *et al.*, 2010). *corto*⁰⁷¹²⁸ est décrit comme un allèle nul (Mouchel-Viehl *et al.*, 2011).

Enfin, la déficience *Df(3R)6-7* est une délétion d'une région entière du chromosome 3R couvrant les positions cytologiques 82D à 82F et contenant une cinquantaine de gènes. Elle a été obtenue par mutagenèse aux rayons gamma (<http://flybase.org>).

5.1.2. Surexpression de *corto*

La séquence d'ADNc de *corto* a été clonée par Kodjabachian et coll. en 1998, puis insérée dans un vecteur de transgénèse sous le contrôle de séquences UAS permettant de l'exprimer en présence de Gal4 (*P*[UAS-*corto*]).

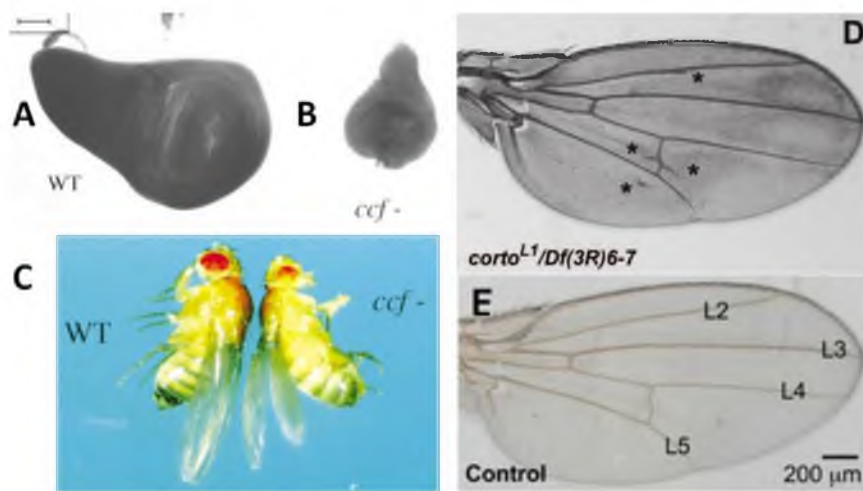


Figure 39 : Phénotypes LOF de *corto*.

A Disque imaginal d'aile de 3^{ème} stade larvaire sauvage. **B** Disque imaginal d'aile de 3^{ème} stade larvaire d'un mutant *corto*. Les disques sont présentés au même grossissement. **C** Mouche adulte *corto*⁴²⁰/*Df(3R)6-7* comparée à une mouche sauvage. Adapté de Kodjabachian *et al.*, 1998. **D** Aile de mutant *corto* (*corto*^{L1}/*Df(3R)6-7*) présentant des veines ectopiques (astérisques), à comparer avec **E** aile de drosophile sauvage. Adapté de Mouchel-Viehl *et al.*, 2011.

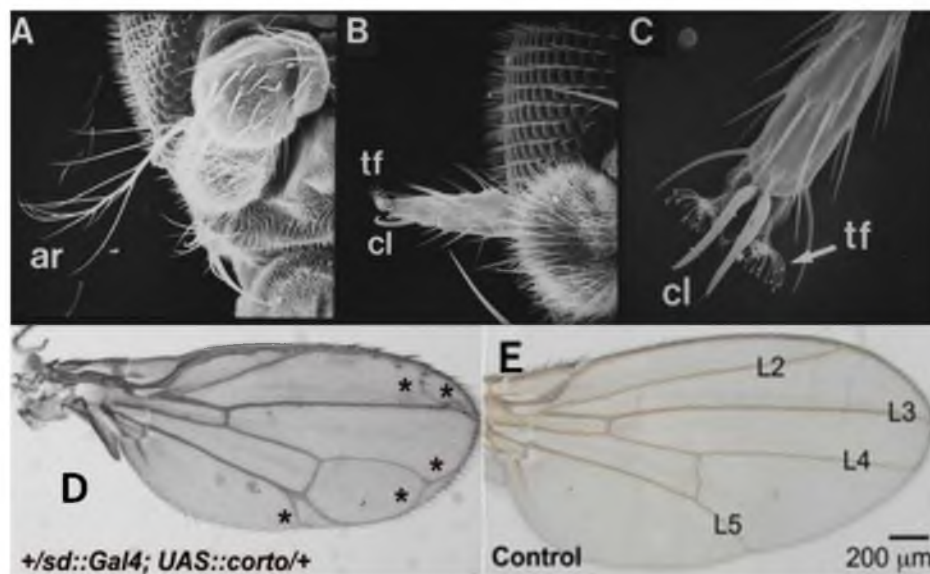


Figure 40 : Phénotypes GOF de *corto*.

A Arista sauvage (ar), **B** Arista de mouches GOF *corto* (*ptc-Gal4* > *UAS-corto*) transformé en segment tarsique de patte (phénotype *aristapedia*) où l'on distingue les structures distales « touffe » et griffe, notées tf (*tuff*) et cl (*claw*), grossies en **C**. Adapté de Kodjabachian *et al.*, 1998. **D** Aile de mouches GOF *corto* (*sd-Gal4* > *UAS-corto*) présentant des veines ectopiques (astérisques), **E** Aile de drosophile sauvage. Adapté de Mouchel-Viehl *et al.*, 2011.

5.1.3. Phénotypes des mutants

La perte de *corto* conduit à 90% de mortalité, s'étendant du premier stade larvaire au stade pupal tardif. En comparaison avec les hétérozygotes (*corto*^{420/+}), les individus homozygotes *corto*⁴²⁰ se développent très lentement, sont peu actifs durant les stades larvaires et présentent des disques imaginaux de taille très réduite (Figure 39A et B). Les survivants (≈10%) présentent des défauts des soies, comme la perte ou la duplication des macrochètes thoraciques, ainsi que des veines ectopiques sur les ailes (Figure 39 D et E). 50% des mâles survivants présentent un peigne sexuel ectopique sur le 2^{ème} segment du tarse de la première paire de pattes (Kodjabachian *et al.*, 1998). Les clones germinaux *corto*⁴²⁰ (obtenus par recombinaison en utilisant le système FRT/FLP) meurent dès la fin du 1^{er} stade larvaire, soulignant l'importance de la contribution maternelle de *corto* (Lopez *et al.*, 2001).

La surexpression ubiquitaire de *corto* (*P[UAS-corto]*) sous le contrôle de divers pilotes Gal4: *daughterless* (*da-Gal4*), *69B* (*69B-Gal4*), *tubulin* (*tub-Gal4*) et *Actin5C* (*Act5C-Gal4*) est létale. Sous le contrôle du pilote *scalloped* (*sd-Gal4*) (pilote exprimé pendant le développement dans les disques imaginaux, le cerveau, l'intestin et les trachées), la surexpression de *corto* induit la formation de veines ectopiques dans les ailes (Figure 40D et E). La surexpression de *corto* induite par le pilote *hsp70* (*hs-Gal4*) a été réalisée à différents moments du développement larvaire : 46% des individus présentent des veines ectopiques lorsque le choc thermique est réalisé au 3^{ème} stade larvaire entre 96 et 120 heures après ponte (contre 18% en absence de choc thermique.). L'étude de l'interaction entre *corto* et différents acteurs de la détermination des tissus de l'aile suggère qu'il serait antagoniste à *rolled* (qui code la MAP kinase ERK) dans la formation des tissus de l'aile. La dérégulation de *corto* pourrait entraîner celle de certains gènes de pro-veine, comme *rhomboid*, et de pro-interveine, comme *blistered*, qui code l'homologue du SRF (*Serum Responsive Factor*) (Mouchel-Vielh *et al.*, 2011). La surexpression de *corto* à la frontière antéro-postérieure des disques imaginaux (en utilisant le pilote *patched-Gal4*) induit peu de mortalité au cours du développement. 100% des individus présentent un phénotype *aristapedia*, (Figure 40A, B C) correspondant à la transformation partielle de l'arista en patte, des transformations partielles des balanciers en aile (transformations homéotiques), des *rotated genitalia* et la perte de soies scutellaires (Kodjabachian *et al.*, 1998; Lopez *et al.*, 2001).

5.1.4. *corto*, un nouvel Enhancer de Trithorax et Polycomb (ETP)

Comme nous l'avons souligné, les mutants *corto* présentent une transformation du second article de tarse en premier article de tarse dans la 1^{ère} paire de pattes (phénotype dit homéotique bien qu'il corresponde à une transformation selon l'axe proximo-distal de la patte et non selon l'axe antéro-postérieur du corps) (Kodjabachian *et al.*, 1998 ; Lopez *et al.*, 2001). Ces phénotypes rappellent ceux de certains mutants de gènes du groupe Polycomb comme *Pc* (*Polycomb*), *ph* (*polyhomeotic*), *E(z)* (*Enhancer of zeste*) et *mx* (*multi sex comb*).

Par ailleurs, environ 10% des individus *corto*^{420/+} présentent des défauts des macrochètes thoraciques (duplication ou disparition de l'organe complet ou juste de la soie) et des veines ectopiques sur les ailes. Ces phénotypes sont également observés chez les mutants *trx*, *brm*, *ash2*, *kis* et *osa* (Adamson et shearn, 1996). Les mutants *corto* présentent donc également des phénotypes identiques à ceux de mutants de gènes *trxG* (Lopez *et al.*, 2001).

L'analyse des interactions génétiques entre *corto* et les gènes PcG et *trxG* montre une augmentation de la pénétrance des phénotypes PcG chez les individus hétéroalléliques *corto*⁻ et PcG⁻ ainsi qu'une augmentation de la pénétrance des phénotypes *trxG* chez les individus hétéroalléliques *corto*⁻ et *trxG*⁻. Les gènes PcG et *trxG* étant généralement antagonistes (les mutants d'un groupe suppriment les phénotypes mutants de l'autre groupe), ces résultats étaient inattendus. Ces résultats placent le gène *corto* dans la catégorie des ETP.

5.2. La protéine Corto

La protéine Corto, d'une taille de 68 kDa, a une composition assez particulière : les sérines, glutamines et alanines représentent plus de 50% des acides aminés (contre 20% pour la moyenne des protéines de drosophile) et la glutamine représente à elle seule environ 25% des acides aminés (Kodjabachian *et al.*, 1998). Corto présente de nombreux sites potentiels de phosphorylation pour différentes kinases.

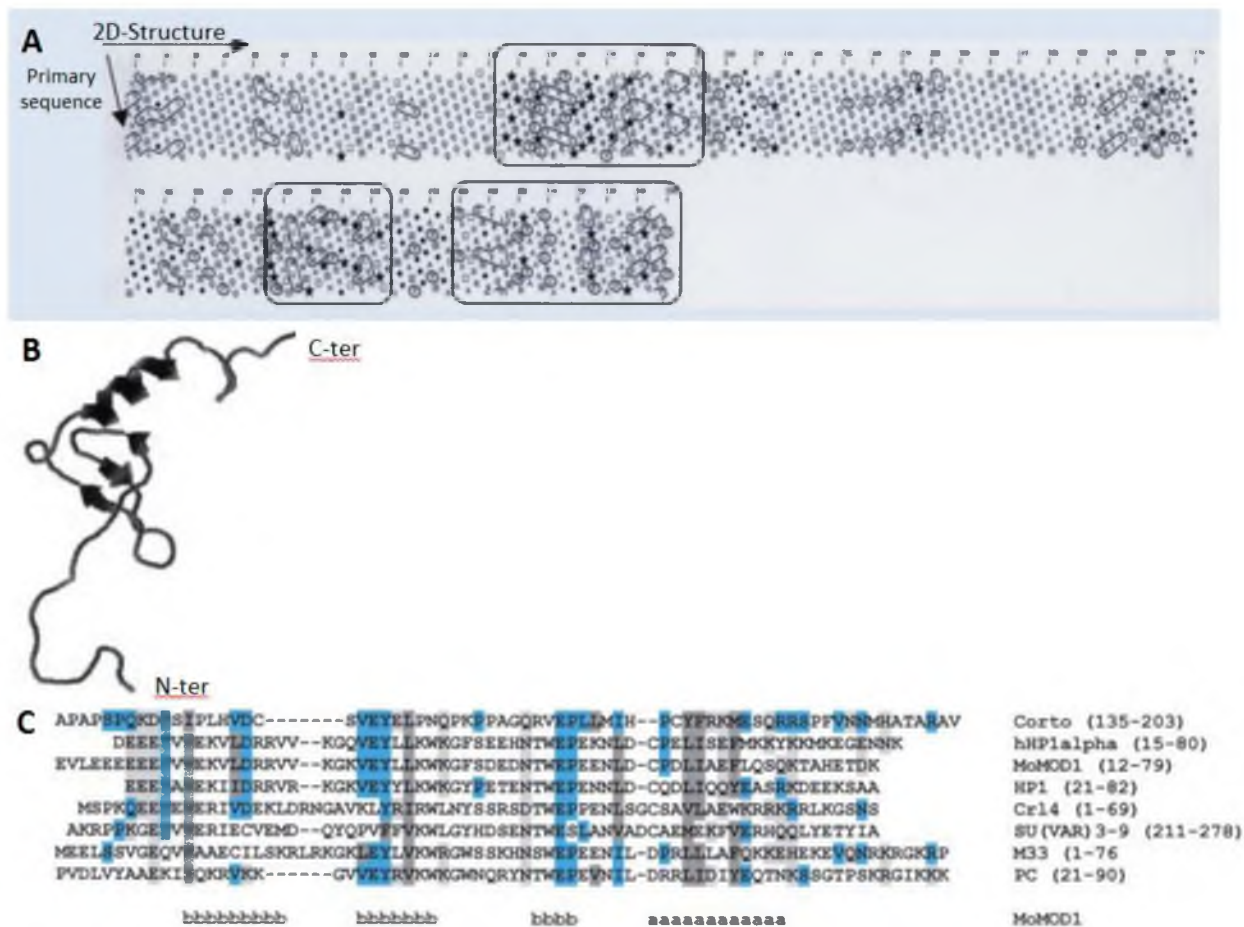


Figure 41 : Structure de la protéine Corto

A Représentation des groupes de résidus hydrophobes de la protéine Corto (P41046). Chaque point représente un acide aminé. Les trois domaines globulaires localisés en positions 127–203, 418–455 et 480–550, sont encadrés. **B** Structure en trois dimensions du chromodomaine putatif de Corto obtenu avec le logiciel MODELLER en utilisant le chromodomaine MoMOD1 comme modèle. **C** Alignement du domaine globulaire N-terminal de Corto et des chromodomains de HP1 α humaine, *Mouse Modifier Protein 1* (MoMOD1), HP1 de *D.melanogaster*, Clr4 de *S.pombe*, SU(VAR) 3-9 de *D.melanogaster*, M33 de souris et PC de *D.melanogaster*. Les acides aminés identiques entre Corto et les autres chromodomains sont surlignés en bleu, ceux qui sont similaires sont surlignés en gris (résidus hydrophobes en gris foncés et résidus chargés en gris clair). La position des structures secondaires déterminées pour MoMOD1 sont indiquées sous l'alignement (a pour hélice α , b pour feuillet β) Tiré de Salvaing *et al.*, 2003.

Alors qu'aucune similarité entre la séquence primaire de Corto et d'autres protéines n'avait été révélée, l'étude de sa structure secondaire par *Hydrophobic Cluster Analysis* (Figure 41A) a montré l'existence de trois domaines globulaires.

Les deux domaines C-terminaux ne présentent pas de similarités avec des domaines conservés décrits, alors que le domaine N-terminal (acides aminés 127-203) présente des similarités avec le chromodomaine de MoMOD1 (*Mouse Modifier Protein 1*). L'alignement avec la séquence primaire de différents chromodomains et la représentation de la structure en trois dimensions du domaine N-terminal de Corto suggèrent que ce domaine est un chromodomaine composé de trois feuillets β suivi d'une hélice α (Salvaing *et al.*, 2003) (Figure 41B et C) (pour revue, voir Yap et Zhou, 2011).

Des sous-parties de *corto* ont été clonées afin d'étudier l'implication de ces différents domaines lors d'analyses d'interactions protéiques (GST pull/down, crible double-hybride, co-immunoprécipitations) (Salvaing *et al.*, 2003, 2006, 2008) (Figure 42). Ces analyses ont permis de mettre en évidence (1) une dimérisation de Corto *via* son chromodomaine, (2) l'interaction directe du chromodomaine de Corto avec les ETP GAF et DSP1 eux-mêmes impliqués dans le recrutement à la chromatine des complexes TrxG et PcG (Horard *et al.*, 2000; Dejardin *et al.*, 2005), (3) l'interaction directe Corto avec les protéines PcG E(Z), ESC, PH, SCM (ce qui laisse envisager une interaction possible entre Corto et les complexes PcG PRC2 et PRC1), et (4) plus récemment, l'interaction de Corto avec une cycline atypique, Cycline G (Salvaing *et al.*, 2003, 2006 et 2008).

5.3. Corto, un régulateur transcriptionnel

Corto est impliqué dans la régulation de l'expression de certains gènes homéotiques. Les interactions génétiques entre *corto* et *dsp1* suggèrent leur implication dans l'activation du gène homéotique *Sex comb reduced* (*Scr*) dans le disque imaginal de patte T1 et leur participation à sa répression dans les disques T2 et T3. L'immunoprécipitation de la chromatine fixée à la formaldéhyde (XChIP) par un anticorps anti-Corto montre un enrichissement de la protéine sur le PRE/TRE du gène *Scr* dans les cellules S2 et dans les embryons.

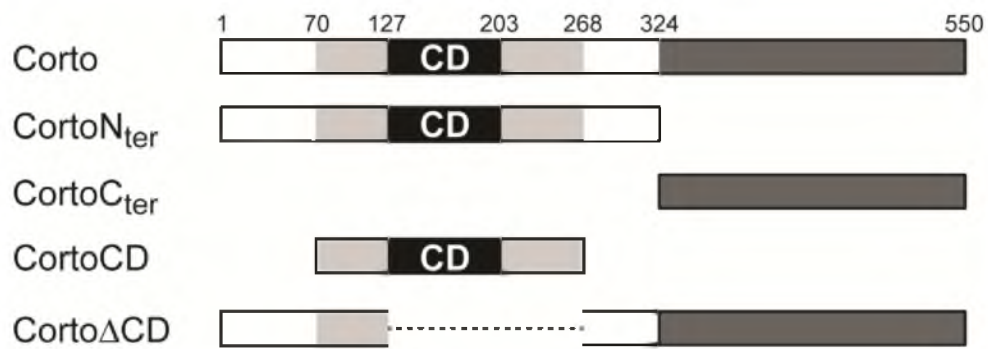


Figure 42 : Représentation schématique des constructions Corto.

En haut sont notés les acides aminés inclus dans les différentes constructions ; le chromodomaine est représenté en noir.

DSP1 fixe ce même PRE/TRE mais uniquement dans les cellules S2, où le gène *Scr* est exprimé (Salvaing *et al.*, 2006). Il est donc envisageable qu'en l'absence de fixation de DSP1 sur le PRE/TRE de *Scr*, Corto recrute les protéines PcG, maintenant ainsi la répression de *Scr*. Lorsque Corto et DSP1 sont présents simultanément sur le PRE/TRE, le recrutement des complexes PcG serait inhibé et celui des complexes TrxG serait favorisé, conduisant à l'expression de *Scr*.

Ainsi, ces données suggèrent que des combinaisons différentes d'ETP pourraient orienter le recrutement de complexes PcG *versus* TrxG sur les PRE/TRE (Salvaing, 2006).

Corto est également impliquée dans la régulation du gène *Abd-B* et se fixe sur le promoteur et le PRE/TRE *iab-7* d'*Abd-B* dans l'embryon (Salvaing *et al.*, 2008a et b).

Enfin, l'existence de très nombreux autres sites de fixation de Corto sur les chromosomes polytènes, ainsi que les phénotypes non-homéotiques de *corto*, suggèrent que cette protéine est impliquée dans la régulation de nombreux autres gènes.

Au cours de ma thèse, je me suis attachée à caractériser les cibles transcriptionnelles ainsi que le chromodomaine atypique de Corto afin de comprendre comment cette protéine interagit avec la chromatine et comment elle induit le recrutement d'autres protéines, comme les complexes PcG ou TrxG.

Présentation du projet de thèse

La protéine Corto participe à la régulation transcriptionnelle des gènes Hox. Elle interagit avec différentes protéines des complexes Trithorax et Polycomb, ainsi qu'avec des ETP. La recherche de partenaires protéiques de Corto par un crible double hybride a mis en évidence son interaction avec plusieurs protéines, notamment Cycline G, la protéine d'échaffaudage MP1, le facteur d'élongation de la transcription ElonginC, et la protéine ribosomique Rp40.

L'interaction directe de Corto avec certains de ces ligands a été établie. Cependant, aucune interaction avec des histones susceptibles d'être méthylées, comme c'est le cas des autres chromodomaines, n'a été détectée.

L'objectif de ma thèse a été la caractérisation du chromodomaine de Corto et de son/ses ligand(s) spécifique(s), ainsi que l'étude de leur implication dans la régulation de la transcription.

II- RESULTATS

RESUME DE L'ARTICLE

Les chromodomaines sont des domaines conservés de nombreux régulateurs de la structure chromatinienne. La plupart d'entre eux reconnaît des histones méthylées. Nous avons étudié le rôle du chromodomaine de Corto. Cette protéine, Enhancer de Trithorax et Polycomb (ETP), est impliquée aussi bien dans la répression transcriptionnelle que dans l'activation transcriptionnelle. La surexpression du chromodomaine de Corto (CortoCD) dans une lignée de drosophiles transgéniques montre que ce domaine est critique pour la fonction de Corto, et qu'il se comporte comme un module d'adressage à la chromatine. Une étude par spectrométrie de masse des protéines immunoprécipités par CortoCD (peptide pull-down) à partir d'extraits nucléaires d'embryons de drosophile, révèle que les ligands correspondent à des RPs nucléaires (RPs) dont RPL12. Une mutagenèse dirigée des résidus potentiellement méthylés a montré l'importance de la lysine 3 de RPL12 dans la liaison avec CortoCD. Comme cela a été démontré par des analyses d'interaction protéique en temps réel, CortoCD se fixe à RPL12 tri-méthylée sur la lysine 3 (RPL12K3me3) de façon très spécifique. La co-localisation sur chromosomes polytènes de Corto et de RPL12 avec des marques épigénétiques activatrices suggère que ces protéines seraient impliquées dans la régulation de la transcription des gènes situés dans des régions de chromatine ouverte. De plus, nos résultats suggèrent que des complexes pseudo-ribosomiques composés de plusieurs RPs participeraient à la régulation de l'expression de gènes en collaboration avec des régulateurs de la chromatine. Des analyses par RNAseq du transcriptome des disques imaginaux d'aile de drosophile surexprimant soit CortoCD, soit RPL12, montrent que les deux protéines dérégulent majoritairement les mêmes gènes. De façon intéressante, ces cibles communes sont enrichies en gènes de RPs, suggérant que Corto et RPL12 seraient impliquées dans la coordination dynamique de la biogenèse des ribosomes.

ARTICLE

New partners in regulation of gene expression: the Enhancer of Trithorax and Polycomb Corto chromodomain interacts with methylated RPL12.

Anne Coléno-Costes, Suk Min Jang, Augustin de Vanssay, Julien Rougeot, Tahar Bouceba, Neel B. Randsholt, Stéphane Le Crom⁵, Emmanuèle Mouchel-Vielh, Sébastien Bloyer,[†] and Frédérique Peronnet,[†].

INTRODUCTION

Chromatin structure strongly impacts on regulation of gene expression. Indeed, post-translational histone modifications (methylations, acetylations, phosphorylations *etc...*), called epigenetic marks, are recognized by protein complexes that shape chromatin (reviewed in Bannister and Kouzarides, 2011). A number of protein domains specifically interact with these modifications, thus inducing recruitment of chromatin remodelling or transcriptional complexes. Bromodomains recognize acetylated histones (reviewed in Zeng and Zhou, 2002) whereas 14-3-3 domains recognize phosphorylated histones (reviewed in Winter *et al.*, 2008). Methylated histones are recognized by chromodomains (chromatin organization modifier) (Paro and Hogness, 1991), which therefore belong to the Royal family of domains, known for their methylated lysine or arginine binding activity (reviewed in Yap and Zhou, 2011). Chromodomains share a common structure encompassing a folded three-stranded anti-parallel β -sheet supported by an α -helix that runs across the sheet. This structure contains two to four well-conserved aromatic residues that form a cage around the methylated ligand (Ball *et al.*, 1997; Yap and Zhou, 2011).

Chromodomains were first identified in Polycomb (PC) and Heterochromatin Protein 1 (HP1) (Paro and Hogness, 1991). They are found in many other chromatin-associated proteins that belong to three classes according to their global structure: (1) PC family proteins harbor a single N-terminal chromodomain, (2) HP1 family proteins have an N-terminal chromodomain followed by a region termed a chromoshadow domain, and (3) CHD (Chromodomain/Helicase/DNA-binding domain) family proteins present two tandem chromodomains (reviewed in Yap and Zhou, 2011). Most chromodomains specifically recognize particular methylated residues on histones. For instance, the chromodomain of PC, which is a subunit of the PRC1 complex (Polycomb Responsive Complex 1), binds specifically H3K27me3 (Min *et al.*, 2003; Bernstein *et al.*, 2006).

Once recruited, PRC1 prevents RNA Polymerase II recruitment or transcriptional elongation and therefore mediates gene silencing (reviewed in Müller and Verrijzer, 2009). The chromodomain of HP1 binds H3K9me2 and H3K9me3, which are epigenetic marks characteristic of heterochromatin, and thus participates in heterochromatin shaping (Bannister *et al.*, 2001; Lachner *et al.*, 2001). Very few cases of non-histone chromodomain substrates are known (Huang and Berger, 2008). For example, the HP1 chromodomain also recognizes an autocatalytically methylated residue of the G9a histone H3 methyl-transferase (Sampath *et al.*, 2007).

Nucleic acid binding is another typical attribute of chromodomains, although the weak *in vitro* DNA-binding activity of HP1 or PC is not related to their chromodomains (Breiling *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2000). Indeed, both chromodomains of the CHD protein dMi-2 bind DNA (Bouazoune *et al.*, 2002). Several chromodomains bind RNA, notably non-coding RNA. The association of the mouse Polycomb protein CBX7 with the inactive X chromosome depends upon interaction of its chromodomain with RNA (Bernstein *et al.*, 2006). Moreover, the CBX7 chromodomain also participates in repression of the INK4b/ARF/INK4a locus by binding the ANRIL RNA, antisense to this locus (Yap *et al.*, 2010). Finally, MOF histone acetyl-transferase, involved in dosage compensation in *Drosophila*, binds the roX2 non-coding RNA via its chromodomain, this enabling recruitment of MOF to chromatin (Akhtar *et al.*, 2000). Binding to non-coding RNA might thus be essential to recruit some chromodomain proteins to chromatin.

The *Drosophila melanogaster corto* gene encodes an Enhancer of Trithorax and Polycomb (ETP), *i.e.* a Polycomb (PcG) and Trithorax (TrxG) complex co-factor involved in both silencing and activation of gene expression (Gildea *et al.*, 2000; Lopez *et al.*, 2001). Indeed, Corto participates in transcriptional regulation of several homeotic genes together with these complexes and other ETPs (Salvaing *et al.*, 2006; Salvaing *et al.*, 2008). Corto protein binds chromatin and contains in its N-terminal part a single structured domain identified by hydrophobic cluster analysis and structural comparison as a chromodomain (Salvaing *et al.*, 2003). Hence, Corto would be closer to CBX proteins of the PcG class (Yap and Zhou, 2011). However, its chromodomain is rather divergent, since only two aromatic residues are conserved among the four that make a cage around the methylated residue. How Corto anchors to chromatin and more specifically, whether the chromodomain addresses Corto to chromatin, is not known. Here, we address this question by expressing a tagged Corto chromodomain in flies or in S2 cells.

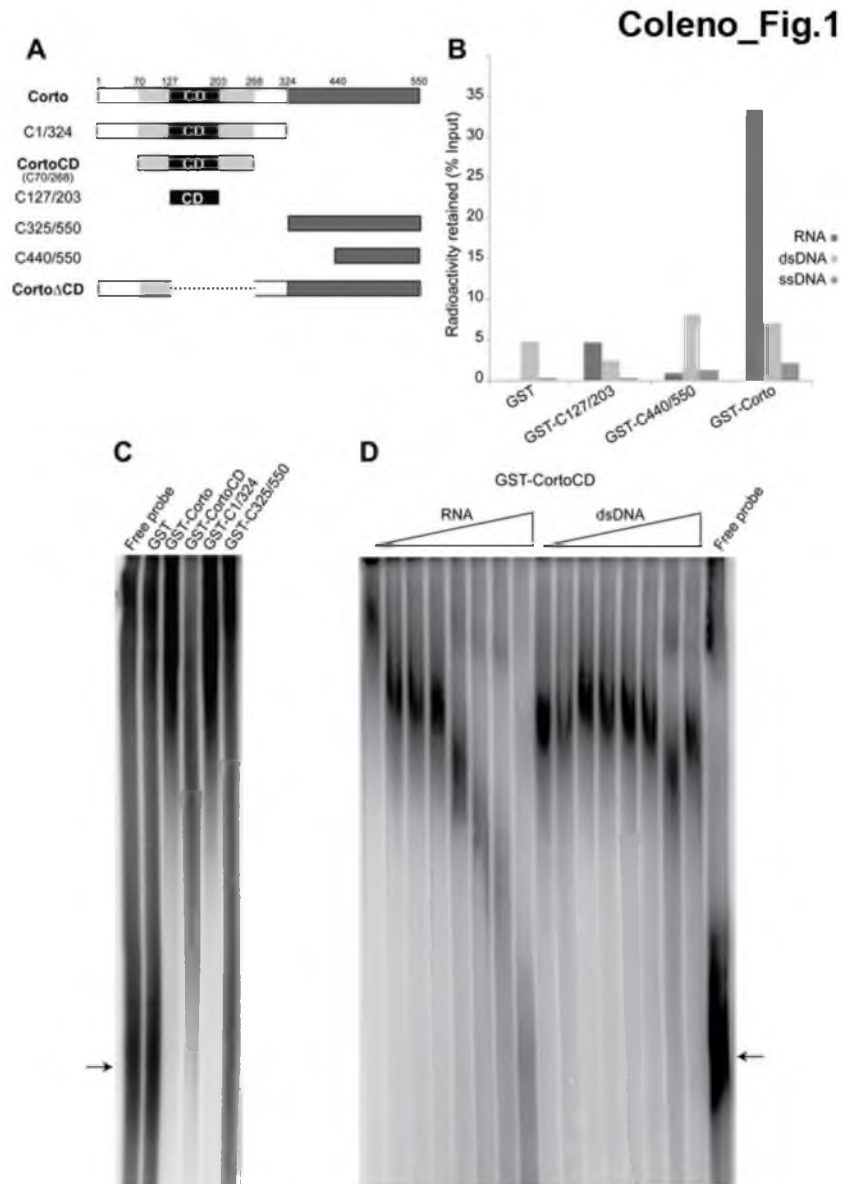


Figure 1: The Corto chromodomain binds RNA.

(A) Diagrams of Corto full-length and sub-parts used in this study. CD: chromodomain (amino-acids 127 to 203). Note that CortoCD (the enlarged chromodomain) covers amino-acids 70 to 268.

(B) Amounts of radioactive third instar larval RNA, double-stranded DNA (dsDNA) or single-stranded DNA (ssDNA) retained by GST, GST-C127/203, GST-C440/550 or GST-Corto as a percentage of total input radioactivity. RNAs were significantly retained by GST-Corto and to a lesser extent by GST-C127/203.

(C) EMSA using GST, GST-Corto, GST-CortoCD, GST-C1/324 and GST-C325/550, and a radioactive *AbdB* probe. Free radioactive probe is shown by an arrow. Note that the probe was retained by GST-Corto, GST-CortoCD and GST-C1/324.

(D) EMSA showing that the GST-CortoCD/probe complex competed with RNA but not with double-stranded DNA. Free radioactive probe is shown by an arrow.

We show that the Corto chromodomain binds RNA and is a functional chromatin-targeting module, thus presenting main characteristics of other chromodomains. However, by peptide pull-down and mass spectrometry, we find that the Corto chromodomain interacts with nuclear ribosomal proteins, and notably binds with high affinity RPL12 trimethylated on lysine 3 (RPL12K3me3).

Co-localization of Corto and RPL12 with active epigenetic marks on polytene chromosomes suggests that both proteins are involved in fine-tuning transcription of genes located in open chromatin. Lastly, investigation of Corto and RPL12 transcriptional targets by RNA-seq suggests that many are shared by both factors. Interestingly, these common targets are enriched in genes involved in ribosomal biogenesis.

RESULTS

The Corto chromodomain binds RNA

To analyze the affinity of Corto for nucleic acids, we checked its binding to radioactively labeled DNA or RNA extracted from *Drosophila* third instar larvae using GST pull-down. We examined GST, GST-Corto which is the full-length, 550 amino-acid protein, GST-C127/203 containing amino-acids 127 to 203 that correspond to the chromodomain *sensu stricto*, and GST-C440/550 containing the C-terminal end of Corto (Figure 1A); Salvaing *et al.*, 2003). Neither double-stranded nor single-stranded DNA were retained by the GST fusion proteins. However, RNAs were retained by GST-Corto and to a lesser extent by GST-C127/203, but not by GST-C440/550 (Figure 1B). We then performed EMSA using GST, GST-Corto, GST-C1/324 (the N-terminal half of the protein that contains the chromodomain), GST-C325/550 (the C-terminal half of the protein that contains the chromodomain) and GST-C70/268, an enlarged version of the chromodomain corresponding to amino-acids 70 to 268, and hereafter called CortoCD (Figure 1A).

Genotype	Number of fly observed	Lethality (%)	Duplicated macrochaetes (%)	Aristapedia (%)	Mean number of sex comb teeth (n=number of male first leg observed)	Rotated genitalia (%) (n=number of male observed)
<i>Act::Gal4>UAS::FH-cortoCD-31</i>	73	63.0	32.8	35.6	8.8 ± 0.8 (n=46)	nd
<i>Act::Gal4>UAS::FH-cortoCD-41</i>	143	79.0	30.0	34.3	9.2 ± 1.1 (n = 35)	nd
<i>Act::Gal4>UAS::FH-cortoCD-45</i>	67	76.0	31.3	43.3	8.6 ± 0.5 (n=10)	nd
<i>Act::Gal4/+</i>	164	22.5	3.6	0.6	10.8 ± 0.7 (n=41)	nd
<i>da::Gal4>UAS::FH-cortoCD-231</i>	93	91.0	9.7	38.7	8.8 ± 0.8 (n=54)	55.0 (n=82)
<i>da::Gal4>UAS::FH-cortoCD-41</i>	34	nd	8.8	67.6	8.7 ± 0.9 (n=30)	59.0 (n=27)
<i>da::Gal4>UAS::FH-cortoCD-45</i>	0	100.0	-	-	-	-
<i>da::Gal4/+</i>	202	19.0	2.0	0	11.2 ± 0.8 (n=80)	0

Table 1: Phenotype of flies overexpressing *cortoCD* under the control of ubiquitous Gal4 drivers.

Three different insertions of the *cortoCD* transgene (named 231, 41 and 45) were analysed.

nd: not determined.

Since Corto regulates expression of the homeotic gene *Abdominal B* (*AbdB*) and binds to its promoter (Salvaing *et al.*, 2008), we used a radioactive RNA probe covering the 5'-UTR of the *AbdB-m* transcript to check Corto binding. This probe was retained by GST-Corto, GST-CortoCD and GST-C1/324 but not by GST or GST-C325/550 (Figure 1C). Furthermore, RNA, but not DNA, competed the GST-CortoCD/probe complex (Figure 1D).

Similarly, the three fusion proteins containing the chromodomain, but neither GST nor GST-C325/550, retained an exogenous RNA probe corresponding to a *Wint* gene from Axolotl (*Awnt1*) (data not shown). Taken together, these data suggest that the Corto chromodomain binds RNA *in vitro* but without any sequence specificity.

The Corto chromodomain genetically reproduces full-length Corto function

To address the role of the Corto chromodomain *in vivo*, we used germline transformation and the binary *UAS/Gal4* system to construct transgenic flies expressing either full-length *corto*, *corto* Δ CD deleted of the chromodomain, or *corto*CD fused to a nuclear localization signal coding sequence to force its entry into nuclei. Whereas transgenic flies ubiquitously overexpressing *corto* deleted of its chromodomain [*Actin5C* (*Act::Gal4*>*UAS::FH-corto* Δ CD) or *daughterless* (*da::Gal4*>*UAS::FH-corto* Δ CD) drivers] were perfectly viable and fertile, overexpression of *corto* using the same drivers (*Act::Gal4*>*UAS::corto* or *da::Gal4*>*UAS::corto*) was 100% lethal. Overexpression of FLAG and HA double-tagged *corto*CD using again these drivers (*Act::Gal4*>*UAS::FH-corto*CD or *da::Gal4*>*UAS::FH-corto*CD) also induced high lethality at all developmental stages (from 63% to 100% depending on the transgenic line and the driver, Table 1). The escaper flies displayed rotated genitalia and duplicated macrochaetae as well as very penetrant homeotic phenotypes (Table 1, Figure 2).

Coleno_Fig.2

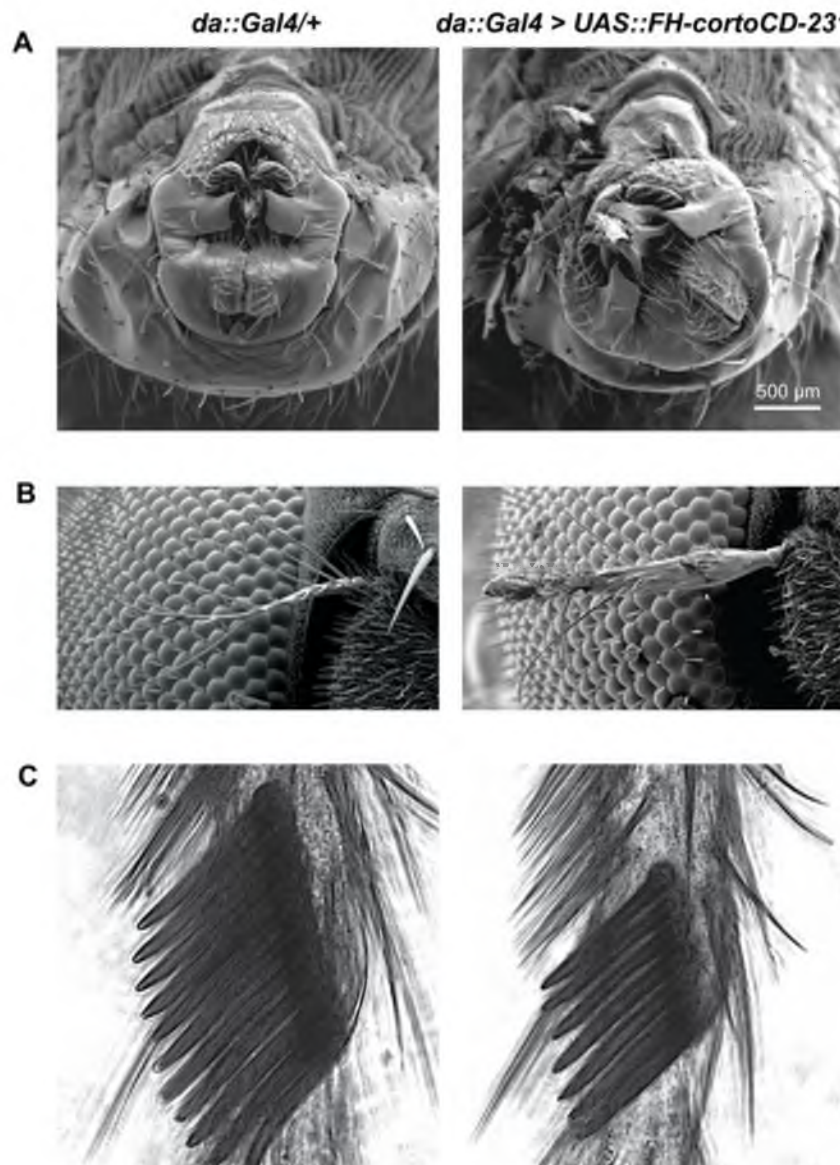


Figure 2: Phenotype of transgenic flies over-expressing *cortoCD*.

Scanning electron microscopy images of (A) genitalia, (B) arista and (C) sex combs. On the left, control *da::Gal4/+* flies. On the right, *da::Gal4 > UAS::FH-cortoCD-231* flies. Genitalia of males over-expressing *FH-cortoCD* present a phenotype called rotated genitalia. Arista of males over-expressing *FH-cortoCD* are transformed into leg, a phenotype called aristapedia. Finally, males over-expressing *FH-cortoCD* exhibit sex combs of reduced number of teeth, leading to a lower comb size.

Many flies presented a partial transformation of arista into leg, a homeotic phenotype called *Aristapedia*, that could reflect down-regulation of the *spineless-aristapedia* gene (Struhl, 1982). A similar phenotype is also observed when over-expressing full-length *corto* at the antero-posterior border of imaginal discs (*patched::Gal4>UAS::corto*) (Kodjabachian *et al.*, 1998).

Males over-expressing *cortoCD* also displayed smaller sex-combs, a phenotype opposed to that of *corto* mutant males that have ectopic sex combs (Kodjabachian *et al.*, 1998; Lopez *et al.*, 2001), and which could reflect reduced expression of the homeotic gene *Sex combs reduced (Scr)* (Pattatucci *et al.*, 1991). Taken together, these results suggest that the chromodomain is critical for Corto function.

The Corto chromodomain is a chromatin-targeting module

Corto binds polytene chromosomes of third instar larva salivary glands at many sites (Salvaing *et al.*, 2003). To test the role of Corto chromodomain in chromatin binding, we immunostained polytene chromosomes of larvae over-expressing *cortoCD* in salivary glands [*escargot* Gal4 driver, (*esg::Gal4>UAS::FH-cortoCD*)] with anti-FLAG antibodies. FH-CortoCD bound polytene chromosomes at many discrete sites, showing that the chromodomain is a genuine chromatin-targeting module (Figure 3A). Like endogenous Corto, FH-CortoCD preferentially bound DAPI interbands and puffs, *i.e.* regions corresponding to open or actively transcribed chromatin. Comparison of endogenous Corto binding in wild-type larvae and FH-CortoCD binding in *esg::Gal4>UAS::FH-cortoCD* larvae at the tip of chromosome 3L showed that these proteins shared most of their binding sites (Figure 3B).

These results indicate that FH-CortoCD mimics Corto binding on polytene chromosomes and that the Corto chromodomain is a true chromatin-addressing module.

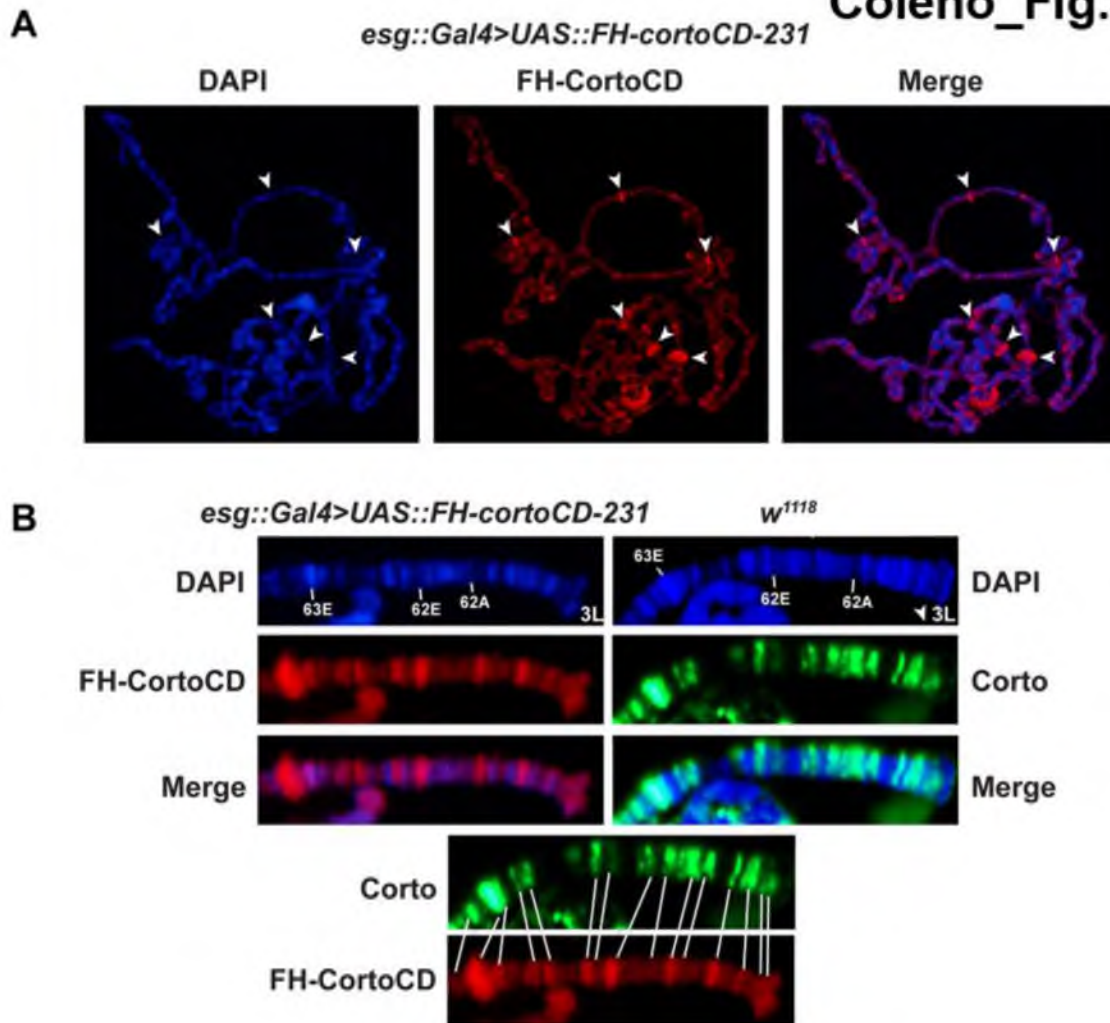


Figure 3: The Corto chromodomain is a chromatin-targeting module.

(A) Squash of salivary gland polytene chromosomes from an *esg::Gal4>UAS::FH-cortoCD-231* third instar larva. Anti-FLAG immunostaining shows that FH-CortoCD binds chromatin at many sites (left: DAPI, middle: anti-FLAG, right: merge). Arrowheads point to DAPI free Corto bands.

(B) Magnifications of the tip of polytene chromosome 3L (segments 61 to 63) from either an *esg::Gal4>UAS::FH-cortoCD-231* third instar larva immunostained with anti-FLAG antibody or a *w¹¹¹⁸* third instar larva immunostained with anti-Corto antibody (DAPI, immunostaining, merge). Bottom: conformity between endogenous Corto and FH-CortoCD binding sites.

The Corto chromodomain interacts with nuclear ribosomal proteins

These results prompted us to identify the anchor(s) of Corto chromodomain on chromatin. Binding of endogenous Corto to chromatin, as well as binding of FH-CortoCD, was resistant to RNase treatment, indicating that Corto binding does not depend on its interaction with RNA (data not shown). We next incubated GST-CortoCD or GST with nuclear extracts from embryos and resolved retained polypeptides by SDS-PAGE. Four bands between 30 and 15 kDa (P30, P21, P20 and P15) consistently appeared after incubation with GST-CortoCD, but were not seen after incubation with GST (Figure 4A). The content of the bands were identified by mass spectrometry. Surprisingly, all four contained ribosomal proteins: RPL7 for P30, RPS11 for P21, RPS10, RPL12 and RPL27 for P20, and RPS14 for P15 (Table 2).

Table 2: Mass spectrometry analysis of peptides specifically pulled down by Corto-CD.

The four bands (P30, P21, P20 and P15) were excised from the gel (see Figure 4) and analyzed by mass spectrometry.

Band	Protein	CG	MW (Da)	Score	Peptides	Coverage %	Sequences
P30	RpL7	CG4897-PA	29534	107	2	10	R.QRVPITDNFVIER.KR.IAEPYITWGYPNLK.S
P21	RpS11	CG8857	18101	38	2	9	K.QFGVNLNR.K R.DYLHFVR.K
P20	RpS10	CG14206-PC	17867	42	1	8	K.GDVGPGAGEVEFR.G
	RpL12	CG3195-PA	17585	56	2	14	K.IGPLGLSPK.K R.CVGGEVGATSSLAPK.I + carbamidomethyl(C)
	RpL27	CG4759-PA	15893	79	2	15	R.YTAHDISFEK.L K.SLNYNHLMPTR.Y + oxidation (M)
P15	RpS14	CG1524-PB	16255	82	3	17	K.EEVQVQLGPQVR.D R.IEDVTPIPSDSTR.R R.IEDVTPIPSDSTRR.K

Although ribosomal proteins might be contaminants, their consistent enrichment in peptide pull-down experiments performed with nuclear extracts prompted us to consider their binding to CortoCD.

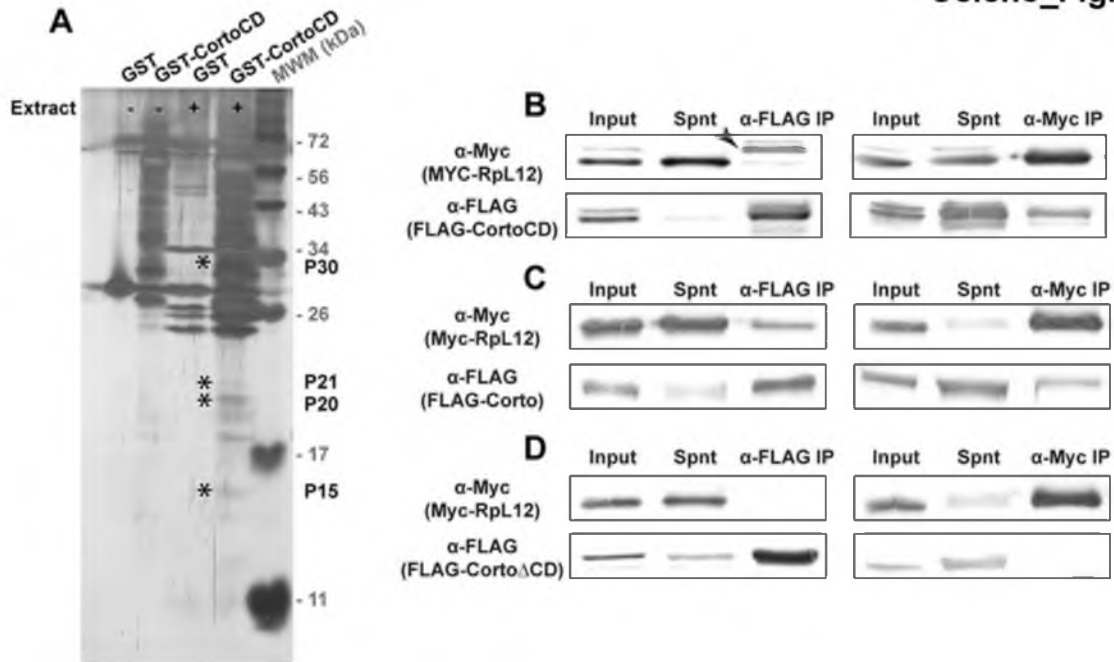


Figure 4: Corto interacts with nuclear ribosomal proteins.

(A) Silver stained polyacrylamide gel showing peptides pulled down by GST or GST-CortoCD from embryonic nuclear extracts. Four bands consistently appearing after incubation with GST-CortoCD are shown by asterisks (P30, P21, P20 and P15).

(B, C, D) Co-immunoprecipitation experiments. S2 cells were co-transfected with plasmids expressing FLAG-CortoCD, FLAG-Corto or FLAG-Corto Δ CD and Myc-RPL12. Immunoprecipitations were performed with either anti-FLAG (α -FLAG) or anti-Myc (α -Myc) and revealed with the same antibodies. Spnt: supernatant, IP: immunoprecipitation.

(B) FLAG-CortoCD co-immunoprecipitated Myc-RPL12 and conversely. Note that Myc-RPL12 co-immunoprecipitated with FLAG-CortoCD was enriched in the higher molecular weight forms (arrowhead).

(C) FLAG-Corto co-immunoprecipitated Myc-RPL12 and conversely.

(D) FLAG-Corto Δ CD did not co-immunoprecipitate with Myc-RPL12 and conversely.

Among ribosomal proteins pulled down by Corto chromodomain, only RPL12 is known to be methylated in several species (Porrás-Yakushi *et al.*, 2006; Polevoda and Sherman, 2007; Sadaie *et al.*, 2008). As many chromodomains recognize methylated lysines, we focused on the interaction between CortoCD and RPL12.

Corto interacts with RPL12

We generated vectors to produce FLAG-tagged Corto or Corto derivatives (CortoCD, Corto Δ CD) and Myc-tagged RPL12 in *Drosophila* S2 cells. Co-immunoprecipitations were performed on cell extracts from transfected cells, using either anti-FLAG or anti-Myc antibodies. Anti-FLAG co-immunoprecipitated Myc-RPL12 with FLAG-CortoCD and conversely, anti-Myc co-immunoprecipitated FLAG-CortoCD with Myc-RPL12 (Figure 4B). In a similar experiment using FLAG-tagged full-length Corto, co-immunoprecipitation was again observed in both directions (Figure 4C). However, no co-immunoprecipitation was observed between FLAG-tagged Corto Δ CD and Myc-tagged RPL12 (Figure 4D). These results demonstrated the interaction between RPL12 and full-length Corto and showed that Corto chromodomain was necessary and sufficient for this interaction.

Interestingly, FLAG-CortoCD mainly immunoprecipitated with an electrophoretically retarded form of RPL12, suggesting that CortoCD interacts with a post-translationally modified form of RPL12.

The Corto chromodomain interacts with RPL12 tri-methylated on lysine 3

Since chromodomains typically recognize methylated lysines, we asked whether Corto chromodomain could bind a methylated form of RPL12. *D. melanogaster* RPL12 was aligned with RPL12 from several species to identify conserved residues known to be methylated in some of them (Figure 5A).

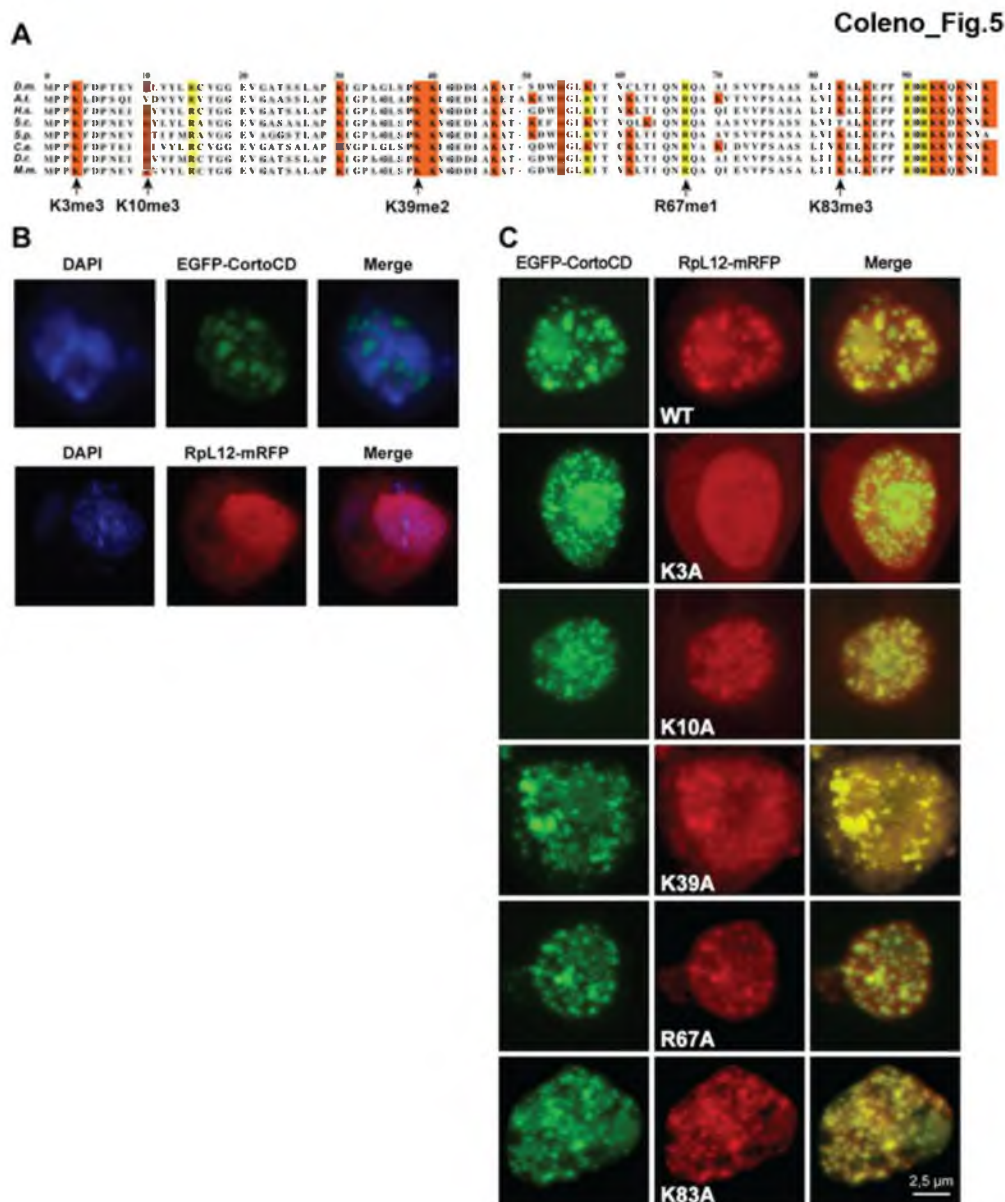


Figure 5: Lysine 3 of RPL12 is essential for interaction with Corto.

(A) PRALINE multiple sequence alignment of the 100 first residues of RPL12 from several species showing lysines (highlighted in orange) or arginines (highlighted in yellow) known to be methylated in several species. *Drosophila melanogaster* (*D.m.*; AE013599), *Arabidopsis thaliana* (*A.t.*; AAD18140), *Homo sapiens* (*H.s.*; NM_000976), *Saccharomyces cerevisiae* (*S.c.*; NP_010860), *Schizosaccharomyces pombe* (*S.p.*; NP_587897), *Caenorhabditis elegans* (*C.e.*; NP_502542), *Danio rerio* (*D.r.*; AAI65413) and *Mus musculus* (*M.m.*; CAM22324). Lysine 3 is trimethylated in *H.s.*, *S.c.*, *S.p.* and *A.t.*; lysine 10 was shown to be trimethylated in *S.c.*; lysine 39 was shown to be dimethylated in *H.s.*, *S.c.*, *S.p.* and *A.t.*; arginine 66 was shown to be δ -monomethylated in *S.c.* and *S.p.* (Porrás-Yakushi et al., 2006; Chern et al., 2002; Sadaie et al., 2008; Carroll et al., 2008). (B) *Drosophila* S2 cells expressing either EGFP-CortoCD (top) or RPL12-mRFP (bottom). CortoCD was provided with a nuclear localization signal to force its entry into the nucleus. Note its punctuated pattern in the nucleus. RPL12-mRFP was present in both nuclear and cytoplasmic compartments. (C) Simultaneous expression of EGFP-CortoCD and wild-type or mutant RPL12-mRFPs in *Drosophila* S2 cells. EGFP-CortoCD perfectly co-localized with RPL12-mRFP, as well as with RPL12K10A, RPL12K39A, RPL12R67A and RPL12K83A, within nuclei, exhibiting a punctuated pattern. Note that wild-type RPL12 and these mutant forms were no more detectable in the cytoplasm. RPL12K3A did not adopt a punctuated nuclear pattern and was still detectable in the cytoplasm. Scale bar: 2.5 μ m.

Lysines 3, 10, 39 and 82, as well as arginine 66 fulfilled these criteria. Using site-directed mutagenesis, we replaced these residues with alanine in RPL12 cDNA, thus generating a serie of mutants (RPL12K3A, RPL12K10A, RPL12K39A, RPL12R67A and RPL12K83A). These cDNAs were introduced into a plasmid allowing their expression as mRFP-tagged proteins in *Drosophila* S2 cells. Similarly, the *cortoCD* cDNA, supplied with a nuclear localization signal, was introduced into a plasmid allowing its expression as an EGFP-tagged protein in S2 cells. When expressed in these cells, EGFP-CortoCD artificially entered the nucleus where it exhibited a punctuated pattern, that recalled Polycomb bodies (Figure 5B) (Strutt and Paro, 1997). A similar nuclear pattern was observed after immunostaining of untransfected S2 cells with anti-Corto antibodies. However, these "Corto bodies" did not overlap with Polyhomeotic (PH) but with RNA Polymerase II suggesting that they were transcriptional factories rather than Polycomb bodies (Suppl. Figure 1).

RPL12-mRFP expressed alone was present in the cytoplasm and the nucleus, where it appeared slightly punctuated (Figure 5B). Interestingly, when co-expressed with EGFP-CortoCD, all the RPL12-mRFP localized in the nucleus (Figure 5C). Both proteins perfectly matched in a punctuated nuclear pattern, corroborating the interaction between CortoCD and RPL12. Similar experiments were carried out using the RPL12 mutant forms. Whereas RPL12K10A, RPL12K39A, RPL12R67A and RPL12K83A co-localized with CortoCD, RPL12K3A did not, strongly suggesting that Corto chromodomain interacts with lysine 3 of RPL12, and that this interaction is functional *in vivo* (Figure 5C).

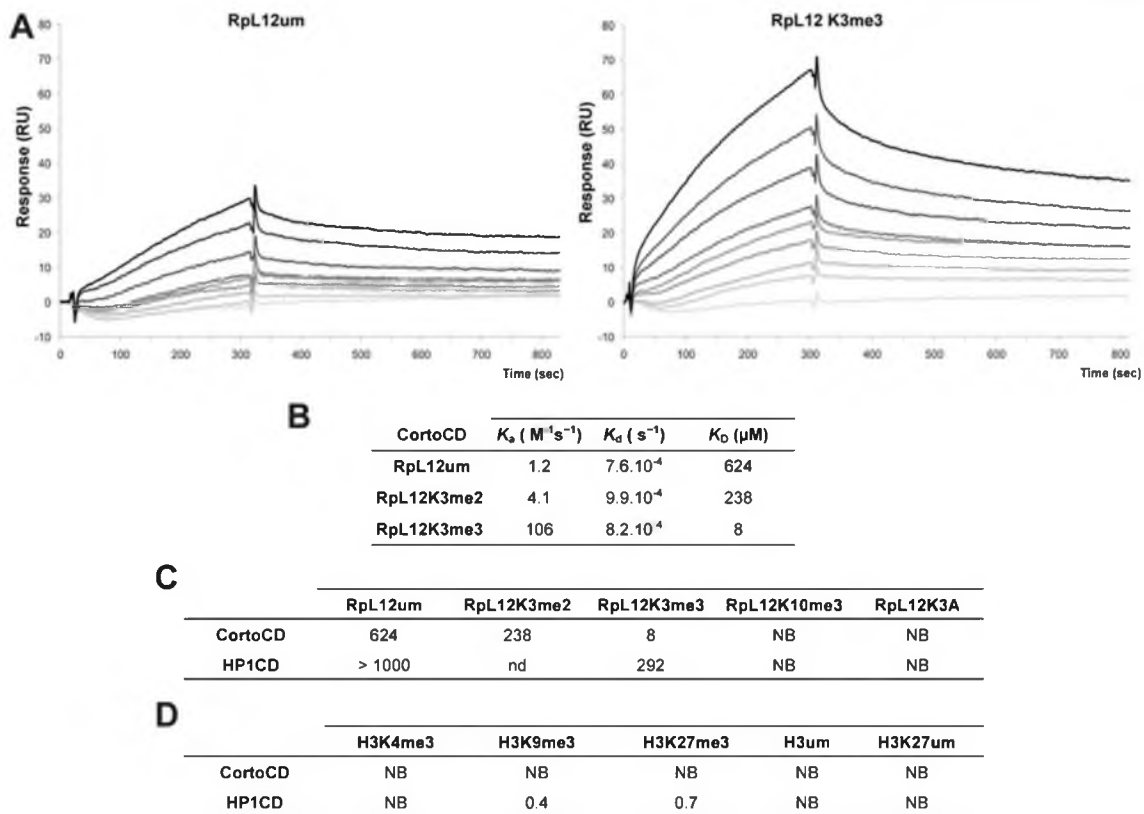


Figure 6: Preferential binding of Corto chromodomain to RPL12 trimethylated on lysine 3.

(A) Biacore™ sensorgrams showing binding to CortoCD of either RPL12 unmethylated peptide (RPL12um, left panel) or RPL12 peptide methylated on lysine 3 (RPL12K3me3, right panel). Increasing concentrations of RPL12um or RPL12K3me3 peptides were used [from 0 (light grey lines) to 10 μM (darker grey to black lines)]. Binding (Y-axis, Response) is expressed in resonance unit (RU).

(B) Kinetic parameters of interaction between CortoCD and RPL12um, RPL12K3me2 or RPL12K3me3 peptides. Note that CortoCD interacts specifically with RPL12 trimethylated on lysine 3 ($K_D=8 \mu M$).

(C) Equilibrium dissociation constant (K_D) calculated for CortoCD or HP1CD in interaction with RPL12um peptide, RPL12 methylated peptides, and RPL12K3A peptide.

(D) Equilibrium dissociation constant (K_D) calculated from CortoCD or HP1CD interacting with unmethylated or trimethylated histone H3 peptides. For H3K9me3, peptide concentrations were increased from 0 to 1 μM . For RPL12 and H3K27me3 peptide concentrations were increased from 0 to 10 μM . NB: no binding; nd: not determined.

To test this, we measured real-time binding between CortoCD and several RPL12 peptides using Biacore™. GST-CortoCD or GST was immobilized on a sensor chip. Then, several RPL12 peptides [unmodified (RPL12um), methylated on lysine 3 (RPL12K3me2, RPL12K3me3), methylated on lysine 10 (RPL12K10me3) or lysine 3 mutated (RPL12K3A)] were assayed for their binding to GST-CortoCD or GST (Figures 6A,B,C). None of these peptides bound GST. Furthermore, unmodified RPL12, RPL12K3me2, RPL12K10me3 and RPL12K3A peptides did not interact with CortoCD (no binding or unspecific binding *i.e.* $K_D > 200 \mu\text{M}$). Only RPL12K3me3 interacted with high specificity with CortoCD ($K_D = 8 \mu\text{M}$).

To investigate whether RPL12K3me3 could bind to other chromodomains, we repeated these experiments using that of HP1 (HP1CD). GST-HP1CD was immobilized on the sensor chip and binding of either RPL12, RPL12K3me3, RPL12K10me3 or RPL12K3A was tested. None of these peptides interacted with HP1CD (Figure 6C). Although no histones were revealed among peptides pulled down by CortoCD, we monitored binding of several histone H3 peptides to CortoCD. No binding of unmodified H3, H3K27me3, H3K9me3 or H3K4me3 peptides was observed (Figure 6D) while, as expected, the H3K9me3 peptide bound HP1CD with high affinity ($K_D = 0.4 \mu\text{M}$ for H3K9me3). Surprisingly, the H3K27me3 peptide bound HP1CD with a similar affinity ($K_D = 0.7 \mu\text{M}$), probably because it requires the hinge and chromodomain regions adjacent to the chromodomain in HP1 for selective targeting (Smothers and Henikoff, 2001).

Altogether these data demonstrate that the Corto Chromodomain specifically recognizes RPL12 trimethylated on lysine 3 (RPL12K3me3).

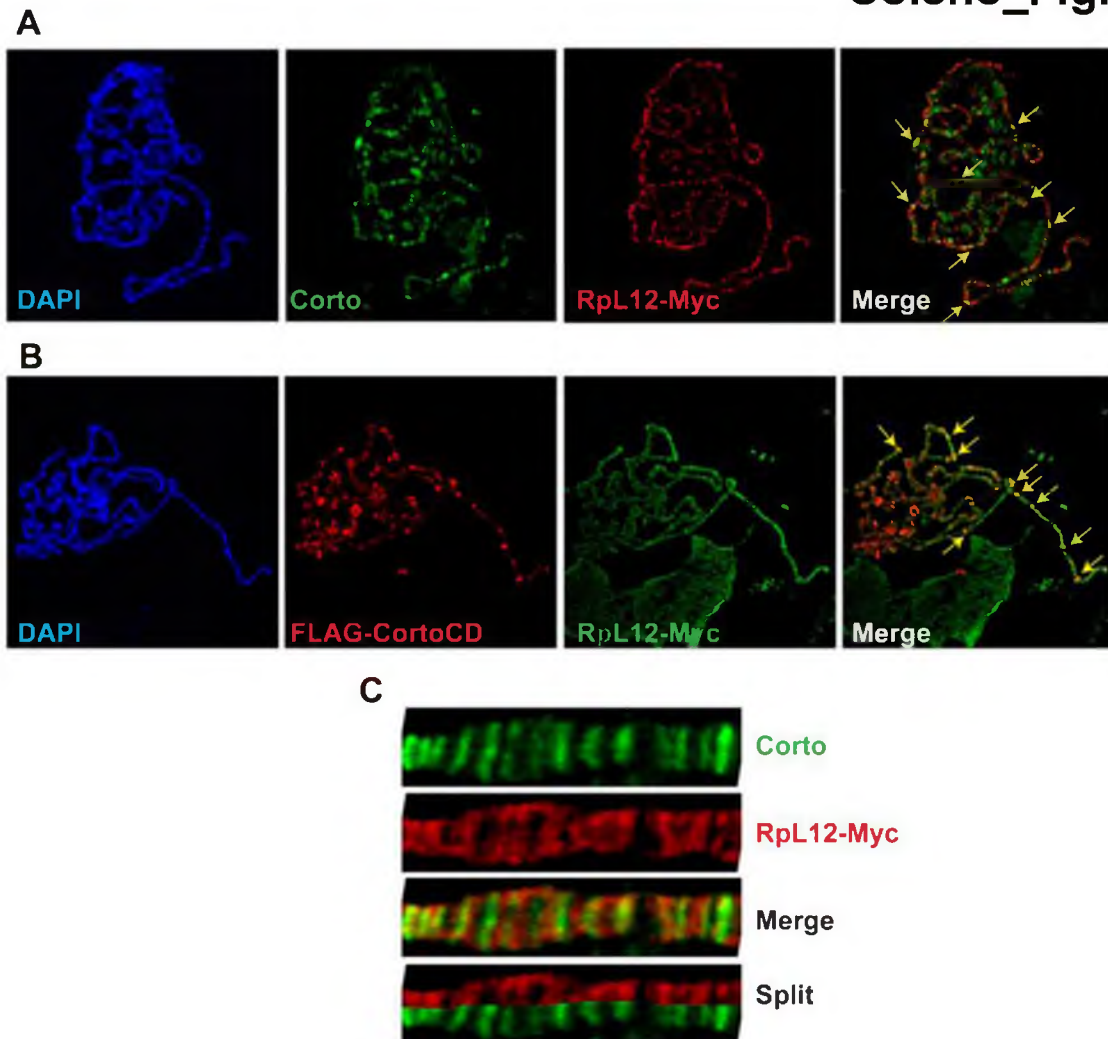


Figure 7: Corto and RPL12 share many sites on polytene chromosomes.

(A) Polytene chromosomes from an *esg::Gal4>UAS::RPL12-Myc* larva immunostained with anti-Corto (green) and anti-Myc (red) antibodies. Many sites were common to Corto and RPL12-Myc. Some are shown by yellow arrows on the merged picture.

(B) Polytene chromosomes from an *esg::Gal4>UAS::FH-cortoCD,UAS::RPL12-Myc* larva immunostained with anti-FLAG (red) and anti-Myc (green) antibodies. Many sites were common to CortoCD and RPL12-Myc. Some are shown by yellow arrows on the merged picture.

(C) Close-up showing numerous co-localizations of Corto and RPL12.

Epigenetic landscape of Corto and RPL12

RPL12, along with 19 other ribosomal proteins, is known to bind polytene chromosomes of *Drosophila* larval salivary glands where it specifically associates with sites of transcription Brogna 2002. To investigate the potential role of the Corto-RPL12 interaction in gene expression regulation, we first analyzed the epigenetic landscape of these proteins on polytene chromosomes. For this, we generated Myc-tagged RPL12 transgenic fly lines (*UAS::RPL12-Myc*). Unlike *corto* or *cortoCD*, *RPL12-Myc* overexpression using ubiquitous Gal4 drivers (*da::Gal4>UAS::RPL12-Myc* or *Act::Gal4>UAS::RPL12-Myc*) induced no lethality and adult flies presented no phenotype except a shortened development (data not shown). *RPL12-Myc* was then overexpressed with the salivary gland driver *esg* (*esg::Gal4>UAS::RPL12-Myc*) to test its binding to polytene chromosomes. RPL12-Myc bound polytene chromosomes at numerous sites, preferentially at DAPI interbands and puffs, suggesting that it mimics the binding of endogenous RPL12 (Brogna *et al.*, 2002) (Figure 7A).

Many but not all of these sites were shared with Corto, as shown by co-immunostaining of the endogenous Corto protein (Figures 7A, 7C). Simultaneous over-expression of FH-CortoCD and RPL12-Myc (*esg::Gal4>UAS::FH-cortoCD,UAS::RPL12-Myc*) established that CortoCD like full-length Corto co-localized with RPL12 on many sites (Figure 7B).

Chromatin environment of Corto and RPL12 was further analyzed using antibodies against epigenetic marks (H3K27me3, H3K4me3) and RNA Polymerase II (paused, *i.e.* phosphorylated on serine 5: RNAPolIIS5p; elongating *i.e.* phosphorylated on serine 2: RNAPolIIS2p).

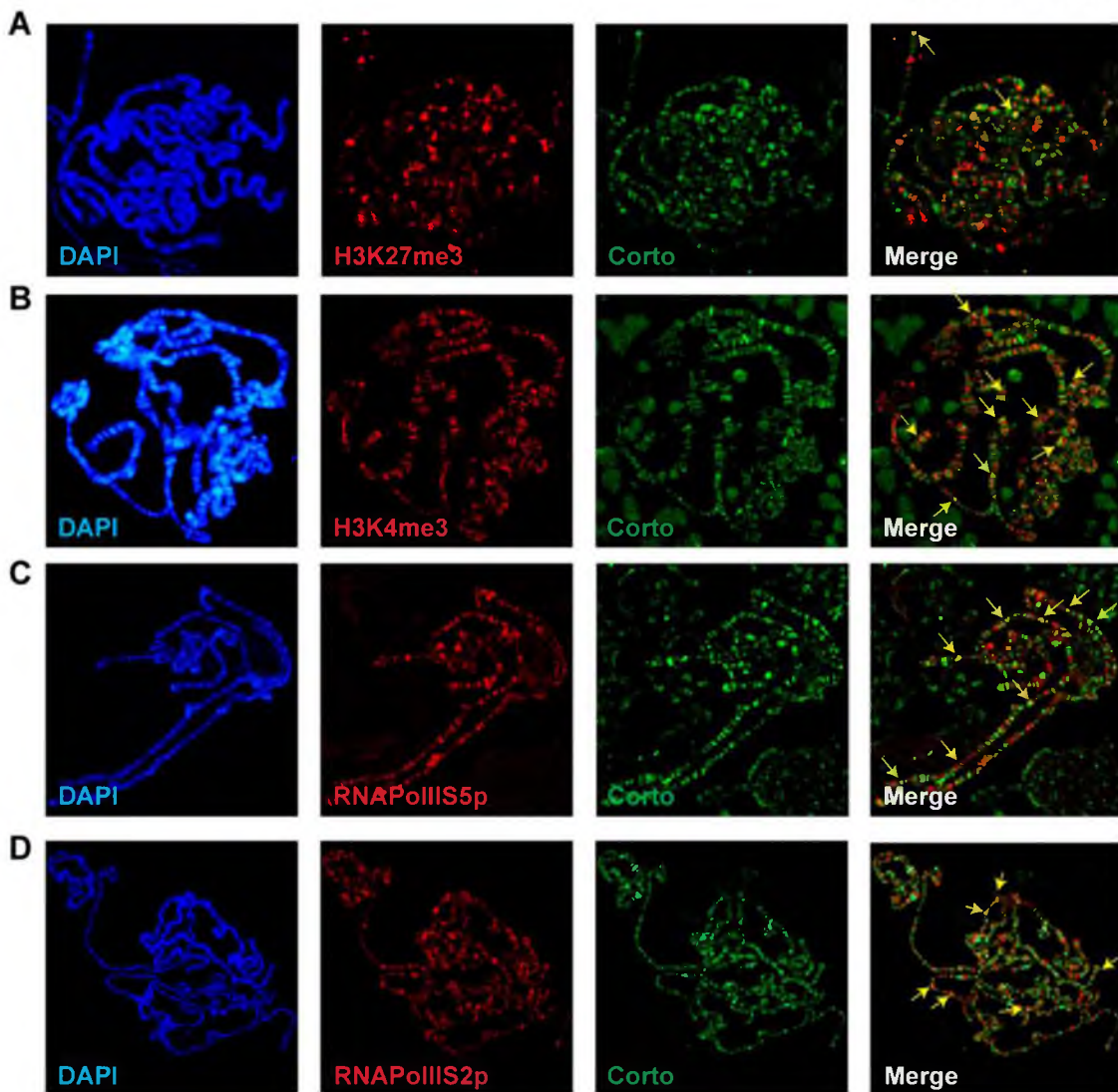


Figure 8: Epigenetic landscape of Corto.

Co-immunostainings of salivary gland polytene chromosomes from w^{1118} larvae using anti-Corto antibodies (green) and anti-H3K27me3, anti-H3K4me3, anti-RNAPolIIS5p or anti-RNAPolIIS2p antibodies (red). Some co-localizations between Corto and these epigenetic marks are shown with yellow arrows on the merged pictures. Note that the two arrows on A point to the X chromosome tips of two nuclei.

In agreement with our Biacore™ analyses, Corto did not bind centromeric heterochromatin – marked by H3K9me3 – and did not overlap with H3K27me3 (except at the tip of chromosome X) (Figure 8A).

Similarly, very few co-localizations with H3K27me3 were observed for RPL12-Myc (Figure 9A). Corto, as well as RPL12-Myc, partially co-localized with H3K4me3 (Figures 8B, 9B). However, whereas Corto showed many co-localizations with RNAPolIIS5p and few with RNAPolIIS2p (Figures 8C, 8D), RPL12 shared but few sites with RNAPolIIS5p and strongly co-localized with RNAPolIIS2p (Figures 9C, 9D), as previously described (Brognia *et al.*, 2002).

Taken together, these data suggest that Corto and RPL12 mostly bind open, transcriptionally permissive chromatin. It is tempting to speculate that their interaction could modulate the process of transcription *e.g.* the balance between paused and active transcription.

Genome-wide transcriptome analyses of wing imaginal discs over-expressing cortoCD or RPL12

To address the role of Corto and RPL12 in regulation of transcription, we deep-sequenced transcripts of wing imaginal discs from third instar larvae over-expressing either *FH-cortoCD* or *RPL12-Myc* under control of the wing-specific *scalloped::Gal4* driver (*sd::Gal4>UAS::FH-cortoCD* or *sd::Gal4>UAS::RPL12-Myc*) (hereafter called assays).

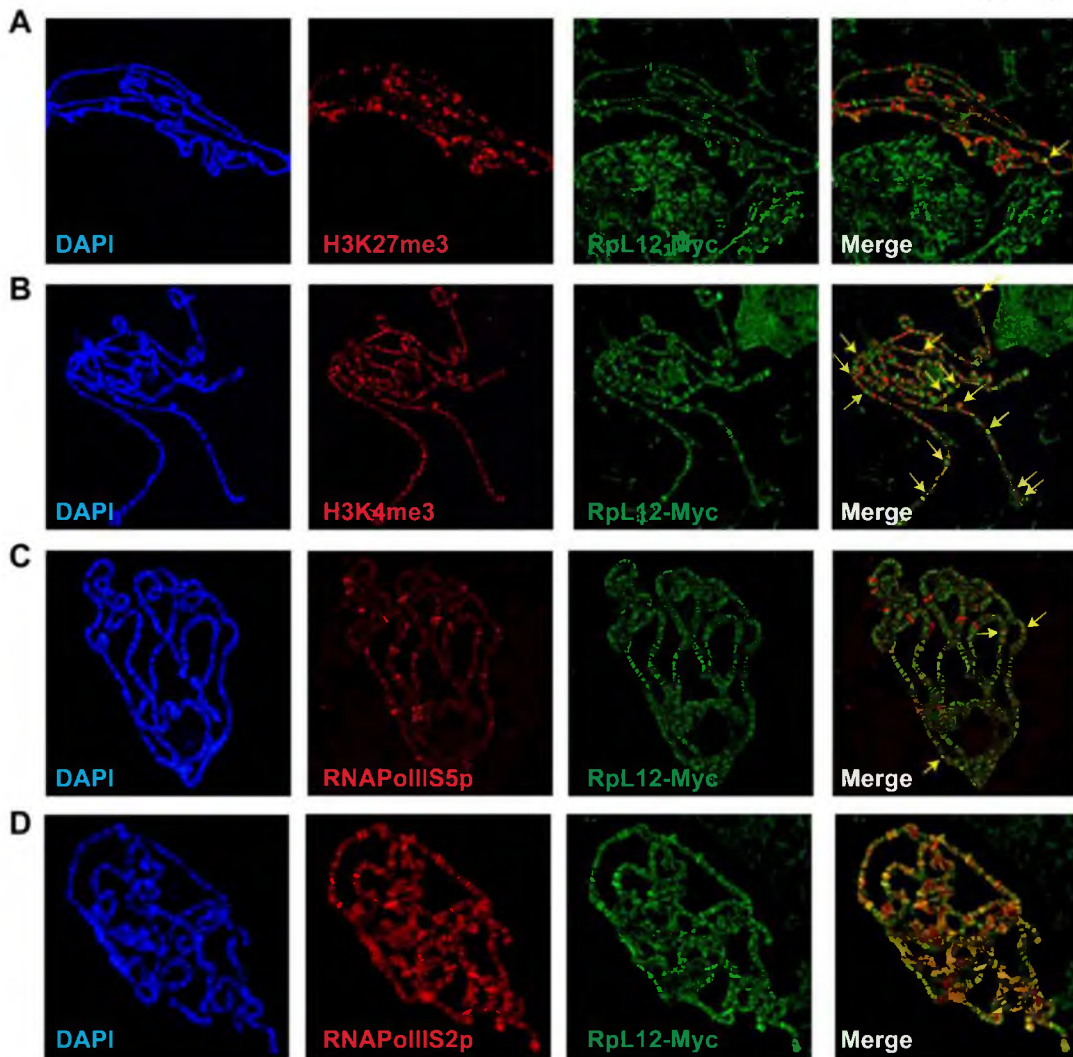


Figure 9: Epigenetic landscape RPL12.

Co-immunostainings of salivary gland polytene chromosomes from *esg::Gal4>UAS::RPL12-Myc* larvae using anti-Myc antibodies (green) and anti-H3K27me3, anti-H3K4me3, anti-RNAPolIIS5p or anti-RNAPolIIS2p antibodies (red). Some co-localizations between RPL12-Myc and these epigenetic marks are shown with yellow arrows on the merged pictures. Note the numerous co-localizations between RPL12-Myc and RNAPolIIS2p.

Total RNA from the assays, the *sd::Gal4/+* control or a *w¹¹¹⁸* reference line were isolated from pools of wing imaginal discs and subjected to RNA-seq on an Illumina high throughput sequencer. Sequence reads were aligned with the *D. melanogaster* genome to generate global gene expression profiles. Sequence reads of the assays were compared to sequence reads of the *sd::Gal4/+* control. Differential analyses were performed to obtain adjusted *P*-values associated to expression changes for the assays compared to the *sd::Gal4/+* control. In addition, sequence reads from the *w¹¹¹⁸* reference line were compared to sequence reads of the *sd::Gal4/+* control. This reference was used to fix the threshold of the adjusted *P*-value to get only 1% of transcripts as significantly expressed in this control experiment (false discovery rate). By doing so, we obtained an adjusted *P*-value cutoff of 4.10^{-18} . Using this threshold, we retrieved the highest expression variations from the two assays [with absolute $\log_2(\text{assay/control}) > 1$]. 463 genes were up-regulated when over-expressing *cortoCD* (Suppl. Table 1). Among them, 314 were also up-regulated when over-expressing *RPL12*, representing 75% of all genes up-regulated by *RPL12* over-expression (Suppl. Table 2). Furthermore, 211 genes were down-regulated when over-expressing *cortoCD* (Suppl. Table 3). Among them, 197 were also down-regulated when over-expressing *RPL12*, representing 67% of all genes down-regulated by *RPL12* over-expression (Suppl. Table 4). These results are summarized on Figure 10 and Suppl. Table 5. They suggest that Corto and RPL12 play similar role in transcriptional regulation of many genes.

Strikingly, analysis of Gene Ontology (GO) revealed that common up-regulated genes were enriched in "translation" (24% for Corto and 21% for RPL12) and "structural constituent of ribosomes" (30% for Corto and 38% for RPL12) categories (Figure 11 and Suppl. Tables 6 to 9).

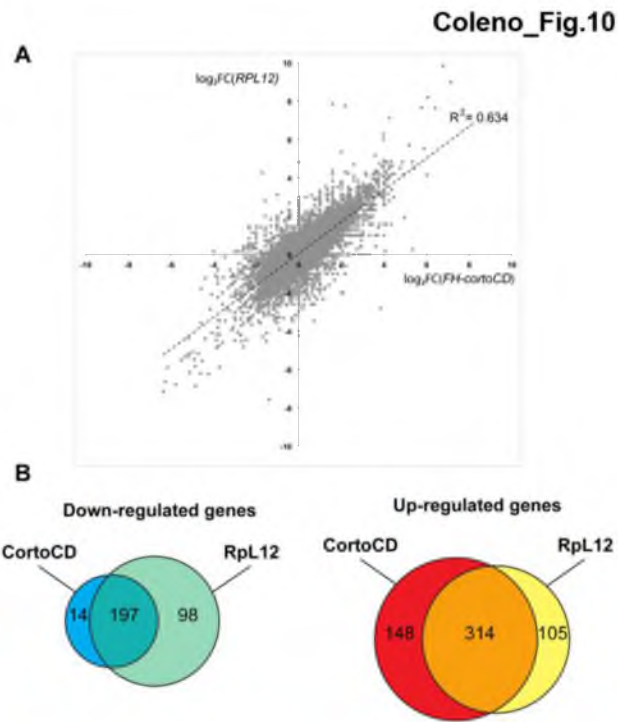


Figure 10: Comparison of genes deregulated by *cortoCD* or *RPL12* over-expression.

(A) Scatter plot of \log_2 fold changes (FC) showing (*sd::Gal4>UAS::RPL12-Myc vs sd::Gal4/+*) on Y-axis and (*sd::Gal4>UAS::FH-cortoCD vs sd::Gal4/+*) on X-axis.

(B) Venn diagrams showing the intersection of genes deregulated with both overexpressions after cutoff [P -value $<4.10^{-18}$; absolute $\log_2(\text{assay}/\text{control})>1$]. See Suppl. Tables 1 to 5 for detailed gene lists.

DISCUSSION

Chromodomains play a critical role in addressing transcriptional regulators to chromatin. Investigating the role of the ETP Corto chromodomain, we found that it is a typical chromodomain, acting as a chromatin targeting module and binding RNAs *in vitro*. Surprisingly, the Corto chromodomain does not bind methylated histones, as most known chromodomains do, but Ribosomal Protein L12 trimethylated on lysine 3 (RPL12K3me3). In agreement, RPL12 and Corto share many sites on polytene chromosomes. Transcriptomic analyses of wing imaginal tissues in which either *cortoCD* or *RPL12* were overexpressed reveal that a large part of deregulated genes are common, indicating that Corto and RPL12 might indeed be partners in transcriptional regulation.

RPs and regulation of gene expression

The ETP Corto is a partner of Polycomb and Trithorax complexes and participates in epigenetic maintenance of gene expression, notably homeotic genes (Lopez *et al.*, 2001; Salvaing *et al.*, 2008). Multiple Corto binding sites on polytene chromosomes as well as pleiotropic phenotype of *corto* mutants show that Corto transcriptional targets are numerous and involved in many developmental pathways. The interaction reported here between Corto and RPL12 raises the interesting possibility of a connection between RPs and epigenetic regulation of gene expression.

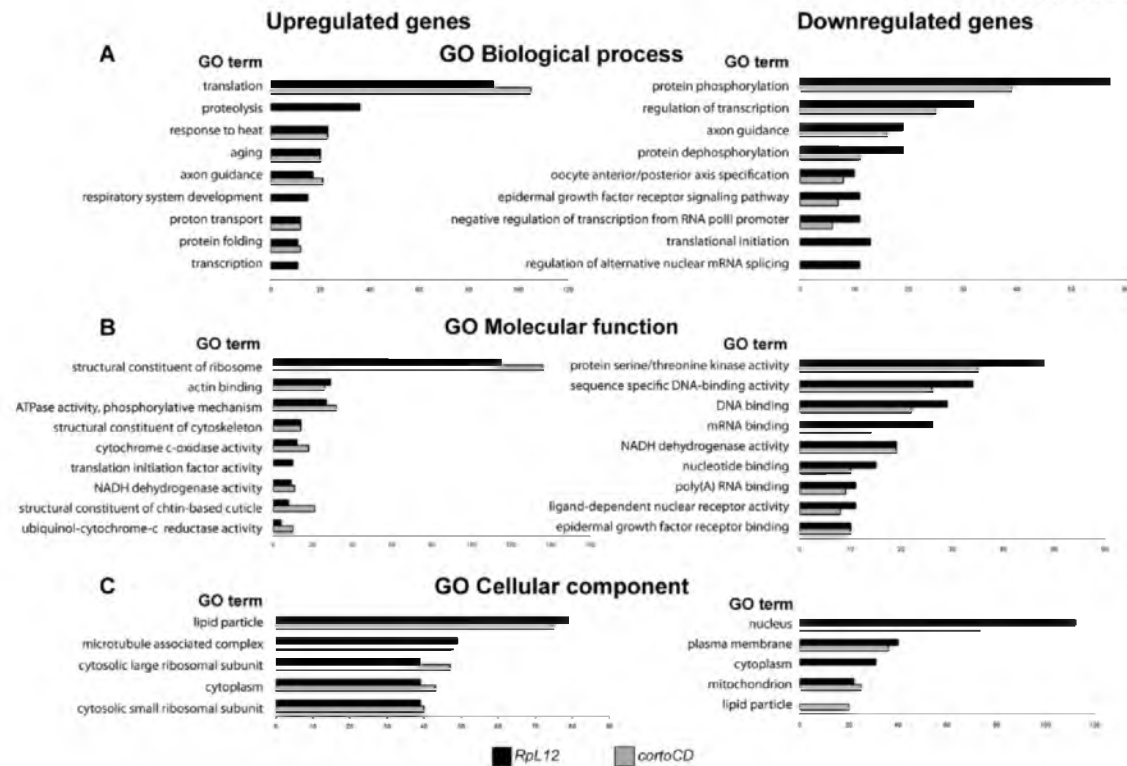


Figure 11: Ontology of genes deregulated in wing imaginal discs over-expressing cortoCD or RpL12.

Gene Ontology (GO) term enrichment of genes deregulated by CortoCD and RPL12 considering DAVID identification (Huang et al., 2009). Highly represented, non-redundant categories, were selected according to the hypergeometric test adjusted P-values. The number of genes in each category is shown in the X-axis. GO of biological process (A, B), molecular function (C, D) and cellular component (E, F) of genes up-regulated (A, C and E) and down-regulated (B, D and F) by over-expression of RpL12 or cortoCD. Full GO data (GO ID, description, number of genes in each category, enrichment and adjusted P-values) for each category are presented in Suppl. Tables 6 to 9.

Apart from protein synthesis, RPs are involved in many cellular functions referred as “extra-ribosomal” (reviewed in Bhavsar *et al.*, 2010). The first report on a RP’s role in transcriptional regulation came from *E. coli* where RPS10 is involved in anti-termination of transcription (Friedman *et al.*, 1981), followed by the finding that yeast RPS20 also participates in anti-termination of transcripts synthesized by RNA Pol III (Hermann-Le Denmat *et al.*, 1994). Many eukaryotic RPs, notably RPL12, regulate their own transcription, basically by regulating their own splicing (reviewed in Ivanov *et al.*, 2006). Furthermore, RPs bind chromatin at many sites suggesting that they have multiple transcriptional targets (Brognia *et al.*, 2002; Schroder and Moore, 2005; Ni *et al.*, 2006; De *et al.*, 2011).

Direct interaction between several RPs and histone H1 in transcriptional repression (Ni *et al.*, 2006), as well as presence of RPs in the repressor complex H1.2 that contains the ETP ASXL1, suggest that RPs could modulate transcription *via* chromatin structure (Kim *et al.*, 2008). The interaction between RPL12 and the ETP Corto reinforces this idea. Moreover, RPs co-purify with a PcG complex {Saurin 2001}, and BRM, the catalytic subunit of the SWI/SNF TrxG complex, associates with components of the spliceosome (Batsché *et al.*, 2006) that contains several RPs including RPL12 (Ajuh *et al.*, 2000). However, the role of RPs in the above mentioned complexes could relate to structure preservation and not to transcriptional regulation *per se*. For more than 40 years, many genetic screens to isolate new *Polycomb* (*PcG*) and *trithorax* (*trxG*) genes have identified *Minute* mutants as *PcG* and *trxG* modifiers (Gildea *et al.*, 2000). Indeed, *Minute* mutations suppress the ectopic sex-comb phenotype of *Polycomb* or *polyhomeotic* mutants (Denell, 1978; Fauvarque *et al.*, 2001). *D. melanogaster Minute* loci are disseminated throughout the genome and many of them correspond to RP genes (Saebøe-

Larssen *et al.*, 1998, and references therein). *Minute* mutations might indirectly suppress phenotypes of *PcG* mutants by lengthening development, thus globally counteracting homeosis. However, *Minute* mutants can exhibit *PcG* mutant phenotypes, which is at variance with this assumption. Indeed, mutants in *stubarista* that encodes RP40 exhibit transformation of arista into legs (Melnick *et al.*, 1993). Overall, these findings lead us to favor the hypothesis of an active involvement of RPs in regulation of gene expression.

RP combinations and post-translational modifications, a ribosomal code for transcription?

Whether individual RPs regulate transcription independently of other RPs or in the context of a ribosome-like complex is an interesting and much debated question (reviewed in De and Brogna, 2010). Many data point to a collaborative role of RPs in transcription. In *D. melanogaster*, at least 20 RPs as well as rRNA are present at transcription sites on polytene chromosomes, suggesting that they could be components of ribosomal-like subunits (Brogna *et al.*, 2002). Genome-wide ChIP-on-chip analysis of L7, L11 and L25 in *S. pombe* reveal a striking similarity of their binding sites, suggesting that they might bind chromatin as complexes (De *et al.*, 2011). Along the same line, mass spectrometry of Corto partners identified not only RPL12 but also RP L7, L27, S10, S11 and S14, indicating that Corto interacts with several RPs that could form a complex. Interestingly, in prokaryotic as well as in eukaryotic ribosomes, RP L12 and L7 form a flexible protruding stalk that acts as a recruitment platform for translation factors (Chandramouli *et al.*, 2008). Our results might point to the existence of pseudo-ribosomes composed of several RPs on chromatin. The role of RPs in nuclear translation has been very much debated and whether these pseudo-ribosomes are involved in translation is still unknown (Dahlberg *et al.*, 2003). However, this possibility seems unlikely in view of the

numerous data showing lack of translation factors in nuclei as well as association on chromatin between RPs and nascent coding as well as non-coding RNAs (Schroder and Moore, 2005). Overall, these data suggest that pseudo-ribosomal complexes composed of various RPs are associated on chromatin and could thus participate in transcriptional regulation.

Like histones, RPs are subjected to a plethora of post-translational modifications including ubiquitinylations, phosphorylations, acetylations and methylations (Carroll *et al.*, 2008, and references therein). We show here that Corto chromodomain binds RPL12K3me3. Strikingly, the chromodomain protein CBX1, a human homolog of *Drosophila* HP1 α , also interacts with RPL12 (Stelzl *et al.*, 2005), suggesting that chromodomain binding to methylated RPL12 might be conserved. It is tempting to speculate about a role for RPL12 methylation in chromodomain protein recruitment to chromatin. This mechanism might be analogous to the one by which histone methylation marks, such as H3K27me3, recruit the PRC1 complex, *i.e.* by binding of the Polycomb chromodomain to methyl groups. Under this hypothesis, RPL12K3me3 might recruit Corto or/and other chromodomain proteins to chromatin. In yeast and *A. thaliana*, RPL12 can be trimethylated on lysine 3 by methyl-transferase SET11/Rkm2 (Porrás-Yakushi *et al.*, 2007; Carroll *et al.*, 2008; Sadaie *et al.*, 2008). Rkm2 is conserved in *Drosophila* and abundantly transcribed in S2 cells as well as all along development (Graveley *et al.*, 2011). It would be interesting to determine whether this enzyme is an RPL12K3 methyl-transferase in *Drosophila*.

Based on the existence of a panel of ribosomes composed of diverse RPs bearing various post-translational modifications, it was proposed that selective mRNA translation might depend on a ribosome code similar to the histone code (Komili *et al.*, 2007). Our

results lead us to suggest that such a ribosome code might also concern regulation of gene transcription.

Ribosomal homeostasis by coordinated transcriptional regulation of RPs

Surprisingly, GO analysis of RPL12 and Corto upregulated genes reveals that the "translation" and "structural component of ribosomes" categories are over-represented. Interestingly, the expression of RP genes decreases in *RPL12A* mutants in yeast (Komili *et al.*, 2007). Our finding that over-expression of *Drosophila RPL12* increased RP gene expression reinforces the idea that RPL12 can activate RPs at the transcriptional level. Interestingly, up-regulation of ribosome related genes is also observed in mutants of *ash2* that encodes a TrxG protein, and that genetically interacts with *corto* (Lopez *et al.*, 2001; Beltran *et al.*, 2007). Hence RPL12, Corto and chromatin regulators of the TrxG family might all participate in dynamic coordination of ribosome biogenesis. Such global co-regulation of genes involved in a given function does indeed exist in eukaryotes. In *Drosophila*, housekeeping genes are co-regulated by the NSL complex and, in yeast, RPL12 coordinates transcription of genes involved in phosphate assimilation as well as RP genes (Komili *et al.*, 2007; Tu *et al.*, 2011; Feller *et al.*, 2011). As regulation of ribosome biogenesis is essential for cellular health (Warner and McIntosh, 2009), such a transcriptional co-regulation of RP genes might have evolved to insure that the cell's protein synthesis capacity can be rapidly adjusted to changing environmental conditions.

MATERIAL AND METHODS

Cloning and site-directed mutagenesis

Clones and site-directed mutagenesis are described in Suppl. Material and Methods. Primers are described in Suppl. Table 10.

Drosophila strains and genetics

D. melanogaster stocks and crosses were kept on standard media at 25°C. *UAS::FH-cortoCD*, *UAS::FH-cortoΔCD* and *UAS::RPL12-Myc* transgenic lines were established by standard *P*-element mediated transformation. Over-expression was carried out using *Gal4* drivers either ubiquitous [*daughterless (da)::Gal4*]; *Actin5C (Act)::Gal4*], salivary gland-specific [*escargot (esg)::Gal4*], or wing-specific [*scalloped::Gal4 (sd)::Gal4*]. Five females bearing the *Gal4* driver were crossed with three males bearing the *UAS* transgene or *w¹¹¹⁸* as a control. Crosses were transferred to new vials every third day. The *sd::Gal4*, *UAS::FH-cortoCD* and *UAS::RPL12-Myc* lines were isogenized for six rounds with the isogenic *w¹¹¹⁸* line, prior to deep-sequencing, as previously described (Debat *et al.*, 2011). Lethality was calculated as described (Krattinger *et al.*, 2007).

Peptide pull-down experiments and mass spectrometry

Nuclear extracts were prepared from 0-16 h embryos as previously described (Mouchel-Vielh *et al.*, 2011). 1 mg of nuclear protein extract was incubated with 200 μg of purified GST or GST-CortoCD in binding buffer [0.5 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 4 mM MgCl₂, 0.05% Igepal, 20 mM HEPES, 300 mM KCl, 10% glycerol, protease inhibitor cocktail (Roche)] for 1 h at 25°C. After 5 washes in binding buffer, bound peptides were resolved on a large 15% SDS–polyacrylamide gel and stained either with EZblue™ (Sigma) or with the SilverQuest staining kit (Invitrogen). Bands were excised from the gel and analyzed by LC-MSMS mass spectrometry.

Cell culture and transfection

S2 cells were cultured at 25°C in Schneider's *Drosophila* medium (Lonza) supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum and 100 units.mL⁻¹ of

penicillin and streptomycin. Cells were transfected using Effecten® (Qiagen) as previously described (Mouchel-Vielh *et al.*, 2011).

Co-immunoprecipitations

Co-immunoprecipitations were performed as already described (Mouchel-Vielh *et al.*, 2011) using anti-FLAG (Sigma F-3165) or anti-Myc (Santa Cruz, sc-40).

Confocal imaging

S2 cells were harvested 24 h after transfection and treated as described (Rogers and Rogers, 2008). For each transfection, 30 to 60 nuclei were analyzed with an SP5 confocal microscope (Leica microsystems) using LAS (Image Analysis Software).

Real-time protein interaction assays

GST or GST fusion proteins were dialyzed using a Slide-A-Lyser cassette (Thermo Scientific) in running buffer (10 mM HEPES pH7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% P20 surfactant). Real-time protein interaction assays were performed using a Biacore™ 3000. A CM5 sensor chip was activated by EDC–NHS amine coupling. GST was first immobilized on the chip by injection of a 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ solution in NaOAc pH5 buffer. GST-CortoCD and GST-HP1CD were immobilized by injecting a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ solution in the same buffer. Binding tests were performed by injecting peptides at 1 or 10 μM in running buffer at a flow rate of 25 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ during 5 min. None of the peptides used bound GST. Kinetic assays were performed only when the binding test was positive. Real-time monitoring was displayed in a sensorgram as the optical response (RU) *versus* time (s). To calculate association constants, peptides were diluted in series from 1 to 10 μM in running buffer and dilutions were injected sequentially at a flow rate of 25 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ during 5 min. Dissociation kinetics were then run during 10 min to calculate

dissociation constants. Between each assays, the chip was washed with glycine pH2.0. Kinetic constants were calculated with the BIAevaluation Software (Biacore™) using the Fit kinetic simultaneous k_a/k_d (1:1 binding; Langmuir algorithm). Sequences of the RPL12 peptides are shown on Suppl. Table 11. Histone peptides were kindly provided by Diagenode (H3K27me3: sp-069-050; H3K4me3: sp-003-050; H3K9me3: sp-056-050; H3K4/K9um: sp-999-050; H3K27um: sp-998-050).

Nucleic acid binding

Binding of GST fusion proteins to radiactively labeled RNA and DNA is described in Suppl. Material and Methods.

Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA)

A 296 bp insert from the 5'-UTR region of the *AbdB-m* transcript was obtained by PCR amplification of genomic DNA (see Suppl. Table 10 for the primers used). *Awnt-1* was used as alternative probe. Radiolabeled RNA probes were synthesized by $\alpha^{32}\text{P}$ -CTP incorporation using Riboprobe *in vitro* transcription System (Promega). Detailed procedure is described in Suppl. Material and Methods.

Immunostaining of polytene chromosomes

Polytene chromosome immunostainings were performed as described in (Salvaing *et al.*, 2003) for all antigens except RNA Pol II, for which we used experimental conditions described in (Pérez-Lluch *et al.*, 2011). Mouse anti-FLAG (1:20) (Sigma, F-3165), mouse anti-Myc (1:20) (Santa Cruz, sc-40), rabbit anti-H3K4me3 (1:40) (Diagenode, pAB-003), rabbit anti-H3K27me3 (1:70) (Diagenode, pAB-069), rabbit anti-RNA Pol II Ser2p (1:200) (Abcam, an5095), rabbit anti-RNA Pol II Ser5p (1:40) (Covance, MMS-134R) and rabbit anti-Corto (1:30) (Salvaing *et al.*, 2003) were used as

primary antibodies. Secondary antibodies [Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes, A-11008), Alexa Fluor® 594 goat anti-mouse IgG (Molecular probes, A-11005) and Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG, IgA and IgM (Molecular Probes, A-10667)] were used at a 1:1000 dilution.

RNA-seq and bioinformatics analysis

Wing imaginal discs of third instar larvae (one disc per larva) were dissected by batches of 50 in PBS and frozen in liquid nitrogen. 300 discs (6 batches) were pooled and homogenized in lysis buffer using a FastPrep-24 during 20 s at $4\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (MP Biomedicals, Lysing Matrix D). Total RNA were extracted using RNeasy® kit (Quiagen). Library preparation and Illumina sequencing (multiplexed 50 bp paired-end sequencing on HiSeq 2000) were performed at the BC Cancer Agency Genome Sciences Center (Canada) following the manufacturer's protocol. A mean of 46 ± 11 million reads were obtained for each of the 4 samples (w^{1118} ; $sd::Gal4/+$; $sd::Gal4>UAS::FH-cortoCD$; $sd::Gal4>UAS::RPL12-Myc$). Before mapping, poly N read tails were trimmed, reads ≤ 11 bases were removed, and reads with quality mean ≤ 12 were discarded. Reads were then aligned against the *D. melanogaster* genome (dm3 genome assembly, BDGP Release 5.38) using Bowtie mapper (version 0.12.7) (Langmead *et al.*, 2009). Alignments from reads matching more than once on the reference genome were removed using Java version of samtools. To compute gene expression, *D. melanogaster* GFF3 genome annotation from FlyBase (version 5.38) was used. All overlapping regions between alignments and referenced exons were counted.

Technical replicates coming from paired-end reads were first summed. Then, all samples were normalized together. Data were normalized according to the scaling normalization proposed by Robinson and Oshlack and implemented in the edgeR package

version 1.6.10 (Robinson and Oshlack, 2010). A Fisher's Exact Test was then performed using the `sage.test` function of the `statmod` package version 1.4.6. Finally, a Benjamini and Hochberg (BH) *P*-value adjustment was made.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank V. Ribeiro for excellent technical assistance, all members of the Chromatin and Development team for fruitful discussions, A. Esta and Dr. F. Faradji for preliminary experiments, Pr. Y. Andéol for the *Awnt1* RNA, Dr. G. Cavalli for PH antibodies, M. Bocquet for Bioanalyser RNA quality assessment, Dr. I. Le Disquet for SEM (IFR83, Paris), Dr. C. Piesse for RPL12 peptide synthesis (IFR83, Paris), Diagenode for histone peptides, Dr. V. Labas for mass spectrometry analyses (INRA, Tours) and the Bloomington stock center for fly stocks. This work was supported by CNRS and UPMC, PEPS (CNRS) to S.B. and "Appel à projets" (IFR 83) to F.P.

REFERENCES

- Ajuh, P., Kuster, B., Panov, K., Zomerdijs, J.C., Mann, M., and Lamond, A.I. 2000. Functional analysis of the human CDC5L complex and identification of its components by mass spectrometry. *EMBO J* **19**:6569-6581.
- Akhtar, A., Zink, D., and Becker, P.B. 2000. Chromodomains are protein-RNA interaction modules. *Nature* **407**:405-409.
- Ball, L.J., Murzina, N.V., Broadhurst, R.W., Raine, A.R., Archer, S.J., Stott, F.J., Murzin, A.G., Singh, P.B., Domaïlle, P.J., and Laue, E.D. 1997. Structure of the chromatin binding (chromo) domain from mouse modifier protein 1. *EMBO J* **16**:2473-2481.
- Bannister, A.J., and Kouzarides, T. 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* **21**:381-395.
- Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C., and Kouzarides, T. 2001. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* **410**:120-124.
- Batsché, E., Yaniv, M., and Muchardt, C. 2006. The human SWI/SNF subunit Brm is a regulator of alternative splicing. *Nat Struct Mol Biol* **13**:22-29.
- Beltran, S., Angulo, M., Pignatelli, M., Serras, F., and Corominas, M. 2007. Functional dissection of the ash2 and ash1 transcriptomes provides insights into the transcriptional basis of wing phenotypes and reveals conserved protein interactions. *Genome Biol* **8**:R67.
- Bernstein, E., Duncan, E.M., Masui, O., Gil, J., Heard, E., and Allis, C.D. 2006. Mouse polycomb proteins bind differentially to methylated histone H3 and RNA and are enriched in facultative heterochromatin. *Mol Cell Biol* **26**:2560-2569.
- Bhavsar, R.B., Makley, L.N., and Tsonis, P.A. 2010. The other lives of ribosomal proteins. *Hum Genomics* **4**:327-344.
- Bouazoune, K., Mitterweger, A., Längst, G., Imhof, A., Akhtar, A., Becker, P.B., and Brehm, A. 2002. The dMi-2 chromodomains are DNA binding modules important for ATP-dependent nucleosome mobilization. *EMBO J* **21**:2430-2440.
- Breiling, A., Bonte, E., Ferrari, S., Becker, P.B., and Paro, R. 1999. The *Drosophila* polycomb protein interacts with nucleosomal core particles In vitro via its repression domain. *Mol Cell Biol* **19**:8451-8460.

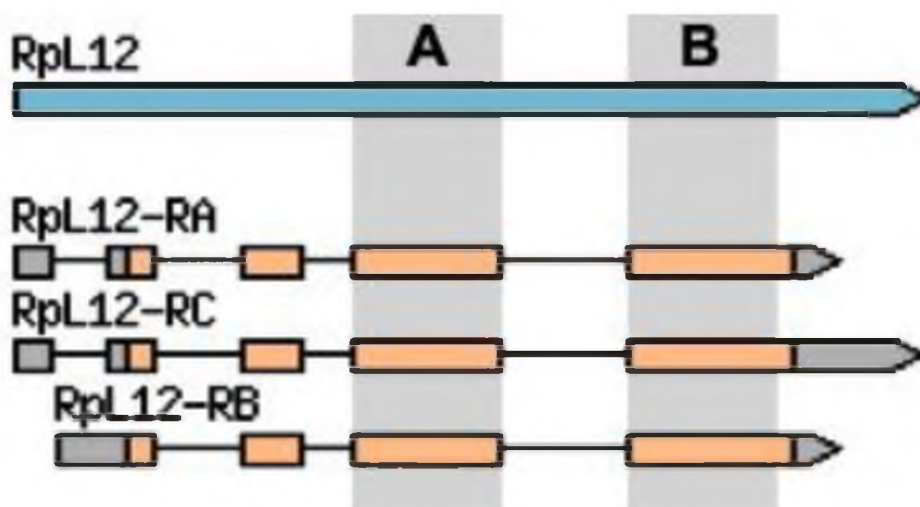
- Brogna, S., Sato, T.A., and Rosbash, M. 2002. Ribosome components are associated with sites of transcription. *Mol Cell* **10**:93-104.
- Carroll, A.J., Heazlewood, J.L., Ito, J., and Millar, A.H. 2008. Analysis of the Arabidopsis cytosolic ribosome proteome provides detailed insights into its components and their post-translational modification. *Mol Cell Proteomics* **7**:347-369.
- Chandramouli, P., Topf, M., Ménétret, J.F., Eswar, N., Cannone, J.J., Gutell, R.R., Sali, A., and Akey, C.W. 2008. Structure of the mammalian 80S ribosome at 8.7 Å resolution. *Structure* **16**:535-548.
- Chern, M.K., Chang, K.N., Liu, L.F., Tam, T.C., Liu, Y.C., Liang, Y.L., and Tam, M.F. 2002. Yeast ribosomal protein L12 is a substrate of protein-arginine methyltransferase 2. *J Biol Chem* **277**:15345-15353.
- Dahlberg, J.E., Lund, E., and Goodwin, E.B. 2003. Nuclear translation: What is the evidence? *RNA* **9**:1-8.
- De, S., and Brogna, S. 2010. Are ribosomal proteins present at transcription sites on or off ribosomal subunits? *Biochem Soc Trans* **38**:1543-1547.
- De, S., Varsally, W., Falciani, F., and Brogna, S. 2011. Ribosomal proteins' association with transcription sites peaks at tRNA genes in *Schizosaccharomyces pombe*. *RNA* .
- Debat, V., Bloyer, S., Faradji, F., Gidaszewski, N., Navarro, N., Orozco-Terwengel, P., Ribeiro, V., Schlötterer, C., Deutsch, J.S., and Peronnet, F. 2011. Developmental Stability: A Major Role for Cyclin G in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet* **7**:e1002314.
- Denell, R.E. 1978. Homoeosis in *Drosophila*. II. a Genetic Analysis of Polycomb. *Genetics* **90**:277-289.
- Fauvarque, M.O., Laurenti, P., Boivin, A., Bloyer, S., Griffin-Shea, R., Bourbon, H.M., and Dura, J.M. 2001. Dominant modifiers of the polyhomeotic extra-sex-combs phenotype induced by marked P element insertional mutagenesis in *Drosophila*. *Genet Res* **78**:137-148.
- Feller, C., Prestel, M., Hartmann, H., Straub, T., Söding, J., and Becker, P.B. 2011. The MOF-containing NSL complex associates globally with housekeeping genes, but activates only a defined subset. *Nucleic Acids Res* doi: 10.1093/nar/gkr869.
- Friedman, D.I., Schauer, A.T., Baumann, M.R., Baron, L.S., and Adhya, S.L. 1981. Evidence that ribosomal protein S10 participates in control of transcription termination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**:1115-1118.
- Gildea, J.J., Lopez, R., and Shearn, A. 2000. A screen for new trithorax group genes identified little imaginal discs, the *Drosophila melanogaster* homologue of human retinoblastoma binding protein 2. *Genetics* **156**:645-663.
- Graveley, B.R., Brooks, A.N., Carlson, J.W., Duff, M.O., Landolin, J.M., Yang, L., Artieri, C.G., van Baren, M.J., Boley, N., Booth, B.W. et al. 2011. The developmental transcriptome of *Drosophila melanogaster*. *Nature* **471**:473-479.
- Hermann-Le Denmat, S., Sipiczki, M., and Thuriaux, P. 1994. Suppression of yeast RNA polymerase III mutations by the URP2 gene encoding a protein homologous to the mammalian ribosomal protein S20. *J Mol Biol* **240**:1-7.
- Huang, D. W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* **4**:44-57.
- Huang, J., and Berger, S.L. 2008. The emerging field of dynamic lysine methylation of non-histone proteins. *Curr Opin Genet Dev* **18**:152-158.
- Ivanov, A.V., Malygin, A.A., and Karpova, G.G. 2006. Eukaryotic ribosomal proteins: Interactions with their own pre-mRNAs and their involvement in splicing regulation. *Molecular Biology* **40**:570-578.
- Kim, K., Choi, J., Heo, K., Kim, H., Levens, D., Kohno, K., Johnson, E.M., Brock, H.W., and An, W. 2008. Isolation and characterization of a novel H1.2 complex that acts as a repressor of p53-mediated transcription. *J Biol Chem* **283**:9113-9126.
- Kodjabachian, L., Delaage, M., Maurel, C., Miassod, R., Jacq, B., and Rosset, R. 1998. Mutations in *cfc*, a novel *Drosophila* gene encoding a chromosomal factor, affect progression through mitosis and interact with Pc-G mutations. *Embo J* **17**:1063-1075.
- Komili, S., Farny, N.G., Roth, F.P., and Silver, P.A. 2007. Functional specificity among ribosomal proteins regulates gene expression. *Cell* **131**:557-571.
- Krattinger, A., Gendre, N., Ramaekers, A., Grillenzoni, N., and Stocker, R.F. 2007. DmOAZ, the unique *Drosophila melanogaster* OAZ homologue is involved in posterior spiracle development. *Dev Genes Evol* **217**:197-208.
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., and Jenuwein, T. 2001. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* **410**:116-120.
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., and Salzberg, S.L. 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* **10**:R25.
- Lopez, A., Higuert, D., Rosset, R., Deutsch, J., and Peronnet, F. 2001. *corto* genetically interacts with Pc-G and *trx-G* genes and maintains the anterior boundary of Ultrabithorax expression in *Drosophila* larvae. *Mol Genet Genomics* **266**:572-583.
- Melnick, M.B., Noll, E., and Perrimon, N. 1993. The *Drosophila* *stubarista* phenotype is associated with a dosage effect of the putative ribosome-associated protein D-p40 on *spineless*. *Genetics* **135**:553-564.
- Min, J., Zhang, Y., and Xu, R.M. 2003. Structural basis for specific binding of Polycomb chromodomain to histone H3 methylated at Lys 27. *Genes Dev* **17**:1823-1828.
- Mouchel-Vielh, E., Rougeot, J., Decoville, M., and Peronnet, F. 2011. The MAP kinase ERK and its scaffold protein MP1 interact with the chromatin regulator Corto during *Drosophila* wing tissue development. *BMC Dev Biol* **11**:17.
- Müller, J., and Verrijzer, P. 2009. Biochemical mechanisms of gene regulation by polycomb group protein complexes. *Curr Opin Genet Dev* **19**:150-158.

- Ni, J.Q., Liu, L.P., Hess, D., Rietdorf, J., and Sun, F.L. 2006. *Drosophila* ribosomal proteins are associated with linker histone H1 and suppress gene transcription. *Genes Dev* **20**:1959-1973.
- Paro, R., and Hogness, D.S. 1991. The Polycomb protein shares a homologous domain with a heterochromatin-associated protein of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:263-267.
- Pattatucci, A.M., Otteson, D.C., and Kaufman, T.C. 1991. A functional and structural analysis of the Sex combs reduced locus of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **129**:423-441.
- Pérez-Lluch, S., Blanco, E., Carbonell, A., Raha, D., Snyder, M., Serras, F., and Corominas, M. 2011. Genome-wide chromatin occupancy analysis reveals a role for ASH2 in transcriptional pausing. *Nucleic Acids Res* **39**:4628-4639.
- Polevoda, B., and Sherman, F. 2007. Methylation of proteins involved in translation. *Mol Microbiol* **65**:590-606.
- Porrás-Yakushi, T.R., Whitelegge, J.P., and Clarke, S. 2006. A novel SET domain methyltransferase in yeast: Rkm2-dependent trimethylation of ribosomal protein L12ab at lysine 10. *J Biol Chem* **281**:35835-35845.
- Porrás-Yakushi, T.R., Whitelegge, J.P., and Clarke, S. 2007. Yeast ribosomal/cytochrome c SET domain methyltransferase subfamily: identification of Rpl23ab methylation sites and recognition motifs. *J Biol Chem* **282**:12368-12376.
- Robinson, M.D., and Oshlack, A. 2010. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol* **11**:R25.
- Rogers, S.L., and Rogers, G.C. 2008. Culture of *Drosophila* S2 cells and their use for RNAi-mediated loss-of-function studies and immunofluorescence microscopy. *Nat Protoc* **3**:606-611.
- Sadaie, M., Shinmyozu, K., and Nakayama, J. 2008. A conserved SET domain methyltransferase, Set11, modifies ribosomal protein RPL12 in fission yeast. *J Biol Chem* **283**:7185-7195.
- Saebøe-Larssen, S., Lyamouri, M., Merriam, J., Oksvold, M.P., and Lambertsson, A. 1998. Ribosomal protein insufficiency and the minute syndrome in *Drosophila*: a dose-response relationship. *Genetics* **148**:1215-1224.
- Salvaing, J., Decoville, M., Mouchel-Vielh, E., Bussièrre, M., Daulny, A., Boldyreva, L., Zhimulev, I., Locker, D., and Peronnet, F. 2006. Corto and DSP1 interact and bind to a maintenance element of the Scr Hox gene: understanding the role of Enhancers of trithorax and Polycomb. *BMC Biol* **4**:9.
- Salvaing, J., Lopez, A., Boivin, A., Deutsch, J.S., and Peronnet, F. 2003. The *Drosophila* Corto protein interacts with Polycomb-group proteins and the GAGA factor. *Nucleic Acids Res* **31**:2873-2882.
- Salvaing, J., Nagel, A.C., Mouchel-Vielh, E., Bloyer, S., Maier, D., Preiss, A., and Peronnet, F. 2008. The enhancer of trithorax and polycomb corto interacts with cyclin G in *Drosophila*. *PLoS ONE* **3**:e1658.
- Sampath, S.C., Marazzi, I., Yap, K.L., Krutchinsky, A.N., Mecklenbrauker, I., Viale, A., Rudensky, E., Zhou, M.M., Chait, B.T., and Tarakhovskiy, A. 2007. Methylation of a histone mimic within the histone methyltransferase G9a regulates protein complex assembly. *Mol Cell* **27**:596-608.
- Schroder, P.A., and Moore, M.J. 2005. Association of ribosomal proteins with nascent transcripts in *S. cerevisiae*. *RNA* **11**:1521-1529.
- Smothers, J.F., and Henikoff, S. 2001. The hinge and chromo shadow domain impart distinct targeting of HP1-like proteins. *Mol Cell Biol* **21**:2555-2569.
- Stelzl, U., Worm, U., Lalowski, M., Haenig, C., Brembeck, F.H., Goehler, H., Stroedicke, M., Zenkner, M., Schoenherr, A., Koeppen, S. et al. 2005. A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome. *Cell* **122**:957-968.
- Struhl, G. 1982. Spineless-aristopedia: a homeotic gene that does not control the development of specific compartments in *Drosophila*. *Genetics* **102**:737-749.
- Strutt, H., and Paro, R. 1997. The polycomb group protein complex of *Drosophila melanogaster* has different compositions at different target genes. *Mol Cell Biol* **17**:6773-6783.
- Tu, W.Y., Huang, Y.C., Liu, L.F., Chang, L.H., and Tam, M.F. 2011. RPL12p affects the transcription of the PHO pathway high-affinity inorganic phosphate transporters and repressible phosphatases. *Yeast* **28**:481-493.
- Warner, J.R., and McIntosh, K.B. 2009. How common are extraribosomal functions of ribosomal proteins? *Mol Cell* **34**:3-11.
- Winter, S., Fischle, W., and Seiser, C. 2008. Modulation of 14-3-3 interaction with phosphorylated histone H3 by combinatorial modification patterns. *Cell Cycle* **7**:1336-1342.
- Yap, K.L., and Zhou, M.M. 2011. Structure and mechanisms of lysine methylation recognition by the chromodomain in gene transcription. *Biochemistry* **50**:1966-1980.
- Yap, K.L., Li, S., Muñoz-Cabello, A.M., Raguz, S., Zeng, L., Mujtaba, S., Gil, J., Walsh, M.J., and Zhou, M.M. 2010. Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. *Mol Cell* **38**:662-674.
- Zeng, L., and Zhou, M.M. 2002. Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Lett* **513**:124-128.
- Zhao, T., Heyduk, T., Allis, C.D., and Eissenberg, J.C. 2000. Heterochromatin protein 1 binds to nucleosomes and DNA in vitro. *J Biol Chem* **275**:28332-28338.

**DONNEES
COMPLEMENTAIRES A
L'ARTICLE**

Les résultats obtenus au cours de ma thèse m'ont permis de mettre en évidence l'interaction spécifique du chromodomaine de l'ETP Corto avec la protéine ribosomique RPL12 tri-méthylée sur la lysine 3. L'étude du transcriptome des disques imaginaux d'aile de larves de drosophile en condition de surexpression de *cortoCD* ou de *RPL12* montre une dérégulation des mêmes gènes dans les deux conditions, à savoir les gènes codant les RPs ainsi que les gènes de choc thermique. Ceci m'a conduit à débiter une analyse fonctionnelle de ces deux gènes. J'ai réalisé une analyse génétique de *RPL12* et des interactions entre *RPL12* et *corto*. Puis, j'ai étudié la fonction des protéines RPL12 et Corto en les inactivant par ARN interférence dans les cellules de drosophile et dans les disques d'aile. Enfin, j'ai identifié par CHIP deux cibles directes communes à Corto et RPL12 dans des disques imaginaux d'aile, *hsp70* et *RPS4*.

A



B

Transformant ID	Construct ID	Target	ON Targets	OFF Targets	CAN Repeats	Viability	Inserted chromosome	Hairpin length
32449	8701	RPL12	1	1	2	Sterile	2	373 bp
32450	8701	RPL12	1	1	2	Lethal	3	373 bp
109447	108734	RPL12	1	0	2	Viable	2*	177 bp

Figure 1. Description des trois lignées transgéniques permettant l'inactivation de *RPL12* par ARN interférence.

A Représentation schématique de la structure du gène *RPL12* et de ses transcrits (Source : FlyBase BLAST (<http://flybase.org/blast/>)). Les lignées transgéniques 32449 et 32450 ciblent les régions A et B. La lignée 109447 cible la région B.

B Tableau des lignées transgéniques permettant l'inactivation de *RPL12* par le système UAS-Gal4. Les *ON targets* représentent les gènes présentant un alignement parfait avec au moins 50% des 19-mer sens de la construction (soit 25% de tous les 19-mer), les *OFF targets* représentent les gènes qui présentent au moins un alignement parmi les 19-mers sens de la construction. Les transgènes sont insérés sur le chromosome II en position 22019296 (5' to CR33987). (*phiC31 ARNi Library*).

Source : VDRC (<http://stockcenter.vdrc.at>)

1 Analyses génétiques

1.A. Génétique de *RPL12*

Chez la drosophile, *RPL12* est un gène unique, situé sur le chromosome II en position 60B7. Trois transcrits ont été décrits codant une seule protéine de 165 acides aminés (Figure 1A). Des études portant sur l'inactivation de *RPL12* ont été menées chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Dans cet organisme, *RPL12* est codée par deux gènes dupliqués *RPL12A* et *RPL12B*, codant une protéine RPL12p unique. L'inactivation des deux paralogues *RPL12A* et *RPL12B* ralentit très fortement la croissance cellulaire mais n'est pas létale. Une analyse transcriptomique de ce double mutant montre que *RPL12* affecte la transcription des acteurs de la voie PHO (transport du phosphate inorganique) (Tu *et al.*, 2011). Comme mentionné dans l'introduction, d'autres auteurs ont utilisé la surexpression de formes étiquetées de RPL12 (Mitrovitch *et al.*, 2000 chez le nématode ; Plafker et Macara, 2002 dans des cellules de mammifères) et montré que RPL12 contrôle l'épissage de son propre transcrit (voir INTRODUCTION 4.2.1 et Figure 34). Nous avons étudié l'inactivation de *RPL12* par ARNi et sa surexpression chez la drosophile.

1.A.1. Perte de fonction de *RPL12*

Il n'existe pas de mutants de *RPL12* décrits à ce jour chez la drosophile, ce qui suggère que ce gène est haploinsuffisant, contrairement à ce qui a été observé chez *Saccharomyces cerevisiae*. Afin d'analyser la perte de fonction de *RPL12*, j'ai utilisé des lignées transgéniques de drosophile permettant son inactivation par ARNi. Trois lignées ARNi ciblant *RPL12* (*UAS-ARNi-RPL12*) ont été obtenues auprès du consortium VDRC (*Vienna Drosophila RNAi Center*) (Figure 1B). L'inactivation de *RPL12* en utilisant ces trois lignées et différents pilotes Gal4 ubiquitaires montre les mêmes phénotypes. Je ne présenterai donc que les résultats obtenus avec la lignée homozygote viable ne présentant pas de *OFF targets* (Lignée 109447). Sauf indication contraire, tous les croisements ont été réalisés à 25°C.

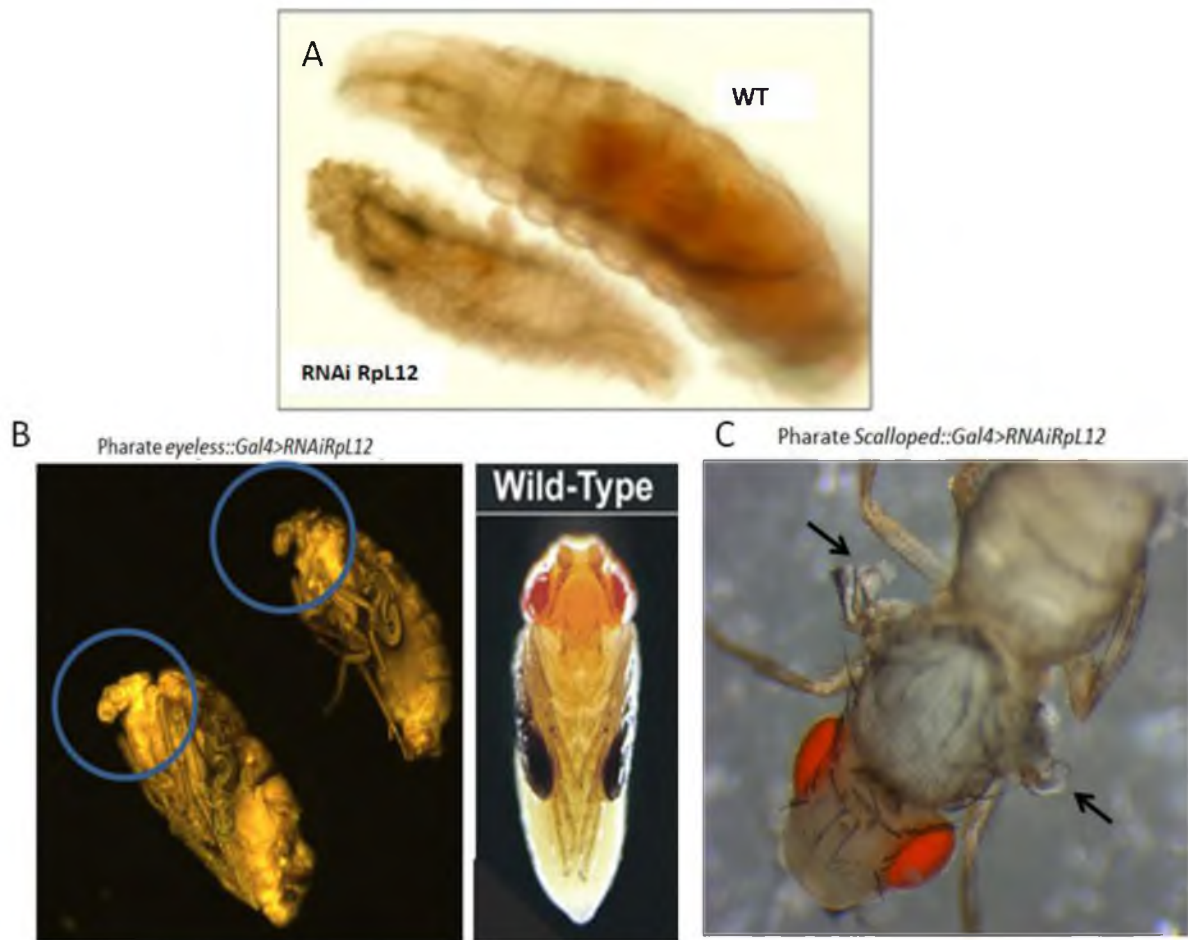


Figure 2 : Phénotypes engendrés par l'inactivation de *RPL12*

A Comparaison d'une larve de stade L1 sauvage (*WT*) et d'une larve ARNi *RPL12* (*da::Gal4>UAS-ARNi RPL12*)

B Inactivation de *RPL12* par le pilote *ey::Gal4*. Pharates *eyeless::Gal4>UAS-ARNi RPL12* (à gauche) et sauvage (à droite).

Le gène *eyeless* s'exprime essentiellement dans les yeux et dans le cerveau.

C Inactivation de *RPL12* par le pilote *sd::Gal4*. Pharate *scalloped::Gal4>UAS-ARNi RPL12*.

Le gène *scalloped* s'exprime dans la poche de l'aile, dans les trachées, les pattes, et d'autres organes internes.

L'étude de l'inactivation de *RPL12* par ARNi démontre que c'est un gène essentiel. En effet, l'inactivation ubiquitaire précoce de *RPL12* avec le pilote *daughterless::Gal4* (*da::Gal4 >UAS-ARNiRPL12*) induit une mortalité au 1^{er} stade larvaire. Après l'éclosion, les larves sont plus petites, peu mobiles et meurent rapidement (Figure 2A). Au cours du développement, l'inactivation de *RPL12* avec différents pilotes Gal4 tissus-spécifiques semble affecter la viabilité cellulaire. Par exemple, l'inactivation de *RPL12* dans les disques imaginaux d'œil en utilisant le pilote *eyeless::Gal4* (*ey::Gal4*) (également exprimé dans le cerveau embryonnaire) induit une létalité pupale. La dissection des pupes pour en extraire les pharates (individu adulte dans son cocon) montre l'absence totale de tête (Figure 2B). De même, l'inactivation de *RPL12* dans les disques imaginaux d'aile par le pilote *scalloped::Gal4* (*sd::Gal4*) à 25°C induit une létalité larvaire. En revanche, à 18°C, les individus se développent jusqu'au stade pupal; ils présentent une disparition presque complète des ailes (Figure 2C).

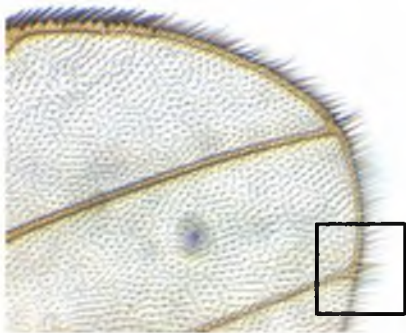
Ces résultats montrent que *RPL12* est indispensable pour la viabilité cellulaire et suggèrent qu'il est impliqué dans la croissance cellulaire, la prolifération cellulaire, et/ou l'apoptose.

1.A.2. Gain de fonction de *RPL12*

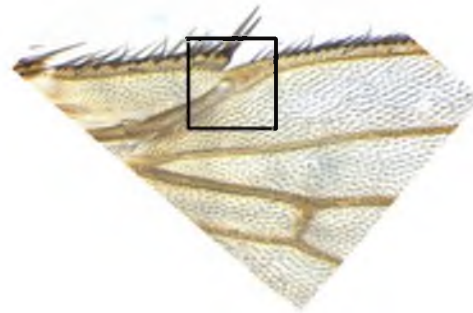
Ne disposant pas d'anticorps dirigés contre RPL12, j'ai réalisé différents outils génétiques permettant l'étude de *RPL12 in vivo*. J'ai généré des lignées de drosophiles transgéniques permettant la surexpression de *RPL12-Myc* (*UAS-RPL12-Myc*) (cf article) ainsi que de sa forme mutée *RPL12K3A* (*UAS-RPL12K3A-Myc*).

La surexpression ubiquitaire de *RPL12* (*da::Gal4 >UAS-RPL12-Myc*) ne produit pas de phénotype externe visible, mais le temps de développement est raccourci d'environ 20h à 25°C par rapport aux individus sauvages. Les adultes ont une taille normale. La surexpression de la forme mutée K3A ne présente pas non plus de phénotype externe. La durée du développement des individus *da::Gal4 >UAS-RPL12K3A-Myc* n'a pas encore été mesurée.

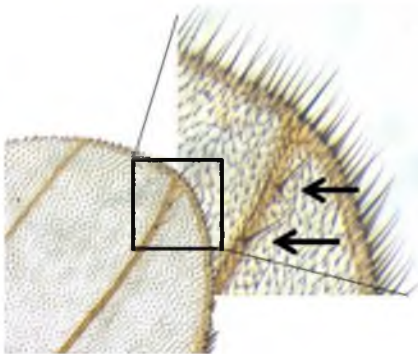
Aile femelle *w¹¹¹⁸*



Aile mâle *w¹¹¹⁸*



Aile femelle *da::Gal4>RpL12Myc ; FHCortoCD*



Aile mâle *da::Gal4>RpL12Myc ; FHCortoCD*

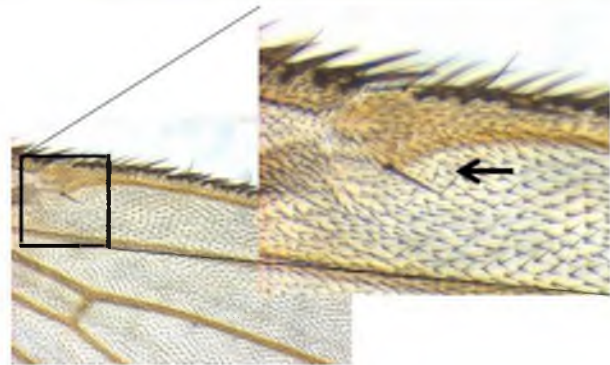


Figure 3 : Surexpression de *corto* et *RPL12* par *da::Gal4>RPL12Myc ; FHCortoCD*.

Panneaux du haut : Ailes de phénotype sauvage.

Panneaux du bas : Ailes d'individus *da::Gal4>RPL12Myc ; FHCortoCD* présentant des soies ectopiques sur l'extrémité des veines. La zone encadrée en noir représente un zoom sur le phénotype observé.

1.A.3. Interaction génétique entre *Corto* et *RPL12*

La surexpression simultanée de *RPL12* et du chromodomaine de *Corto* (*da::Gal4>UAS-FH-cortoCD; UAS-RPL12-Myc*) produit des phénotypes identiques à ceux générés par la surexpression du chromodomaine seul (cf article). On peut toutefois noter des phénotypes alaires discrets comme l'apparition de soies ectopiques sur les extrémités des veines (Figure 3). Ces phénotypes, qui n'existent ni chez les individus surexprimant *RPL12*, ni chez les individus surexprimant *cortoCD*, confirment l'existence d'une interaction entre les deux gènes.

1.B. Caractérisation moléculaire des mutations *corto*⁴²⁰ et *corto*^{L1}

L'analyse des données de RNAseq obtenues à partir de disques d'aile d'individus homozygotes mutants pour *corto* (combinaison hétéroallélique *corto*⁴²⁰/*corto*^{L1}) nous a permis de caractériser précisément la nature moléculaire des mutations des deux allèles de *corto* utilisés.

1.B.1. Caractérisation de la mutation *corto*⁴²⁰

L'allèle *corto*⁴²⁰ a été initialement décrit comme une délétion unilatérale de 16 Kb issue de l'excision imparfaite de l'élément *P* inséré 20 bp en amont du TSS de *corto* dans la lignée *A46* (Figure 4) (Kodjabachian *et al.*, 1998).

Afin de définir l'étendue exacte de la délétion du mutant *corto*⁴²⁰, j'ai réalisé des PCR sur de l'ADN génomique extrait d'individus hétéroalléliques *corto*⁴²⁰/*Df(3R)6-7* (fragments de PCR 1 à 12, Figure 4B). La déficience *Df(3R)6-7* couvre la région génomique 82E à 82F et contient *corto* (en 82E). Tous les fragments de PCR correspondants aux régions 1 à 12 sont amplifiés à partir d'ADN génomique sauvage (lignée de référence *w*¹¹¹⁸). En revanche, seuls les fragments 1 et 12 sont amplifiés à partir de l'ADN génomique *corto*⁴²⁰/*Df(3R)6-7* (Figure 4C). Ce résultat suggère que la délétion du mutant *corto*⁴²⁰ chevauche tout ou partie des régions 2 à 11.

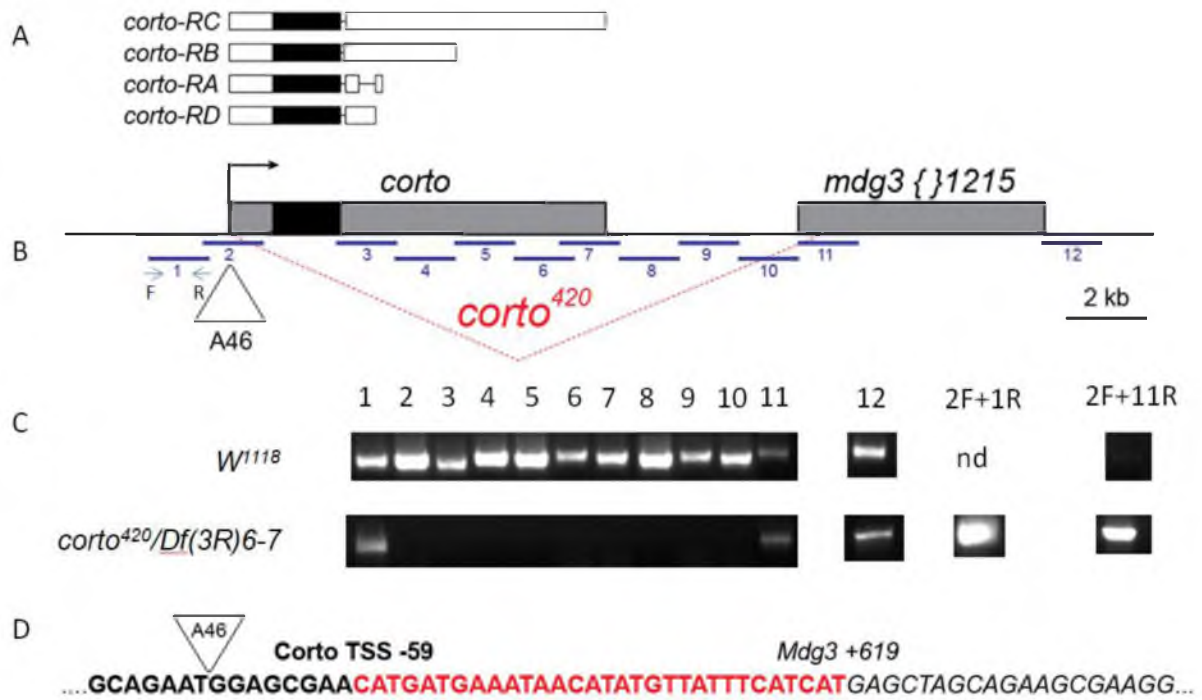


Figure 4 : Caractérisation du mutant *corto*⁴²⁰

A Représentation des différents transcrits de *corto*, avec les régions codantes en noir

B Le triangle représente le site d'insertion de l'élément P dans la lignée *A46* ayant servi à générer le mutant *corto*⁴²⁰. La délétion est indiquée en rouge. Les barres bleues numérotées correspondent aux différents amplicons de PCR sur le gène *corto* (primers F (Forward) et R (Reverse)). Chaque amplicon chevauche les amplicons voisins de 100 à 250 bp.

C Gel d'agarose présentant les amplicons de PCR réalisées à partir d'ADN génomique de mouche adulte *w*¹¹¹⁸ ou *corto*⁴²⁰/*Df*(3R)6-7. Les amplicons 1 à 12 ont une taille comprise entre 1500 et 1600 bp, l'amplicon 2F+1R a une taille de 200 bp et l'amplicon 2F+11R détecté uniquement dans l'ADN de *corto*⁴²⁰/*Df*(3R)6-7 à une taille de 1200 bp environ.

D Le séquençage de l'amplicon 2F+11R permet d'obtenir les bornes précises de la délétion : de 59 bp en amont du TSS de *corto* jusqu'à 619 bp en aval de *mdg3*{ }1215. Une séquence de 31 bases est insérée à la place de la délétion (notée en rouge).

Afin de caractériser précisément les bornes de la délétion du mutant *corto*⁴²⁰, j'ai réalisé une amplification avec les amorces sens de la région 2 et antisens de la région 11 et j'ai séquencé cet amplicon de 1200 bp (Figure 4D). J'ai ainsi montré que la mutation *corto*⁴²⁰ correspond à une délétion de 14209 nt de la position -59 nt en amont du TSS de *corto*, jusqu'à +619 nt du rétrotransposon *mdg3}{1215* (c'est à dire environ 400 nt après le LTR 5'). J'ai également mis en évidence la présence d'une séquence de 30 nt, non identifiée, entre ces deux bornes (en rouge dans la figure 4D).

Le mutant *corto*⁴²⁰ est donc un mutant nul.

1.B.2. Caractérisation de la mutation *corto*^{L1}

L'allèle *corto*^{L1} est issu d'une mutagenèse à l'EMS; il est génétiquement défini comme un amorphe (Mouchel-Vielh *et al.*, 2011).

L'alignement des séquences obtenues par RNAseq à partir de la combinaison hétéroallélique *corto*⁴²⁰/*corto*^{L1} et du génome de référence (*FB2011_06 Dmel Release 5.38* de juin 2011) met en évidence quelques polymorphismes silencieux (différences de nucléotides par rapport à la souche de référence n'entraînant pas de changement d'acide aminé) dont certains sont localisés dans la séquence codante (Figure 5). De plus, la combinaison hétéroallélique *corto*⁴²⁰/*corto*^{L1} montre l'apparition d'un codon non-sens à la position 73 [changement de CAA (Q) en TAA (Stop)]. Afin de vérifier ce résultat, j'ai amplifié cette région à partir d'ADN génomique d'individus *corto*^{L1}/*Df3R(6-7)* et j'ai séquencé le produit de PCR. J'ai ainsi confirmé la présence d'une mutation ponctuelle C>T, non-sens, à la position +73 par rapport au TSS de *corto*.

Le mutant *corto*^{L1} est donc un mutant amorphe, n'exprimant qu'un polypeptide correspondant aux 24 premiers acides aminés de Corto.

Ces résultats corroborent les expériences de RT-PCR quantitative réalisées à partir d'ADNc provenant de disques imaginaires d'aile issus de larves de 3^{ème} stade *corto*⁴²⁰/*Df(3R)6-7* et *corto*^{L1}/*Df(3R)6-7* qui montrent l'absence de transcrits dans la 1^{ère} combinaison mais pas dans la seconde (Figure 6) (Mouchel-Vielh *et al.*, 2011).

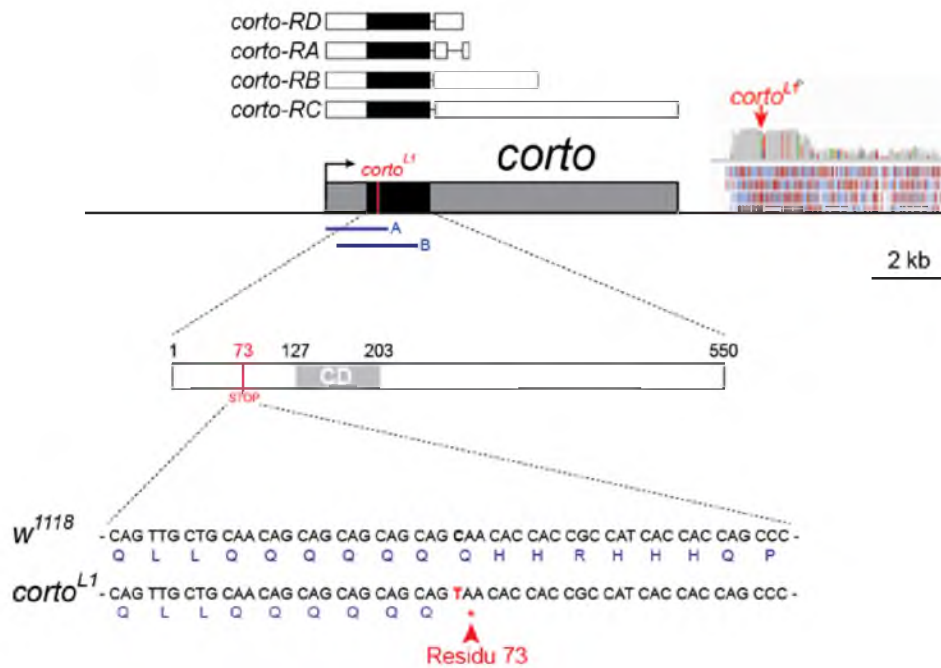


Figure 5 : Caractérisation du mutant *corto*^{L1}

Panneau du haut : région chromosomique 3R :914,075..874,433[-]. Représentation des différents transcrits *corto*, avec la région traduite en noir. A droite, profil obtenu par RNAseq indiquant les polymorphismes (lignes de couleur sur profil gris). Panneau du bas : séquence de la région comportant le codon muté. Les PCR réalisées pour l'étude de cette région sont notées en bleu(A, B).

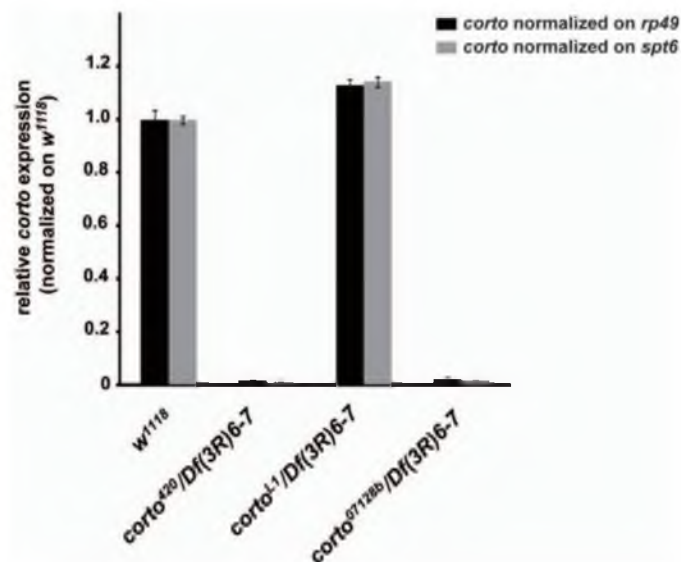


Figure 6 : Quantification des transcrits *corto*

RT-PCR quantitative à partir de disques imaginaires d'aile de *corto*⁴²⁰/Df(3R)6-7, *corto*^{L1}/Df(3R)6-7 et *corto*^{07128b}/Df(3R)6-7 au 3^{ème} stade larvaire. Tiré de Mouchel-Vielh *et al.*, 2011.

1.B.3. Anomalie de transcription dans les mutants *corto*

L'alignement des séquences obtenues par RNAseq met en évidence, dans la combinaison hétéroallélique mutante *corto*⁴²⁰/*corto*^{L1}, la présence de transcrits en aval du rétrotransposon *mdg3*{1215}, alors que cette même zone n'est pas transcrite dans les individus contrôles (Figure 7).

L'allèle *corto*^{L1} n'ayant pas d'autre mutation que celle qui conduit à l'introduction d'un codon stop en +73, nous faisons l'hypothèse que ces transcrits sont produits à partir de l'allèle *corto*⁴²⁰. Cet allèle étant une déficience qui couvre le site de terminaison de la transcription de *corto*, il est possible que les séquences de terminaison de la transcription localisées dans les LTR du rétrotransposon *mdg3*{1215} ne soient pas suffisantes pour arrêter la transcription initiée à partir du promoteur de *corto*. Une analyse par q-RT-PCR de cette région, à partir d'individus *corto*⁴²⁰/*Df*(3R)6-7, permettrait de vérifier notre hypothèse.

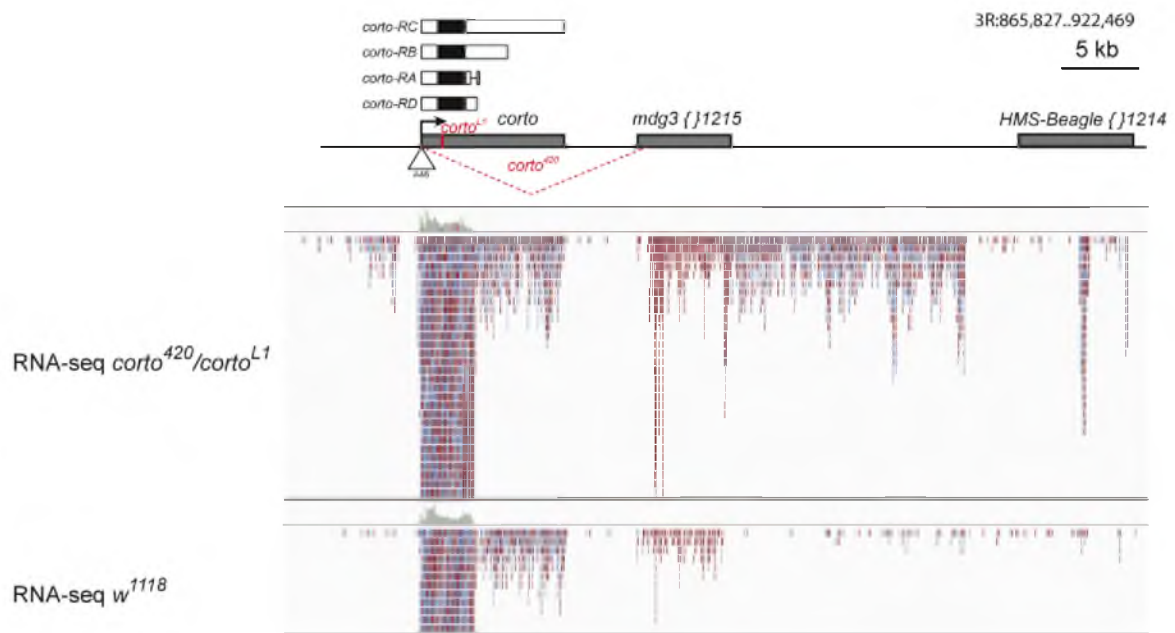


Figure 7 : Etendue des transcrits produits à partir du promoteur de *corto* dans la combinaison hétéroallélique *corto*⁴²⁰/*corto*^{L1}.

Alignement par IGV (*Integrative Genomics Viewer*) des séquences obtenues par RNAseq sur la région de *corto*. Noter que la région en 3' du rétrotransposon *mdg3*{1215} n'est pas transcrite dans la lignée sauvage.

2 Analyses fonctionnelles

2.A. Analyse de l'inactivation de *RPL12* et *corto* par RNAi dans les cellules S2

2.A.1. Inactivation de *RPL12*

L'inactivation de *RPL12* étant létale à un stade larvaire précoce, j'ai analysé par RT-PCR quantitative l'expression de certains gènes cibles potentiels dans les cellules S2 de drosophile traitées par des ARNi ciblant *RPL12*.

Dans un premier temps, j'ai construit des vecteurs permettant la synthèse *in vitro* d'ARN double brin pour *RPL12*, *RPL29* et *GFP* (contrôles négatifs). Le gène *RPL29* a été choisi comme témoin négatif car Dai et coll. ont montré que l'ARNi de *RPL29* ne modifie pas l'expression des gènes d'ARNt et de l'ARNr 5S (Dai *et al.*, 2010). Dans un premier temps, j'ai mis au point les conditions expérimentales de l'inactivation par ARNi de *RPL12* (quantité d'ARN double brin, temps de traitement, mortalité cellulaire,...). Après 7 jours de traitement, le nombre de cellules dans les ARNi *RPL12* étant plus faible que dans les cellules contrôles ARNi *RPL29* et *GFP*, les extractions ont été réalisées à partir d'un même nombre de cellules. Les résultats de PCR quantitative ont été normalisés par rapport au gène de référence *GAPDH* et rapportés à la condition de référence contrôle ARNi *GFP*. Les calculs ont été réalisés par la méthode de Pfaffl (Pfaffl, 2001).

L'inactivation de *RPL12* et de *RPL29* conduit à une diminution significative du nombre de transcrits de *RPL12* et de *RPL29* respectivement, confirmant l'inactivation spécifique de chacun des gènes cibles (Figure 8A).

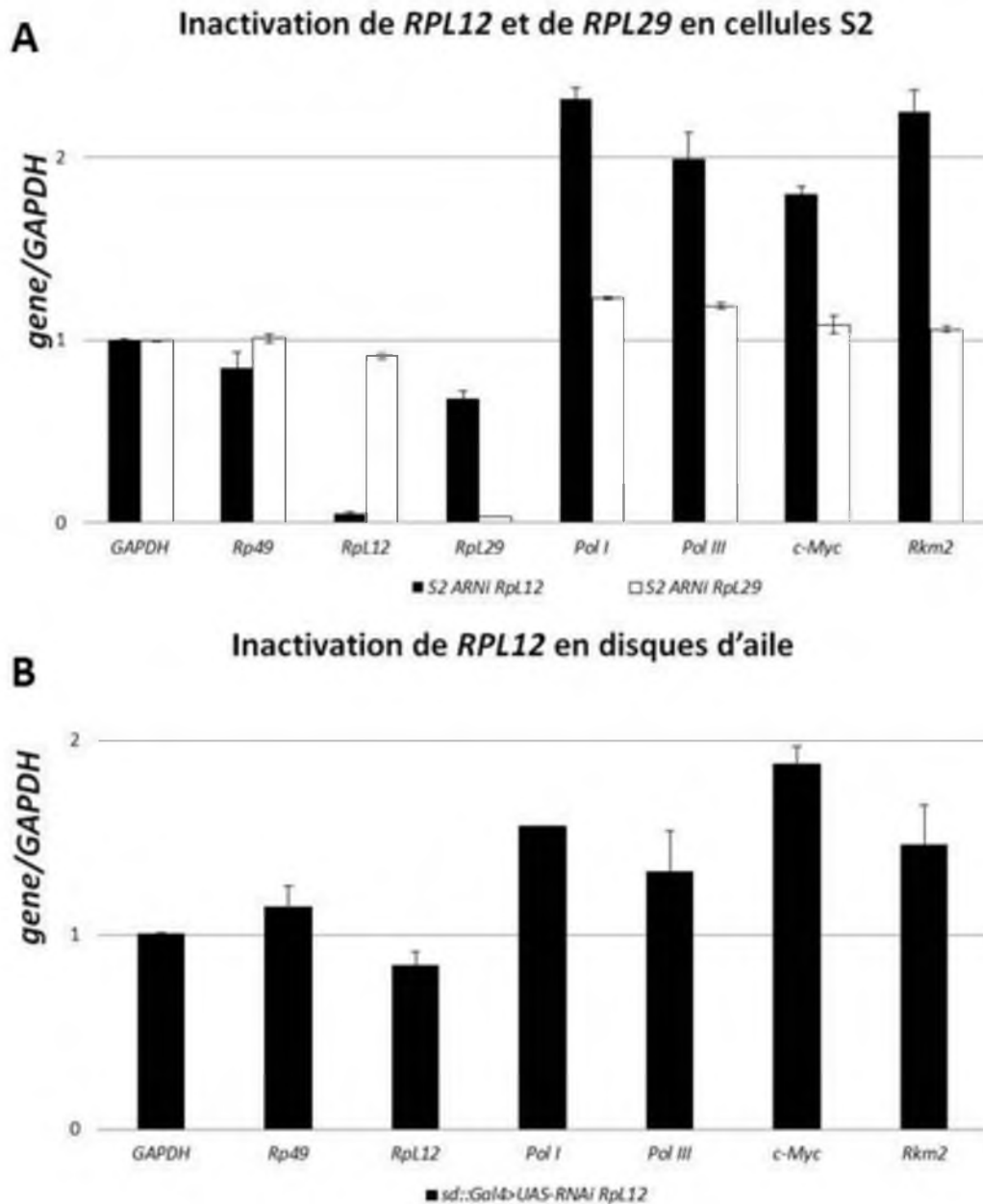


Figure 8 : Expression de différents gènes en condition d'inactivation de *RPL12* par ARNi.

A Niveau d'expression de différents gènes mesuré dans les cellules S2 de drosophile. Les niveaux d'expression sont mesurés par RT-qPCR et normalisés sur le gène *GAPDH* puis sur l'ARNi GFP comme groupe de référence, avec les barres d'erreur représentant la déviation standard de trois répliquats.

B Niveau d'expression de différents gènes mesuré dans les disques d'ailes de larves de 3^{ème} stade *sd::gal4>UAS-ARNi-RPL12* élevées à 18°C. Les niveaux d'expression sont mesurés par RT-qPCR et normalisés sur le gène *GAPDH* puis sur le génotype *UAS-ARNi RPL12Myc/+* comme groupe de référence, avec les barres d'erreur représentant la déviation standard de trois répliquats.

L'inactivation de *RPL29* perturbe peu le taux d'expression des gènes étudiés (*Rp49*, *ARN Pol I*, *ARN Pol III*, *c-Myc*, *Rkm2*). En revanche, l'inactivation de *RPL12* ne modifie pas l'expression de *RPL29* mais augmente d'environ 2 fois le niveau d'expression des gènes *c-Myc*, *ARN Pol I* et *ARN Pol III* qui sont impliqués dans la régulation de la biogenèse des ribosomes. De plus, le gène *Rkm2* (*CG33230*), codant l'homologue de la lysine-méthyltransférase responsable de la triméthylation de RPL12 sur la lysine 3 chez la levure, est également surexprimé. Ces résultats suggèrent que *RPL12* réprime les gènes *ARN Pol I*, *ARN Pol III*, *c-Myc*, et *Rkm2*.

2.A.2. Inactivation de *RPL12* dans les disques d'aile

Afin de confirmer ces résultats, j'ai réalisé la même analyse sur des ARN extraits de disques imaginaux d'aile de larves de 3^{ème} stade *sd::gal4>UAS-ARNiRPL12* élevées à 18°C. En effet, comme indiqué précédemment, le croisement *sd::gal4>UAS-ARNiRPL12* est létal à 25°C, mais les individus atteignent le stade pharate à 18°C, ce qui nous a permis de disséquer des disques d'ailes de 3^{ème} stade larvaire afin d'étudier le niveau d'expression des mêmes gènes que ceux étudiés dans les cellules S2. La normalisation est réalisée sur le génotype contrôle *UAS-ARNi RPL12/+*.

Les résultats de l'inactivation de *RPL12* dans les disques d'aile (Figure 8B) sont similaires à ceux obtenus dans les cellules S2 en culture, bien que l'amplitude soit plus faible. Ceci peut s'expliquer, d'une part, par la faible expression de l'*ARNi RPL12* à 18°C (comme le suggère la faible inactivation de *RPL12* dans les disques *sd::gal4>ARNi RPL12*), d'autre part car le pilote *sd::Gal4* utilisé ne s'exprime que dans une partie du disque imaginal d'aile : la poche de l'aile. Ainsi, les ARN extraits proviendraient d'un mélange d'ARN de cellules sauvages et de cellules dans lesquelles *RPL12* est inactivé.

Les résultats de l'inactivation de *RPL12* dans les disques d'aile confirment donc ceux obtenus dans les cellules S2 en culture

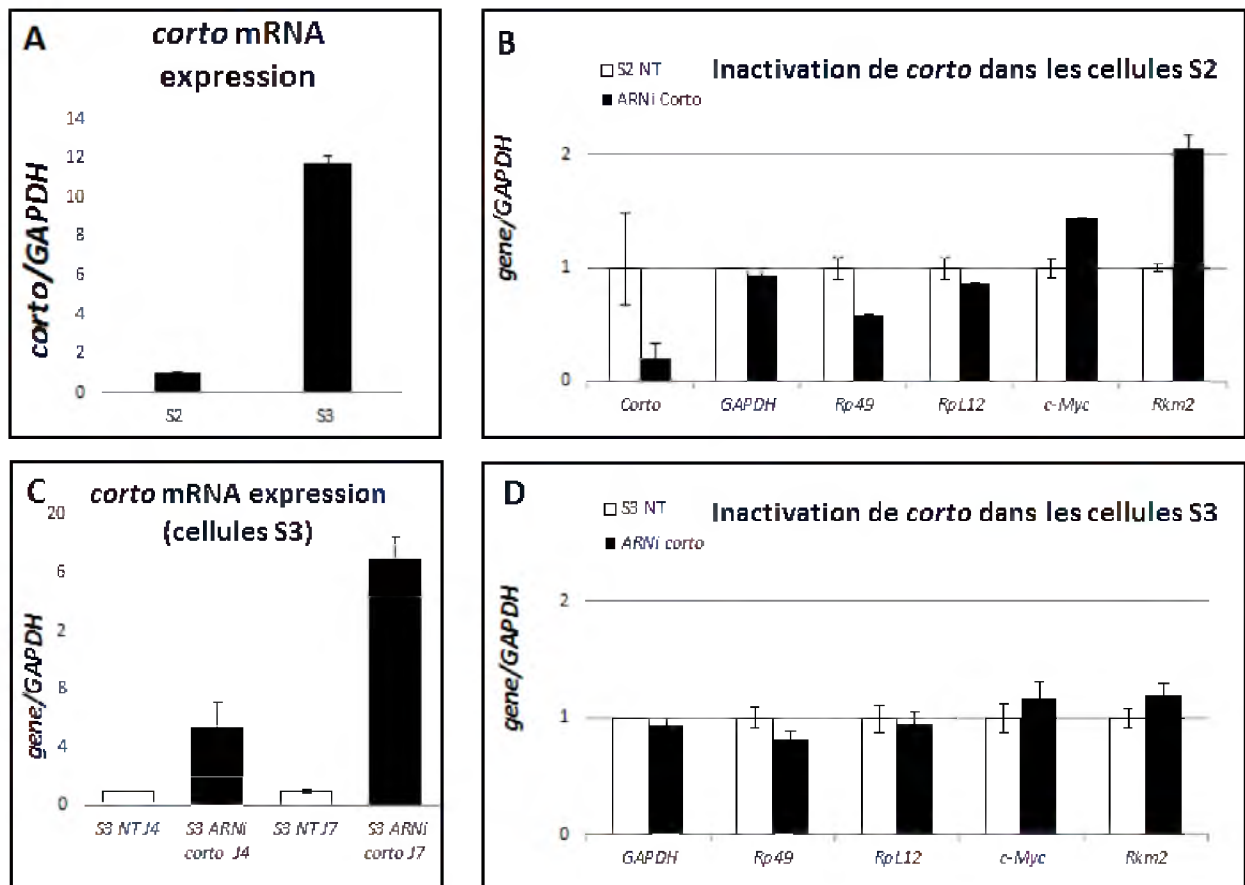


Figure 9 : Expression de différents gènes en condition d'inactivation de *cortico* par ARNi.

A Comparaison du niveau d'expression de *cortico* dans les cellules S3 par rapport aux cellules S2, normalisé sur *GAPDH*.

B Niveau d'expression de différents gènes mesurés dans les cellules S2 de drosophile traitées par ARNi ciblant l'inactivation de *cortico*. Le niveau d'expression est mesuré par RT-qPCR et normalisé sur le gène *GAPDH* puis sur les cellules S2 non traitées comme groupe de référence, avec les barres d'erreur représentant la déviation standard de deux répliquats.

C Niveau d'expression de *cortico* dans les cellules S3 traitées par ARNi ciblant l'inactivation de *cortico* à 4 puis 7 jours de traitement (J4 et J7 respectivement) comparé au niveau d'expression en cellules S3 non traitées (S3 NT) (S3 ARNi cortico : barres noires) ou non traitées (S3 NT : barres blanches), normalisé sur *GAPDH*.

D *idem* **B** dans les cellules S3 en condition ARNi *cortico*.

2.A3. Inactivation de *corto* en cellules S2

Les cellules S2 et S3 de drosophile (Schneider-2 et 3) dérivent de cellules embryonnaires (Schneider, 1972). De façon surprenante, *corto* est beaucoup plus fortement exprimé dans les cellules S3 que dans les cellules S2 (Figure 9A). L'inactivation de *corto* dans les cellules S2 donne des résultats similaires à ceux obtenus avec l'inactivation de *RPL12* pour les gènes *c-Myc* et *Rkm2* (Figure 9B) ce qui suggère que *corto* maintient la répression de ce gène dans les cellules S2.

2.A4. Inactivation de *corto* en cellules S3

De façon surprenante, l'étude de l'expression de *corto* dans les cellules S3 dans lesquelles *corto* est inactivé montre qu'il augmente fortement (Figure 9C), suggérant que l'inactivation de *corto* dans ce type cellulaire activerait la transcription du gène. Ce résultat suggère que *corto* s'autorégule négativement dans ces cellules. Nous n'avons pas pu tester l'augmentation ou la diminution de la protéine Corto en Western Blot, la quantité de cellules après 7 jours de traitement étant trop faible. L'inactivation de *corto* ne semble pas être efficace en cellules S3, en effet, le niveau d'expression des gènes testés ne varie pas par rapport au contrôle.

2.B. Autorégulation de *corto*

La surexpression de *cortoCD* dans les cellules S2 conduit à la diminution du nombre de transcrits *corto* (par comparaison avec les cellules non transfectées) (Figure 10A). Les amorces de q-PCR utilisées n'amplifient pas la région correspondant au chromodomaine, seuls les transcrits *corto* endogènes sont mesurés. Le même résultat est obtenu en surexprimant *cortoCD* dans les disques d'aile sous le contrôle du pilote *sd::Gal4* (Figure 10B) : la quantité de transcrits *corto* endogène diminue. Ceci confirme que Corto réprimerait la transcription de son propre gène et suggère que la surexpression de *cortoCD* se conduit comme un dominant négatif.

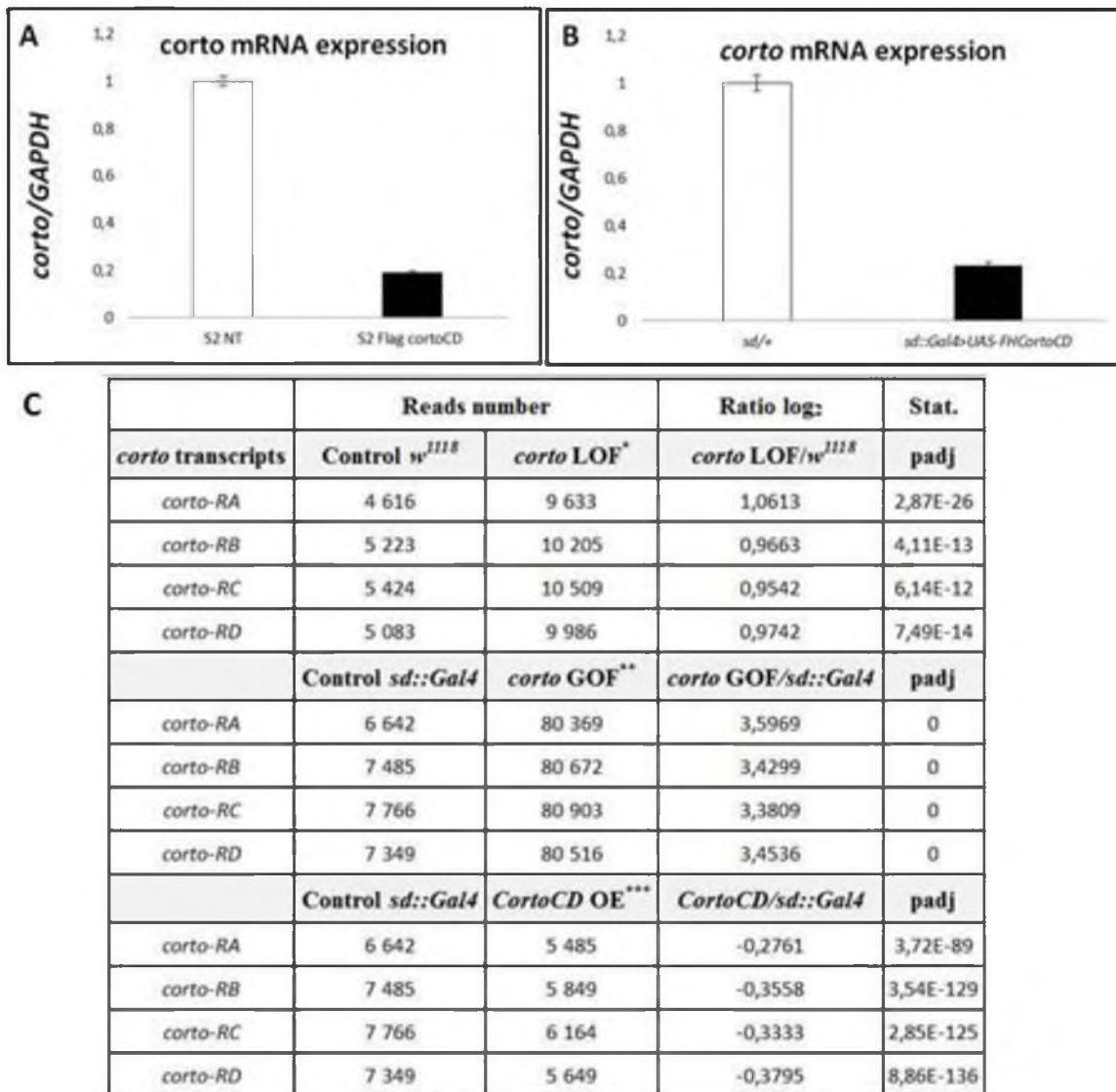


Figure 10 : Quantification des transcrits *corto* LOF ou GOF

A Niveau d'expression de *corto* en condition de surexpression de *cortoCD* dans les cellules S2 transfectées par le vecteur *Act::Flag-cortoCD* (promoteur Actine; étiquette Flag) comparé au niveau d'expression dans les cellules S2 non transfectées (S2 NT).

B Niveau d'expression de *corto* en condition de surexpression de *cortoCD* dans les disques d'aile comparé au niveau d'expression dans les individus sauvages (*sd::Gal4/+*).

C Dérégulation des transcrits de *corto* (RNAseq), * *corto* LOF : combinaison hétéroallélique *corto^{L1}/corto⁴²⁰*; ** *corto* GOF : *sd::Gal4>UAS-Corto*, ****cortoCD* OE: *sd::Gal4>UAS-cortoCD* ; padj : adjusted *p*-value.

Dans ce contexte, le chromodomaine pourrait entrer en compétition avec la protéine Corto endogène pour la régulation de son propre promoteur. Les séquences flanquant le chromodomaine étant absentes, le recrutement des partenaires de Corto n'aurait pas lieu.

Les données de RNAseq de la combinaison hétéroallélique *corto*⁴²⁰/*corto*^{L1} (Figure 10C), montrent une augmentation des transcrits *corto* (par rapport au témoin *w*¹¹¹⁸). Rappelons que dans ces conditions, seul l'allèle *corto*^{L1} peut produire des transcrits, l'allèle *corto*⁴²⁰ étant une délétion. On observe donc une surproduction de transcrits alors qu'il n'y a plus qu'une seule copie du gène. Lorsque l'on surexprime *corto* (*sd::Gal4>UAS-corto*), on observe une augmentation du nombre de transcrits *corto*, correspondant probablement en grande partie aux transcrits du transgène (qui ne sont pas différenciables des transcrits endogènes). En revanche, la surexpression du chromodomaine de *corto* (*sd::Gal4>UAS-cortoCD*) induit une diminution du nombre de transcrits *corto* endogènes (par rapport au témoin *sd::Gal4/+*). Ces résultats confirment l'autorégulation négative de *corto*.

2.C. Caractérisation de cibles directes de Corto et RPL12 par XChIP

Afin d'étudier les cibles transcriptionnelles directes de Corto et RPL12, j'ai réalisé des expériences de XChIP (Immunoprécipitation de la chromatine fixée au paraformaldéhyde) à partir de disques imaginaux d'aile exprimant les formes étiquetées RPL12-Myc et FH-CortoCD (*sd::Gal4>UAS-RPL12-Myc* et *sd::Gal4>UAS-FH-cortoCD*).

Les données que je présente dans cette partie, obtenues à partir de *sd::Gal4>UAS-RPL12Myc*, sont préliminaires et devront être validées ultérieurement.

Après avoir mis au point le protocole de XChIP sur les disques d'aile, adapté d'un protocole publié (Perez-Lluch *et al.*, 2011), j'ai étudié la fixation de RPL12-Myc (IP Myc) et de FH-CortoCD (IP HA). En parallèle, j'ai également testé la distribution de l'ARN polymérase II phosphorylée sur la sérine 2 du CTD (généralement associée à l'élongation de la transcription) ou sur la sérine 5 du CTD, (IP RNAPIISer2p et IP RNAPIISer5p, respectivement). Une sur-représentation de Ser5p par rapport Ser2p est généralement associée à la pause transcriptionnelle (voir chapitre 3.2.3).

J'ai choisi d'analyser les gènes les plus surexprimés quand *cortoCD* ou *RPL12* sont surexprimés (voir données de RNAseq Annexe 6), soit, *RPS4*, qui apparaît comme le plus surexprimé parmi l'ensemble des RPs dérégulées, et *hsp70*, qui curieusement est surexprimé en absence de choc thermique.

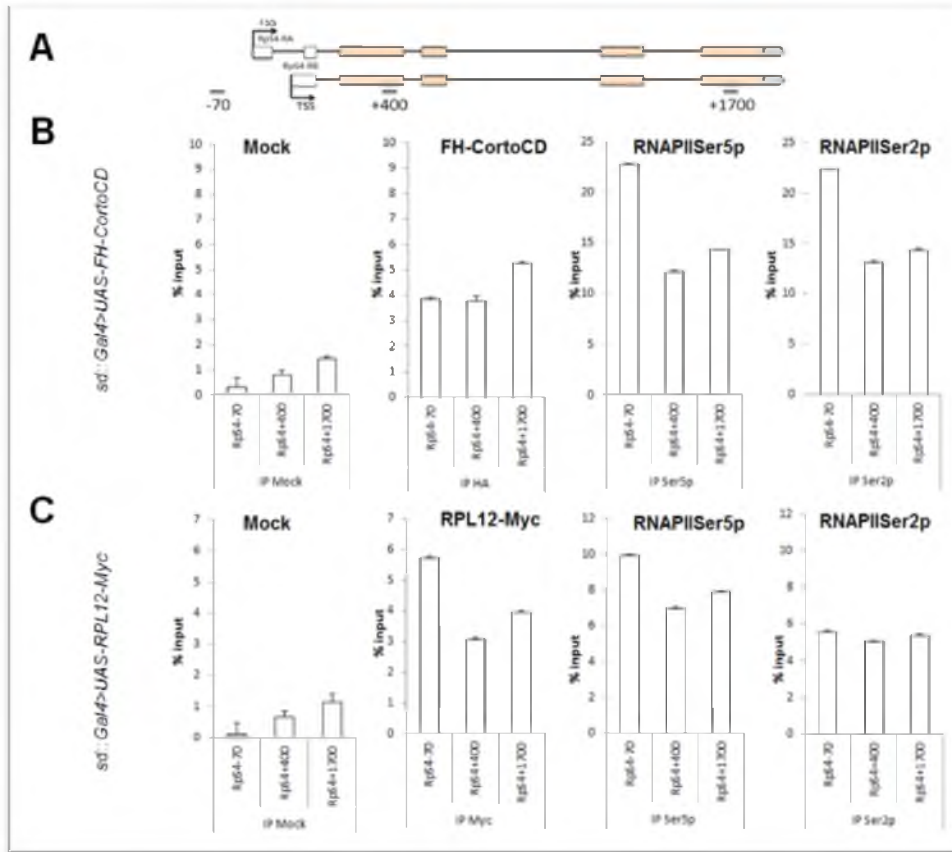


Figure 11 : CortoCD et RPL12 sont enrichis sur le gène *RPS4*

A Représentation schématique du gène *RPS4* avec les amorces utilisées.

B XChIP Mock, anti-HA, anti-RN polymérase II Ser2ph et Ser5ph en disques d'aile de génotype *sd::Gal4>UAS-FHcortoCD*, détection de la fixation par qPCR sur les sites -70, +400 et +1700 de la cible *RPS4*.

C XChIP Mock, anti-Myc, anti-RN polymérase II Ser2p et Ser5p sur les disques d'aile de génotype *sd::Gal4>UAS-RPL12Myc*, détection de la fixation par qPCR sur les sites -70, +400 et +1700 de la cible *RPS4*.

Les primers utilisés pour *RPS4* ont été dessinés avec le logiciel primer3 (voir liste ci-dessous).

RPS4-70s ATTGATACAGGGGCTGAGGA

RPS4-70a CAGGGTTACTTTTGCGAGGA

RPS4TSS+400s CCTGGTTAAGGTCGATGGAA

RPS4TSS+400a ATGTAGCCAGCGGGATAGG

RPS4TSS+1700s AAGGACTCGCAAGGTCATGT

RPS4TSS+1700a CCAATGATGAACACGTTGGT

2.C.1. Cible RPS4

Dans les disques d'aile *sd ::Gal4>UAS-FH-cortoCD* et *sd ::Gal4>UAS-RPL12-Myc*, le gène *RPS4* est surexprimé. Afin d'analyser la distribution de la fixation de RPL12, du chromodomaine de Corto et de l'ARN polymérase II par XChIP, j'ai étudié le promoteur de *RPS4* (-70 du TSS) ainsi que deux régions dans le corps du gène (+450 et +1700 par rapport au TSS) par qPCR (Figure 11A).

Le profil de fixation de l'ARN polymérase II (formes Ser5p et Ser2p) sur *RPS4* correspond à celui d'un gène transcrit, à savoir un enrichissement sur le promoteur et sur le corps du gène. CortoCD et RPL12 ont des profils de fixation identiques : elles sont uniformément présentes sur *RPS4*, sans enrichissement notable sur le promoteur, suggérant plutôt un rôle dans l'élongation de la transcription (Figure 11).

2.C.2. Cible HSP70

En absence de choc thermique, le gène *hsp70* est en pause transcriptionnelle (Boehm *et al.*, 2003). Il est connu que RPL32 se fixe sur les *loci* des gènes de choc thermique sur les chromosomes polytènes et s'y accumule au cours du choc thermique. Les RPs co-localisant en de multiples sites sur les chromosomes polytènes, ceci suggère que *hsp70* pourrait également être une cible directe de RPL12 (Brognia *et al.*, 2002 voir Figure 35E en introduction). Ainsi, j'ai analysé la fixation de RPL12 et de CortoCD sur le gène *hsp70* avant et après choc thermique.

Dans les cellules S2, le gène *hsp70* est exprimé très faiblement à température ambiante (Figure 12A); son expression est 2 fois plus importante après 5 minutes de choc thermique, et 7 fois après 20 minutes de choc thermique (Petesch et Lis, 2012). De façon intéressante, la surexpression de *RPL12* et de *cortoCD* dans les disques d'aile augmente l'expression de *hsp70* après choc thermique (Figure 12B).

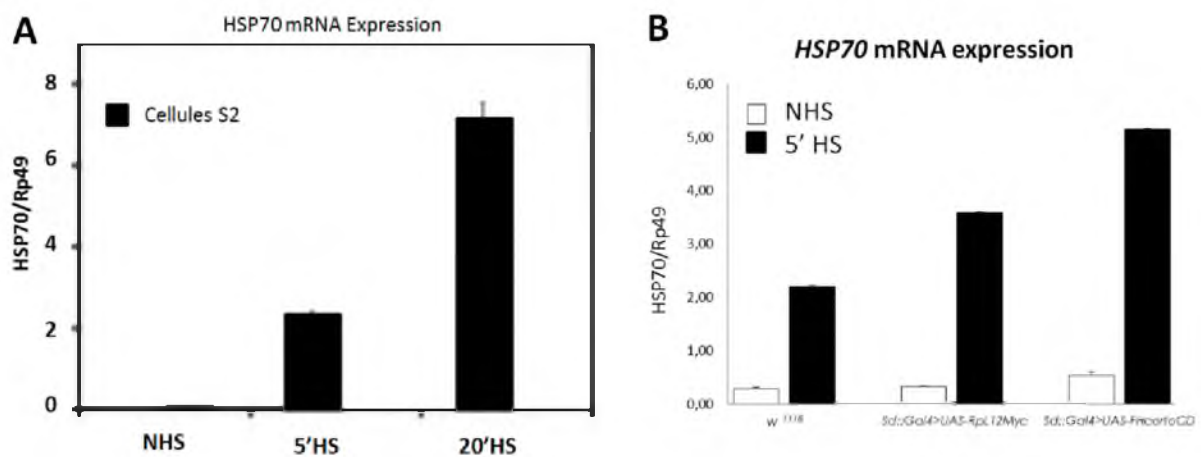


Figure 12 : Expression du gène *hsp70* après un choc thermique.

A Niveau d'expression de *hsp70* après 0, 5, et 20 minutes de choc thermique (HS) mesurés dans les cellules S2 de drosophile. Les niveaux d'expression de *hsp70* sont mesurés par RT-qPCR et normalisés sur le gène *Rp49* avec les barres d'erreur représentant la déviation standard à la moyenne de trois répliquats. D'après Petesch et Lis, 2012.

B Niveau d'expression de *hsp70* après 0 (NHS barres blanches) ou 5 minutes (HS barres noires) de choc thermique mesurés dans les disques d'aile de chaque génotype (*w¹¹¹⁸*, *sd::Gal4>UAS-RPL12Myc* et *sd::Gal4>UAS-FH-cortoCD*). Les niveaux d'expression des gènes sont mesurés par RT-qPCR et normalisés sur le gène *Rp49* avec les barres d'erreur représentant la déviation standard à la moyenne de deux répliquats.

Dans les disques d'aile de 3^{ème} stade larvaire de génotype *sd::Gal4>UAS-FH-cortoCD*, on peut noter que l'ARN Polymérase II Ser5p est particulièrement enrichie en position +58 du gène *hsp70*, site correspondant au site de pause de la polymérase (voir INTRODUCTION 3.2.2). Après 5 minutes de choc thermique, on observe une augmentation des deux formes de l'ARN Polymérase II dans les régions transcrites du gène liée à l'augmentation du taux de transcription (Figure 13).

En absence de choc thermique (no HS : *no heat shock*), CortoCD et RPL12 sont présentes sur *hsp70*, principalement fixées sur le corps du gène (Figure 13). Après choc thermique (5 min HS), on remarque une augmentation significative de la fixation de CortoCD sur *hsp70*, avec un fort enrichissement vers l'extrémité 3' du gène (régions transcrites). L'analyse de la présence de RPL12 sur *hsp70* avant et après choc thermique n'a pas encore été réalisée.

Ces données et l'ensemble de nos données d'interactions génétiques et moléculaires suggèrent fortement que ces CortoCD et RPL12 interagissent sur la chromatine. *hsp70* et *RPS4* sont des cibles communes aux deux protéines. Les profils de fixation de Corto et RPL12, très similaires à celui des deux formes de l'ARN Polymérase II, montrent un enrichissement dans le corps des gènes, suggérant un rôle dans l'élongation de la transcription. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par immunomarquage des chromosomes polytènes (cf. Article) et renforcent l'hypothèse d'une implication de Corto et/ou de RPL12 dans la transition pause/élongation de la transcription.

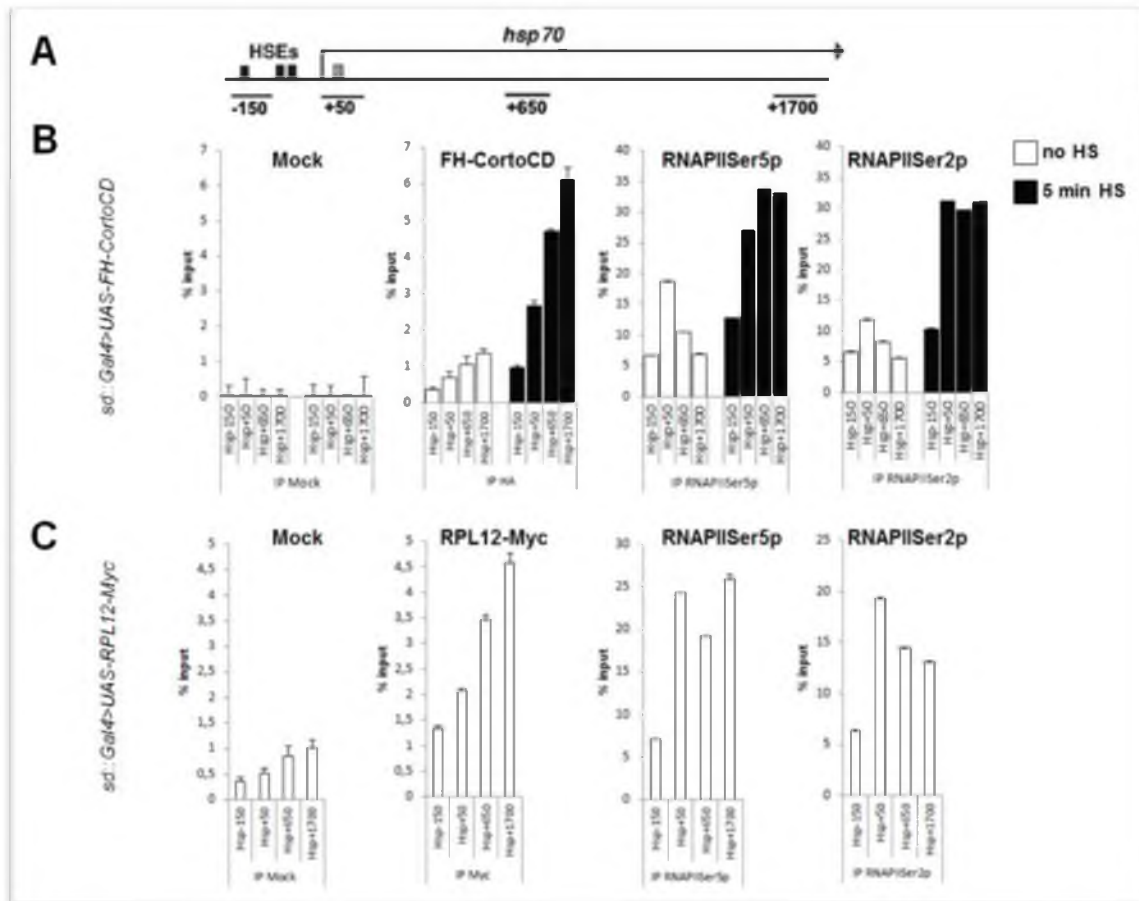


Figure 13 : CortoCD et Rpl12 sont enrichis sur le gène *hsp70*

Les couples d'amorces utilisés pour *hsp70* ont été décrits précédemment (Boehm *et al.*, 2003) et ciblent précisément les régions -154, +58, +682, +1702 avec le TSS pour référence 0.

A Représentation schématique du gène *hsp70* avec les amorces utilisées.

B XChIP Mock, anti-HA, anti-ARN polymérase II Ser2ph et Ser5ph sur les disques d'aile de génotype *sd::Gal4>UAS-FHCortoCD*, soumis à un choc thermique de 5 minutes (HS barres noires) ou sans choc thermique (NHS barres blanches) selon les conditions expérimentales déterminées par Boehm *et al.*, 2003, détection de la fixation par qPCR sur les sites -150, +50, +650 et +1700 du gène *hsp70*.

C XChIP Mock, anti-Myc, ARN polymérase II Ser2ph et Ser5ph sur les disques d'aile de génotype *sd::Gal4>UAS-RPL12Myc*, sans choc thermique, détection de la fixation par qPCR sur les sites -150, +50, +650 et +1700 du gène *hsp70*.

III-DISCUSSION

Conclusion

Les chromodomaines jouent un rôle critique dans l'adressage des régulateurs transcriptionnels à la chromatine. L'étude du chromodomaine de l'ETP Corto montre qu'il présente certaines caractéristiques des chromodomaines canoniques, agissant comme un module d'adressage à la chromatine et fixant les ARN *in vitro*. De façon inattendue, ce chromodomaine (CortoCD) ne semble pas se fixer aux histones méthylées comme le font la plupart des chromodomaines connus, mais à la protéine ribosomique RPL12 triméthylée sur la lysine 3 (RPL12K3me3). Corto et RPL12 co-localisent en de nombreux sites sur les chromosomes polytènes. Les analyses transcriptomiques de disques imaginaux d'aile surexprimant soit *cortoCD* soit *RPL12* révèlent qu'une grande majorité des gènes dérégulés sont communs, suggérant que Corto et RPL12 pourraient être partenaires dans la régulation transcriptionnelle de certains gènes, notamment ceux impliqués dans la biogenèse des ribosomes. Les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine confirment que Corto et RPL12 ont des cibles directes communes. Nos résultats mettent en évidence pour la première fois une coopération entre une protéine ribosomique et un facteur de maintien de la mémoire épigénétique dans la régulation transcriptionnelle.

Discussion

La quantité de ribosomes est l'un des facteurs limitant de la progression du cycle cellulaire. Aussi faut-il considérer la biogenèse des ribosomes comme un facteur important dans le contrôle de la croissance et de la prolifération cellulaires. La biogenèse des ribosomes requiert la coordination de l'expression et de l'assemblage en ribosomes de plusieurs centaines de protéines ribosomiques (RPs) et d'ARN ribosomiques (ARNr). L'assemblage des pré-ribosomes se fait de façon co-transcriptionnelle lors de la synthèse des ARNr dans le nucléole. L'état transcriptionnel des gènes codant les ARNr dépend en grande partie de mécanismes épigénétiques qui interviennent pendant la phase d'élongation de la transcription (McStay et Grummt, 2008). J'ai montré que RPL12 et Corto contrôlent la transcription de gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes, et plus particulièrement des gènes codant des RPs. Ainsi, la biogenèse des ribosomes serait soumise à des régulations épigénétiques coordonnées des gènes des RPs.

1-Réseau d'interacteurs de RPL12

La construction d'un réseau d'interactions centré sur RPL12 conforte les résultats que nous avons obtenus au laboratoire et met en lumière certaines corrélations potentiellement intéressantes.

Ce réseau a été construit en utilisant les logiciels Cytoscape et InterologFinder. Il inclut l'ensemble des données de haut-débit disponibles (co-immunoprécipitation suivie de spectrométrie de masse, crible double-hybride, interactions génétiques...) [DPIM (Drosophila Protein Interaction Mapping project ; Guruharsha *et al.*, 2011), BIOGRID (Bio General Repository for Interaction Datasets; Stark *et al.*, 2006), DroID (Drosophila Interaction Database ; Murali *et al.*, 2011) ...], ainsi que des données publiées dans la littérature.

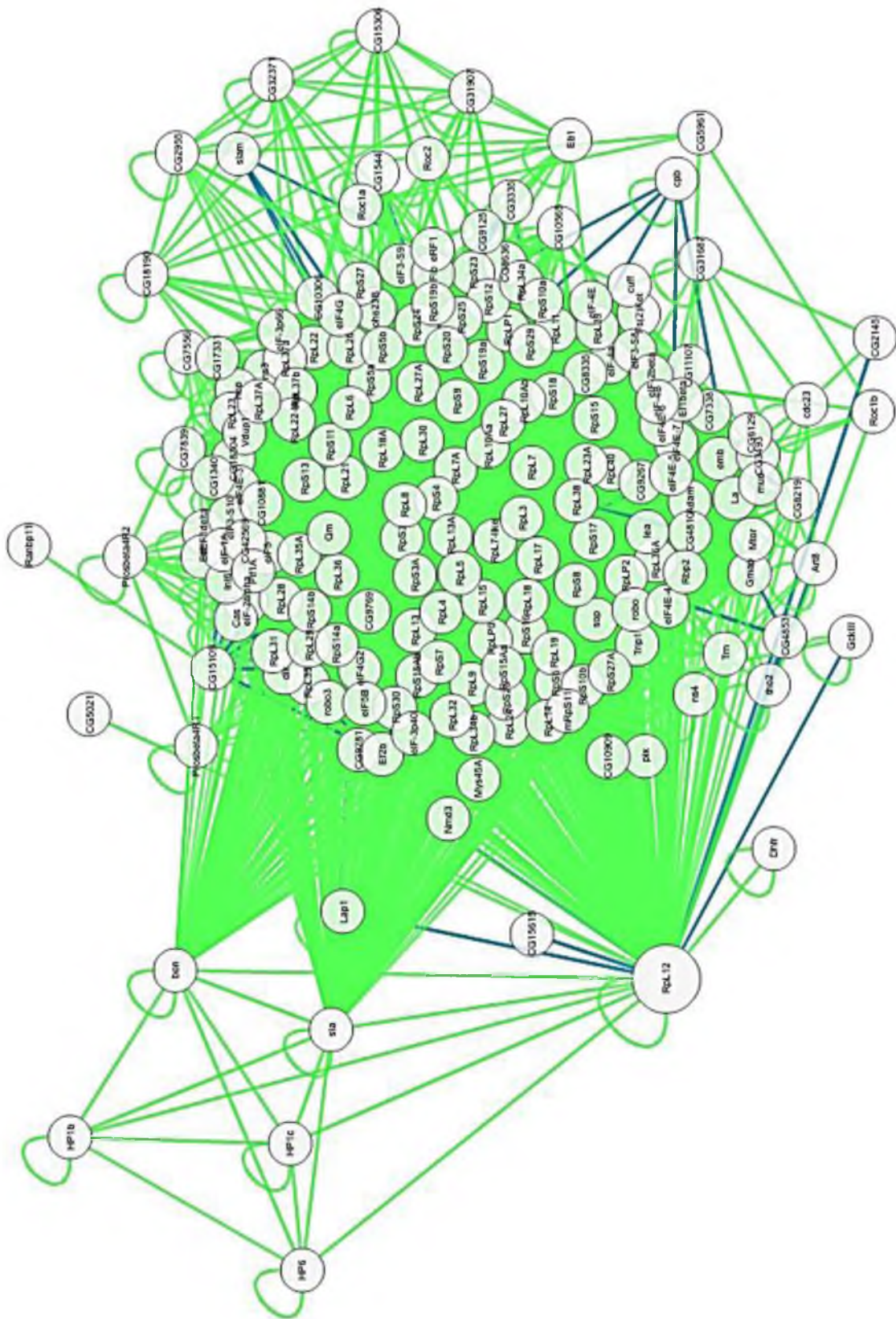


Figure 14 : Réseau d'interactions protéiques interologfinder centré sur RPL12.

Ce réseau inclut les données d'interactions disponibles non seulement chez *Drosophila melanogaster*, mais également chez l'homme, la souris, *Caenorhabditis elegans* et les levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe* (Figure 14).

Outre l'interaction attendue de RPL12 avec d'autres RPs composant le ribosome (Figure 14), ce réseau met en évidence l'interaction entre RPL12 et CBX1 chez l'homme (résultats de double-hybride) (Stelzl *et al.*, 2005). CBX1 est une protéine à chromodomaine, homologue d'HP1 β de la drosophile. Cette observation, qui mériterait d'être validée par d'autres techniques, suggère que RPL12 interagirait avec des protéines à chromodomaine chez l'homme. Ce réseau met également en évidence une interaction potentielle entre RPL12 et HP6 ou HP1c, deux autres protéines à chromodomaine. A ce jour, il n'y a pas d'homologue de Corto connu chez les vertébrés, qui ne semble être conservé que chez les insectes. Le fait que RPL12 interagisse avec des protéines à chromodomaine chez d'autres espèces que la drosophile suggère que Corto pourrait être l'homologue fonctionnel d'une de ces protéines.

RPL12 interagirait également avec la protéine TRIM24 humaine en double-hybride (Figure 14). TRIM24 et son homologue Bonus chez la drosophile sont des régulateurs négatifs de la voie p53 (Allton *et al.*, 2009). Cette observation suggère que RPL12 pourrait interagir avec la voie p53 dans le contrôle de la biogenèse des ribosomes et rappelle l'interaction entre la voie Myc et RPL11.

De façon intéressante, ce réseau montre également que RPL12 interagit en double-hybride avec Stubarista, qui correspond à RP40 chez la drosophile. Or, de façon complètement indépendante, nous avons mis en évidence par un crible double-hybride réalisé au laboratoire, une interaction entre Corto et Sta/RP40. Cette interaction a été confirmée par co-immunoprécipitation de protéines étiquetées en cellules S2 (Suk-min Jang). De plus, comme mentionné dans l'introduction, une perte de fonction de *Sta/RP40* induit un phénotype aristapedia (Melnick *et al.*, 1993) similaire à celui observé par la surexpression de *corto* ou de son chromodomaine (*cortoCD*) (Kodjabachian *et al.*, 1998 ; cf article). Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent l'existence d'un complexe Corto-RPL12-Sta/RP40.

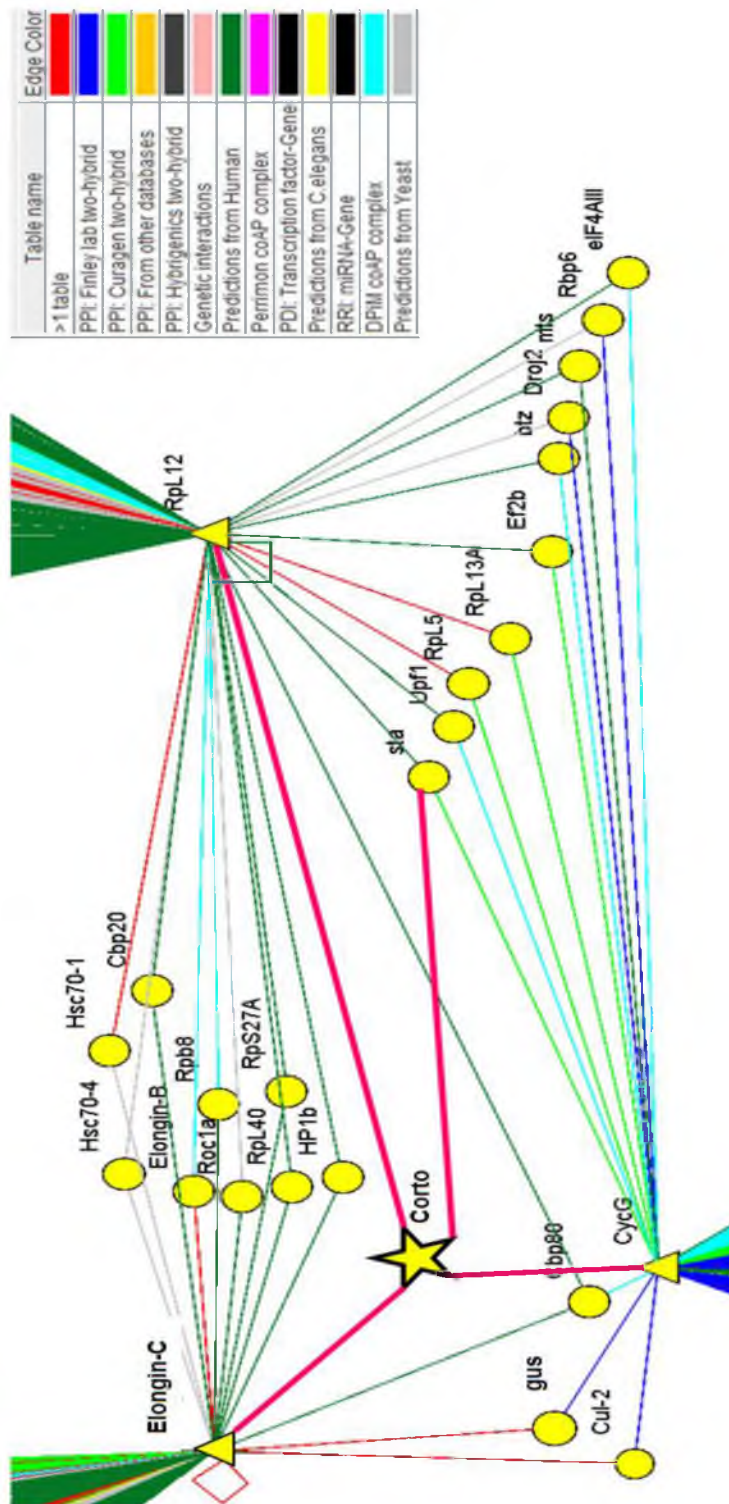


Figure 15 : Réseau d'interactions protéiques DroID centrée sur RPL12.

Interactions protéiques publiées et prédites par DroID entre CycG, RPL12 et Elongin-C. Le tableau sur la droite donne le code couleur utilisé en fonction de l'origine des données expérimentales. Les interactions de Corto sont rajoutées en rose.

Au laboratoire, nous avons également mis en évidence une interaction entre Corto et une cycline atypique, Cyclin G (Salvaing *et al.*, 2008b), ainsi qu'entre Corto et Elongin-C (Rougeot *et al.*, en préparation) (interaction en rouge dans la Figure 15). Or, le réseau montre que Corto, RPL12, Cyclin G, et Elongin-c partagent de très nombreux interacteurs communs, parmi lesquels on peut citer Elongin-b (une des trois protéines du complexe Elongin impliqué dans l'élongation de la transcription), des sous-unités du complexe RNAPII (RBP6 et 8), des protéines ribosomiques (Sta/RP40, RPL5, RPL13A, RPS27a), HP1 β et UPF1 (une protéine des complexes EJC impliquée dans le mécanisme de NMD). Ces interactions nous orientent vers un rôle de Corto et RPL12 dans la régulation de l'élongation de la transcription.

2-Protéines ribosomiques et régulation épigénétique de l'expression des gènes

L'ETP Corto est un co-facteur des complexes PcG et TrxG et participe au maintien de l'expression des gènes homéotiques (Lopez *et al.*, 2001 ; Salvaing *et al.*, 2008a et b). Les nombreux sites de fixation de Corto à la chromatine, les phénotypes pléiotropes des mutants *corto*, ainsi que les données d'analyse du transcriptome montrent que les cibles transcriptionnelles de Corto sont nombreuses. L'interaction entre Corto et RPL12 soulève la possibilité intéressante d'une connexion entre les RPs et la régulation épigénétique de l'expression des gènes.

Outre leur rôle dans la synthèse protéique, les RPs sont impliquées dans de nombreuses fonctions référencées comme *extra-ribosomiques* (pour revue, voir Bahvsar *et al.*, 2010). La première observation de l'implication d'une protéine ribosomique dans la régulation de la transcription a été faite chez *E. coli*, avec le rôle d'anti-terminaison de la transcription de RPS10 (Friedman *et al.*, 1981). Ceci a été confirmé chez la levure, où RPS20 inhibe la terminaison des transcrits synthétisés par l'ARN Pol III (Hermann-Le Denmat *et al.*, 1994). De plus, chez la levure et chez d'autres eucaryotes, plusieurs RPs

dont RPL12 régulent leur propre transcription, notamment en régulant l'épissage de leur propre transcrit (pour revue, Ivanov *et al.*, 2006). Enfin, chez la drosophile, les RPs se fixent sur la chromatine en de nombreux sites, suggérant qu'elles régulent de multiples cibles transcriptionnelles (Brojna *et al.*, 2002 ; Shroder et Moore, 2005 ; Ni *et al.*, 2006, De *et al.*, 2011).

L'histone H1 interagit directement avec plusieurs RPs; H1 et ces RPs sont impliquées dans la répression transcriptionnelle (Ni *et al.*, 2006). De plus, de nombreux complexes impliqués dans les mécanismes épigénétiques contiennent des RPs. C'est par exemple le cas (1) du complexe PRC1 (Saurin *et al.*, 2001), (2) du complexe répresseur H1.2, qui contient l'ETP ASXL1, (3) du complexe TrxG SWI/SNF, dont la sous-unité catalytique BRM s'associe avec des composants du spliceosome (Batsché *et al.*, 2006) qui contient plusieurs RPs, dont RPL12 (Ajuh *et al.*, 2000), (4) du complexe RISC chez l'homme (Chendrimada *et al.*, 2007) et chez la drosophile (Ishizuka *et al.*, 2002; Tim A Rand, 2004) qui sont potentiellement impliqués dans la biogenèse des ribosomes (Challagundla *et al.*, 2011; Xue-hai Liang, 2011). L'ensemble de ces données suggèrent que les RPs pourraient moduler la transcription *via* des mécanismes épigénétiques (Kim *et al.*, 2008). L'interaction entre l'ETP Corto et RPL12 renforce cette idée.

Le rôle des RPs dans les complexes mentionnés ci-dessus pourraient être structural et sans lien direct avec la régulation transcriptionnelle proprement dite. Cependant, depuis plus de 40 ans, de nombreux cribles génétiques visant à isoler de nouveaux gènes *Polycomb* (PcG) et *Trithorax* (TrxG) ont identifié des mutants *Minute* comme modificateurs dominants des phénotypes *PcG* et *TrxG* (Gildea *et al.*, 2000). Par exemple, les mutations *Minute* suppriment le phénotype de peigne sexuel ectopique dans les mutants *Polycomb* et *polyhomeotic* (Denell, 1978 ; Fauvarque *et al.*, 2001). Chez *Drosophila melanogaster*, les *loci Minute* sont disséminés dans le génome et la plupart d'entre eux correspondent à des gènes ribosomiques (Saebøe-Larssen *et al.*, 1998 ; Marygold *et al.*, 2007). Il a été proposé que les mutants *Minute* supprimeraient les phénotypes des mutants PcG de façon non spécifique, simplement en ralentissant le développement (Denell, 1978). Cependant, certains mutants *Minute* présentent des phénotypes identiques à ceux de mutants PcG ce qui ne soutient pas l'hypothèse

précédente. Comme mentionné précédemment, les mutants du gène *Stubarista* (*Sta/RP40*), présentent un phénotype *aristapedia* (transformations de l'arista en patte). Globalement, ces données nous orientent en faveur de l'hypothèse d'une implication active des RPs dans la régulation épigénétique de l'expression des gènes.

3-Les protéines ribosomiques agissent-elles en complexes ou sous forme libre ?

L'implication des RPs dans la régulation de la transcription, soit sous forme libre (non complexées en ribosomes), soit sous forme de complexes ribonucléoprotéiques (*pseudo-ribosome*) est une question vivement débattue (pour revue, voir De et Brogna, 2010). De nombreuses données citent un rôle collaboratif des RPs dans la transcription. Chez la drosophile, au moins 20 RPs sont présentes sur les chromosomes polytènes, et co-localisent en de multiples sites, suggérant qu'elles pourraient agir sous forme de pseudo-ribosomes (Brogna *et al.*, 2002). De plus, des études à large échelle (ChIP-chip) sur RPL7, RPL11 et RPL25 chez *S. pombe* révèlent une similarité frappante de leurs sites de fixation, suggérant qu'elles pourraient être associées en complexe (De *et al.*, 2011). De la même façon, l'identification des partenaires protéiques de Corto par spectrométrie de masse n'a pas seulement révélé RPL12, mais également RPL7, RPL27, RPS10, RPS11 et RPS14, indiquant que Corto pourrait interagir avec plusieurs RPs formant un complexe.

Le rôle des RPs dans la traduction nucléaire a également été largement débattu (Dahlberg *et al.*, 2003). Cependant, l'association des RPs à la chromatine sur des transcrits naissants codants et non codants s'oppose à cette hypothèse (Schroder et Moore, 2005). Ainsi, il est probable que ces pseudo-ribosomes associés à la chromatine participeraient à la régulation de la transcription.

Comme les histones, les RPs sont soumises à de nombreuses modifications post-traductionnelles, incluant l'ubiquitination, la phosphorylation, l'acétylation, la méthylation ... (Carroll *et al.*, 2008 ; Huang et Berger, 2008 ; Pang *et al.*, 2010 ; Polevoda et Shermann, 2007 ; Webb *et al.*, 2010). Nous avons montré que le chromodomaine de Corto se lie à RPL12 triméthylée sur la lysine 3 (RPL12K3me3). Comme mentionné

précédemment, un crible double-hybride à grande échelle révèle que la protéine à chromodomaine CBX1, homologue humain de HP1 β de la drosophile, interagit avec RPL12. Il est tentant de spéculer sur un rôle de la méthylation de RPL12 dans le recrutement de protéines à chromodomaine sur la chromatine. Ce mécanisme de recrutement pourrait être similaire à celui par lequel des marques épigénétiques, comme H3K27me₃, recrutent des complexes protéiques, comme PRC1, grâce à sa liaison avec le chromodomaine de Polycomb. Selon cette hypothèse, RPL12K3me₃ pourrait recruter Corto ou d'autres protéines à chromodomaine sur la chromatine. En se basant sur l'existence d'un panel de ribosomes composés de différentes RPs portant des modifications post-traductionnelles variées, il a été proposé que la traduction sélective de certains ARNm pourrait dépendre d'un *code ribosome*, similaire au code histone (Komili *et al.*, 2007). Nos résultats nous conduisent à suggérer qu'un tel code ribosome pourrait également concerner la régulation de la transcription.

4- La biogenèse des ribosomes est coordonnée par la régulation transcriptionnelle des protéines ribosomiques

De façon surprenante, l'analyse (par *Gene Ontology*) du rôle des gènes surexprimés lors de la surexpression de *RPL12* ou de *cortoCD* révèle une représentation majoritaire de gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes, en particulier les gènes codant les RPs (cf article). Il est intéressant de noter que dans l'étude réalisée par Komili et coll. en 2007 sur l'analyse des rôles différents des paralogues des RPs chez la levure *S. cerevisiae*, une délétion de *RPL12a* diminue l'expression des gènes des RPs, alors qu'une délétion du paralogue *RPL12b* diminue l'expression des gènes impliqués dans la modification des ARNr. Le fait que la surexpression de *RPL12* augmente l'expression des gènes codant d'autres RPs renforce l'idée selon laquelle *RPL12* pourrait activer la production de RPs au niveau transcriptionnel. De façon intéressante, la surexpression des gènes liés à la biogenèse des ribosomes est également observée dans des mutants *ash2* (*absent, small or homeotic disc 2*), un gène TrxG interagissant avec *corto* (Lopez *et al.*, 2001 ; Beltran *et al.*, 2007). Tout comme *RPL12*, *Corto* et des régulateurs de la chromatine pourraient

participer à une régulation épigénétique coordonnée de la biogenèse des ribosomes. Ce type de co-régulation globale de gènes associés à une même fonction a déjà été décrit chez les eucaryotes. Chez la levure, RPL12 coordonne la transcription des gènes impliqués dans l'assimilation du phosphate ainsi que celle des gènes de RPs.

En effet, l'inactivation de *RPL12* entraîne la suppression de la transcription du gène PHO84, codant un transporteur du phosphate, alors que PHO4, un activateur de la transcription de la voie PHO est surexprimé dans ces conditions. Ainsi, RPL12 régule la voie PHO en fonction des conditions environnementales (présence ou absence de phosphate assimilable) (Komili *et al.*, 2007 ; Tu *et al.*, 2011). Par ailleurs, chez la drosophile, l'expression des gènes de ménage serait coordonnée par le complexe NSL (*Non Specific Lethal complex*) (Feller *et al.*, 2011).

La régulation de la biogenèse des ribosomes étant essentielle pour la viabilité cellulaire (Warner et McIntosh, 2009), un tel mode de régulation transcriptionnelle des gènes codant les RPs, pourrait avoir évolué, assurant l'ajustement rapide de la synthèse protéique en cas de modification des conditions environnementales,

Récemment il a été décrit chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* que RPL7, RPL11 et RPL25 s'associent à la chromatine de façon dépendante de l'ARN (De *et al.*, 2011). Une analyse globale de leur fixation par ChIP-on-chip révèle que ces trois RPs sont majoritairement présentes sur les promoteurs des gènes d'ARNt (167 sur 171 gènes d'ARNt) suggérant que certaines RPs participent à la biogenèse des ARNt. Ainsi les RPs contrôleraient transcriptionnellement à la fois la biogenèse des ribosomes et celle des ARNt impliquant un nouveau mode de régulation des différents acteurs de la traduction.

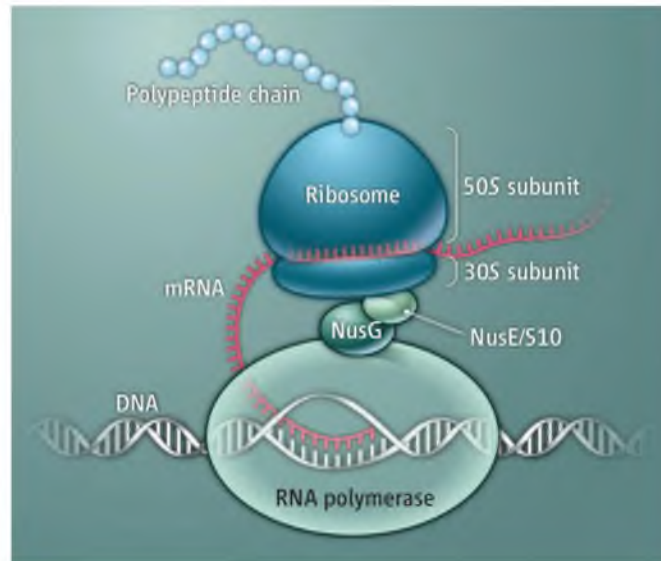


Figure 16 : Modèle de coopération entre traduction et transcription chez les procaryotes.

Lors de l'initiation de la traduction, le ribosome procaryote s'associe à l'ARN polymérase via les protéines NusE (également appelée RPS10) et NusG. Cette interaction inhibe les effets de *backtracking* associés à la pause transcriptionnelle (décrits en INTRODUCTION 3.2.3) qui ralentissent l'ARN polymérase en absence du ribosome.

Tiré de (Roberts, 2010)

5-La régulation transcriptionnelle par les protéines ribosomiques est-elle conservée au cours de l'évolution ?

La régulation transcriptionnelle par les RPs a été aussi décrite chez les procaryotes. Chez les eucaryotes, transcription et traduction sont réalisés dans deux compartiments différents, alors que chez les procaryotes, transcription et traduction sont couplées.

Le facteur d'élongation de la transcription Spt5, appelé NusG chez les procaryotes, est conservé dans les trois royaumes eucaryotes, procaryotes et archées. Spt5 fait partie du complexe DSIF (voir INTRODUCTION 3.2.2). Le rôle conservé de NusG/Spt5 est de stimuler l'élongation de la transcription et la processivité de l'ARN polymérase (Burova *et al.*, 1995 et pour revue voir Werner, 2012). Récemment, plusieurs équipes ont montré que NusG s'associe de façon co-transcriptionnelle à RPS10 (NusE) chez *E. coli* (Burmann *et al.*, 2010; Proshkin *et al.*, 2010; Roberts, 2010 et Figure 16). De façon surprenante, les auteurs ont montré que le taux d'élongation de la transcription par l'ARN polymérase bactérienne dépend du taux d'élongation de la traduction par les ribosomes. L'utilisation d'antibiotiques, de RPs mutantes ou l'augmentation de codons rares dans les transcrits diminuent la processivité de l'ARN polymérase bactérienne. Inversement, des mutations gain de fonction de RPs accélèrent la transcription et augmentent le taux de traduction. Ainsi les auteurs proposent un modèle où transcription et traduction sont étroitement coordonnées. Chez les eucaryotes, l'association de RPs en pseudo-ribosomes pourrait contrer le *backtracking* lors de la pause transcriptionnelle (voir INTRODUCTION 3.2.2).

Ce mécanisme de couplage entre transcription et traduction existe également dans la mitochondrie. En effet, il a été montré que la forme libre, non associée aux ribosomes mitochondriaux, de la protéine mitochondriale humaine L7/L12 (mRPL12, homologue de P1) interagit directement avec l'ARN polymérase mitochondriale (POLRMT)

(Surovtseva *et al.*, 2011). Des expériences de surexpression montrent que mRPL12 stimule la transcription des gènes mitochondriaux. Inversement, la déplétion de mRPL12 dans des cellules HeLa diminue le taux de transcription de la POLRMT. Il semblerait que la régulation de la transcription par les RPs soit un mécanisme conservé.

Les résultats de la littérature, ainsi que nos propres résultats suggèrent que certaines RPs, libres ou complexées en pseudo-ribosomes, pourraient agir comme médiateurs pour permettre une régulation fine de l'homéostasie cellulaire chez les eucaryotes.

Perspectives

1- Dynamique et rôle de la méthylation de la lysine 3 dans l'activité transcriptionnelle de RPL12.

Il n'existe pas de mutants de *RPL12* chez la drosophile et son inactivation par ARNi induit la mort des cellules.

Afin d'analyser le rôle de la triméthylation de la lysine 3 de RPL12 *in vivo* chez la drosophile, nous envisageons de remplacer, par recombinaison homologe, le gène *RPL12* par une forme mutée *RPL12^{K3A}* non méthylable. Une analyse comparative des transcriptomes d'individus *RPL12⁺* et *RPL12^{K3A}* (par RNAseq) sera ensuite réalisée afin de comprendre le rôle de la triméthylation de la lysine 3 de RPL12 dans la transcription.

En parallèle, des lignées de *Drosophila melanogaster* transgéniques permettant d'exprimer les formes sauvage et mutée (K3A) de *RPL12* de *Drosophila pseudoobscura* (transgènes *UAS-Dp-RPL12* et *UAS-Dp-RPL12^{K3A}*) seront générées. Des combinaisons génétiques seront réalisées afin d'exprimer de façon conditionnelle (système UAS/Gal4), l'un ou l'autre de ces transgènes et un transgène permettant d'inactiver *RPL12* de *Drosophila melanogaster* par ARNi (transgène *UAS-Dm-RNAi-RPL12*). L'ARNi ciblant spécifiquement l'ARN *Dm-RPL12*, les ARN sauvage et muté *Dp-RPL12* et *Dp-RPL12^{K3A}* ne seront pas dégradés. Ainsi il sera possible de remplacer la fonction endogène de *Dm-RPL12* par celle de *Dp-RPL12^{K3A}* et d'analyser, de façon conditionnelle, la fonction de la triméthylation de la lysine 3 de RPL12 dans la transcription.

2- Analyse du recrutement de Corto et de RPL12 sur la chromatine

L'interaction de Corto sur la chromatine dépend-elle de RPL12 ou, au contraire, Corto est-il nécessaire à la fixation de RPL12 à la chromatine ?

Nos résultats démontrent clairement que Corto interagit *via* son chromodomaine avec RPL12 triméthylée sur la lysine 3. Toutefois, nous ne connaissons pas l'ordre de recrutement sur la chromatine de ces deux protéines. Les outils génétiques générés permettront également d'investiguer ce mécanisme.

Etude du rôle de la méthylation de RPL12

Chez la levure *S. cerevisiae*, chez *A. thaliana* et chez l'homme, RPL12 peut être triméthylée sur la lysine 3 par la méthyl-transférase Rkm2 (*Ribosomal lysine methyltransferase 2*, SET11 chez les vertébrés) (Porrás-Yakushi *et al.*, 2007 ; Carroll *et al.*, 2008 ; Sadaie *et al.*, 2008)(Webb *et al.*, 2010). Le gène *Rkm2* est conservé chez la drosophile (CG33230) et abondamment transcrit en cellules S2, et tout au long du développement (Graveley *et al.*, 2011). Il serait intéressant de déterminer si cette enzyme est la méthyl-transférase responsable de la triméthylation de la lysine 3 de RPL12 chez la drosophile. L'inactivation ubiquitaire de *Rkm2* à partir d'une lignée de drosophile transgénique *UAS-ARNi-Rkm2* est létale aux stades larvaires L2/L3. Afin d'analyser l'effet d'une surexpression de *Rkm2*, j'ai produit une lignée de drosophiles transgéniques (*UAS-Rkm2*). J'ai également construit divers vecteurs d'expression permettant la production de Rkm2 étiquetée en cellules S2, ainsi que la production de protéine recombinante GST-Rkm2. Ces outils seront utilisés pour étudier le rôle de Rkm2 dans la méthylation de RPL12 *in vitro* et *in vivo*. Des résultats très préliminaires laissent penser que la surexpression de *Rkm2* dans les cellules S2 augmente la quantité de forme haute de RPL12 observée en Western Blot (supposée tri-méthylée, cf article). Ces résultats devront être reproduits et confirmés à l'aide de vecteurs *RPL12^{K3A}*. Il sera également intéressant d'analyser les phénotypes induits par la surexpression conjointe de *RPL12* et de *Rkm2* (*da::Gal4>UAS-RPL12Myc, UAS-Rkm2*).

3- Etude des cibles transcriptionnelles directes de Corto et de RPL12

La co-localisation sur les chromosomes polytènes de Corto et RPL12 n'est pas complète et certains sites discrets ne sont marqués que par l'une ou l'autre de ces protéines. J'ai montré par CHIP que RPL12 et CortoCD sont fixés sur la chromatine sur les gènes *RPS4* et *hsp70*. L'ensemble des sites de fixation de Corto et RPL12 sur le génome sera déterminé par CHIPseq.

La comparaison de nos données de haut-débit (RNAseq et CHIPseq) et des données épigénomiques du consortium modENCODE (<http://www.modencode.org/>) permettra de révéler le statut épigénétique (marques épigénétiques activatrices ou répressives, co-localisation avec des protéines PcG et TrxG *etc* ...) et le statut transcriptionnel (ARN Pol II en pause ou en élongation; Perez-Lluch *et al.*, 2011) des gènes cibles. Nous porterons une attention particulière aux gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes, et plus spécialement aux gènes codant les protéines et les ARN ribosomiques et de transfert.

4- RPL12 agit-elle seule ou fait-elle partie d'un pseudo-ribosome impliquant d'autres RPs et ARNr ?

Nos données de spectrométrie de masse ainsi que des données de la littérature suggèrent que les RPs impliquées dans la transcription agissent sous forme de pseudo-ribosomes (De and Brogna, 2010; De *et al.*, 2011). Afin de tester cette hypothèse, il faudrait réaliser un fractionnement biochimique pour isoler le complexe nucléaire RPL12K3me3/Corto et caractériser l'ensemble des protéines associées par spectrométrie de masse. La présence d'ARN structuraux non codants, notamment d'ARNr, associés à ce complexe nucléaire pourrait être recherchée par qRT-PCR.

5- Perspectives évolutives

Les mécanismes généraux de la biogenèse des ribosomes semblent être conservés chez les eucaryotes, il serait intéressant de savoir si la régulation épigénétique coordonnée des gènes codant les RPs est conservée chez les mammifères.

De façon intéressante, des cribles double-hybride à haut-débit ont montré que chez l'homme, RPL12 interagit avec CBX1, l'homologue d'HP1 β , suggérant que RPL12 pourrait également interagir avec une protéine à chromodomaine chez les vertébrés.

Aucun homologue de Corto n'a été caractérisé à ce jour chez les mammifères. Il serait intéressant d'identifier un homologue fonctionnel. Pour cela, il serait envisageable de caractériser, par peptide pull-down et spectrométrie de masse, l'ensemble des protéines humaines retenues *in vitro* par des peptides RPL12 ou RPL12K3me3. L'analyse différentielle des protéines retenues spécifiquement par le peptide RPL12K3me3 pourrait révéler un homologue fonctionnel de Corto.

Le chromodomaine de Corto est atypique comparé aux autres chromodomains caractérisés à ce jour. En effet, bien que sa structure soit conservée, sa séquence ainsi que sa spécificité de reconnaissance sont divergents. Il serait intéressant d'analyser la liaison de ce chromodomaine à RPL12K3A par cristallographie. Ceci permettrait éventuellement de définir une nouvelle famille de chromodomains.

BIBLIOGRAPHIE

- Adamson, A.L., and Shearn, A. (1996). Molecular genetic analysis of *Drosophila ash2*, a member of the trithorax group required for imaginal disc pattern formation. *Genetics* *144*, 621–633.
- Adhikary, S., and Eilers, M. (2005). Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 635–645.
- Agalioti, T., Chen, G., and Thanos, D. (2002). Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. *Cell* *111*, 381–392.
- Ahn, S.H., Kim, M., and Buratowski, S. (2004). Phosphorylation of serine 2 within the RNA polymerase II C-terminal domain couples transcription and 3' end processing. *Mol. Cell* *13*, 67–76.
- Ai, N., Hu, X., Ding, F., Yu, B., Wang, H., Lu, X., Zhang, K., Li, Y., Han, A., Lin, W., et al. (2011). Signal-induced Brd4 release from chromatin is essential for its role transition from chromatin targeting to transcriptional regulation. *Nucleic Acids Research* *39*, 9592–9604.
- Ajuh, P., Kuster, B., Panov, K., Zomerdijk, J.C.B.M., Mann, M., and Lamond, A.I. (2000). Functional analysis of the human CDC5L complex and identification of its components by mass spectrometry. *Embo J* *19*, 6569–6581.
- Akasaka, T., Kanno, M., Balling, R., Mieza, M.A., Taniguchi, M., and Koseki, H. (1996). A role for mel-18, a Polycomb group-related vertebrate gene, during theanterior-posterior specification of the axial skeleton. *Development* *122*, 1513–1522.
- Akhtar, A., Zink, D., and Becker, P.B. (2000). Chromodomains are protein-RNA interaction modules. *Nature* *407*, 405–409.
- Allton, K., Jain, A.K., Herz, H.-M., Tsai, W.-W., Jung, S.Y., Qin, J., Bergmann, A., Johnson, R.L., and Barton, M.C. (2009). Trim24 targets endogenous p53 for degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 11612–11616.
- Anaka, M., Lynn, A., McGinn, P., and Lloyd, V.K. (2009). Genomic imprinting in *Drosophila* has properties of both mammalian and insect imprinting. *Dev. Genes Evol.* *219*, 59–66.
- Arabi, A., Wu, S., Ridderstråle, K., Bierhoff, H., Shiue, C., Fatyol, K., Fahlén, S., Hydbring, P., Söderberg, O., Grummt, I., et al. (2005). c-Myc associates with ribosomal DNA and activates RNA polymerase I transcription. *Nat. Cell Biol.* *7*, 303–310.
- Aravin, A.A., Hannon, G.J., and Brennecke, J. (2007). The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. *Science* *318*, 761–764.
- Armstrong, J.A., Papoulas, O., Daubresse, G., Sperling, A.S., Lis, J.T., Scott, M.P., and Tamkun, J.W. (2002). The *Drosophila* BRM complex facilitates global transcription by RNA polymerase II. *Embo J.* *21*, 5245–5254.
- Arndt, K.M., and Kane, C.M. (2003). Running with RNA polymerase: eukaryotic transcript elongation. *Trends Genet.* *19*, 543–550.
- Ball, L.J., Murzina, N.V., Broadhurst, R.W., Raine, A.R., Archer, S.J., Stott, F.J., Murzin, A.G., Singh, P.B., Domaille, P.J., and Laue, E.D. (1997). Structure of the chromatin binding (chromo) domain from mouse modifier protein 1. *Embo J.* *16*, 2473–2481.
- Ballesta, J.P., and Remacha, M. (1996). The large ribosomal subunit stalk as a regulatory element of the eukaryotic translational machinery. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* *55*, 157–193.
- Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* *21*, 381–395.
- Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C., and Kouzarides, T. (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* *410*, 120–124.
- Bantignies, F., Roure, V., Comet, I., Leblanc, B., Schuettengruber, B., Bonnet, J., Tixier, V., Mas, A., and Cavalli, G. (2011). Polycomb-dependent regulatory contacts between distant Hox loci in *Drosophila*. *Cell* *144*, 214–226.
- Barboric, M., Nissen, R.M., Kanazawa, S., Jabrane-Ferrat, N., and Peterlin, B.M. (2001). NF- κ B binds P-TEFb to stimulate transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell* *8*, 327–337.
- Bauer, U.-M., Daujat, S., Nielsen, S.J., Nightingale, K., and Kouzarides, T. (2002). Methylation at arginine 17 of histone H3 is linked to gene activation. *EMBO Rep.* *3*, 39–44.

- Baylin, S.B., and Jones, P.A. (2011). A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nat. Rev. Cancer* *11*, 726–734.
- Bednar, J., Horowitz, R.A., Grigoryev, S.A., Carruthers, L.M., Hansen, J.C., Koster, A.J., and Woodcock, C.L. (1998). Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 14173–14178.
- Beltran, S., Angulo, M., Pignatelli, M., Serras, F., and Corominas, M. (2007). Functional dissection of the *ash2* and *ash1* transcriptomes provides insights into the transcriptional basis of wing phenotypes and reveals conserved protein interactions. *Genome Biol.* *8*, R67.
- Bernard C, Introduction à l'étude de la médecine expérimentale, 1865
- Bernstein, E., Duncan, E.M., Masui, O., Gil, J., Heard, E., and Allis, C.D. (2006). Mouse polycomb proteins bind differentially to methylated histone H3 and RNA and are enriched in facultative heterochromatin. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 2560–2569.
- Bernstein, K.A., and Baserga, S.J. (2004). The small subunit processome is required for cell cycle progression at G1. *Mol. Biol. Cell* *15*, 5038–5046.
- Beven, A.F., Lee, R., Razaz, M., Leader, D.J., Brown, J.W., and Shaw, P.J. (1996). The organization of ribosomal RNA processing correlates with the distribution of nucleolar snRNAs. *J. Cell. Sci.* *109 (Pt 6)*, 1241–1251.
- Bhat, K.P., Itahana, K., Jin, A., and Zhang, Y. (2004). Essential role of ribosomal protein L11 in mediating growth inhibition-induced p53 activation. *Embo J.* *23*, 2402–2412.
- Bloyer, S., Cavalli, G., Brock, H.W., and Dura, J.-M. (2003). Identification and characterization of polyhomeotic PREs and TREs. *Dev. Biol.* *261*, 426–442.
- Blus, B.J., Wiggins, K., and Khorasanizadeh, S. (2011). Epigenetic virtues of chromodomains. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 1–20.
- Boamah, E.K., Kotova, E., Garabedian, M., Jarnik, M., and Tulin, A.V. (2012). Poly(ADP-Ribose) polymerase 1 (PARP-1) regulates ribosomal biogenesis in *Drosophila* nucleoli. *PLoS Genet.* *8*, e1002442.
- Boehm, A.K., Saunders, A., Werner, J., and Lis, J.T. (2003). Transcription Factor and Polymerase Recruitment, Modification, and Movement on *dhsp70* In Vivo in the Minutes following Heat Shock. *Molecular and Cellular Biology* *23*, 7628–7637.
- Boon, K., Caron, H.N., van Asperen, R., Valentijn, L., Hermus, M.C., van Sluis, P., Roobeek, I., Weis, I., Voûte, P.A., Schwab, M., et al. (2001). N-myc enhances the expression of a large set of genes functioning in ribosome biogenesis and protein synthesis. *Embo J.* *20*, 1383–1393.
- Breiling, A., O'Neill, L.P., D'Eliseo, D., Turner, B.M., and Orlando, V. (2004). Epigenome changes in active and inactive polycomb-group-controlled regions. *EMBO Rep.* *5*, 976–982.
- Brennecke, J., Aravin, A.A., Stark, A., Dus, M., Kellis, M., Sachidanandam, R., and Hannon, G.J. (2007). Discrete Small RNA-Generating Loci as Master Regulators of Transposon Activity in *Drosophila*. *Cell* *128*, 1089–1103.
- Brock, H.W., and Fisher, C.L. (2005). Maintenance of gene expression patterns. *Dev. Dyn.* *232*, 633–655.
- Brogna, S., Sato, T.-A., and Rosbash, M. (2002). Ribosome Components Are Associated with Sites of Transcription. *Molecular Cell* *10*, 93–104.
- Brown, A.S., and Susser, E.S. (2008). Prenatal nutritional deficiency and risk of adult schizophrenia. *Schizophr Bull* *34*, 1054–1063.
- Buchenau, P., Hodgson, J., Strutt, H., and Arndt-Jovin, D.J. (1998). The Distribution of Polycomb-Group Proteins During Cell Division and Development in *Drosophila* Embryos: Impact on Models for Silencing. *The Journal of Cell Biology* *141*, 469.
- Buratowski, S. (2009). Progression through the RNA polymerase II CTD cycle. *Mol. Cell* *36*, 541–546.
- Burke, T.W., and Kadonaga, J.T. (1996). *Drosophila* TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. *Genes Dev.* *10*, 711–724.

- Burke, T.W., and Kadonaga, J.T. (1997). The downstream core promoter element, DPE, is conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by TAFII60 of *Drosophila*. *Genes & Development* *11*, 3020.
- Burmann, B.M., Schweimer, K., Luo, X., Wahl, M.C., Stitt, B.L., Gottesman, M.E., and Rösch, P. (2010). A NusE:NusG complex links transcription and translation. *Science* *328*, 501–504.
- Burova, E., Hung, S.C., Sagitov, V., Stitt, B.L., and Gottesman, M.E. (1995). *Escherichia coli* NusG protein stimulates transcription elongation rates in vivo and in vitro. *J. Bacteriol.* *177*, 1388–1392.
- Caffarelli, E., Fragapane, P., Gehring, C., and Bozzoni, I. (1987). The accumulation of mature RNA for the *Xenopus laevis* ribosomal protein L1 is controlled at the level of splicing and turnover of the precursor RNA. *Embo J.* *6*, 3493–3498.
- Cairns, B.R., Schlichter, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Kornberg, R.D., and Winston, F. (1999). Two functionally distinct forms of the RSC nucleosome-remodeling complex, containing essential AT hook, BAH, and bromodomains. *Mol. Cell* *4*, 715–723.
- Cao, R., Wang, L., Wang, H., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Jones, R.S., and Zhang, Y. (2002). Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* *298*, 1039–1043.
- Carroll, A.J., Heazlewood, J.L., Ito, J., and Millar, A.H. (2008). Analysis of the Arabidopsis cytosolic ribosome proteome provides detailed insights into its components and their post-translational modification. *Mol. Cell Proteomics* *7*, 347–369.
- Cartegni, L., Chew, S.L., and Krainer, A.R. (2002). Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat. Rev. Genet.* *3*, 285–298.
- Castillo, D.M., Mell, J., Box, K.S., and Blumenstiel, J.P. (2011). Molecular evolution under increasing transposable element burden in *Drosophila*: A speed limit on the evolutionary arms race. *BMC Evolutionary Biology* *11*, 258.
- Chadwick, B.P., and Willard, H.F. (2001). A novel chromatin protein, distantly related to histone H2A, is largely excluded from the inactive X chromosome. *J. Cell Biol.* *152*, 375–384.
- Challagundla, K.B., Sun, X.-X., Zhang, X., DeVine, T., Zhang, Q., Sears, R.C., and Dai, M.-S. (2011). Ribosomal protein L11 recruits miR-24/miRISC to repress c-Myc expression in response to ribosomal stress. *Mol. Cell Biol.* *31*, 4007–4021.
- Chandler, V.L., and Stam, M. (2004). Chromatin conversations: mechanisms and implications of paramutation. *Nat. Rev. Genet.* *5*, 532–544.
- Chang, Y.-F., Imam, J.S., and Wilkinson, M.F. (2007). The Nonsense-Mediated Decay RNA Surveillance Pathway. *Annual Review of Biochemistry* *76*, 51–74.
- Charlop-Powers, Z., Zeng, L., Zhang, Q., and Zhou, M.-M. (2010). Structural insights into selective histone H3 recognition by the human Polybromo bromodomain 2. *Cell Res.* *20*, 529–538.
- Chen, D., Zhang, Z., Li, M., Wang, W., Li, Y., Rayburn, E.R., Hill, D.L., Wang, H., and Zhang, R. (2007). Ribosomal protein S7 as a novel modulator of p53-MDM2 interaction: binding to MDM2, stabilization of p53 protein, and activation of p53 function. *Oncogene* *26*, 5029–5037.
- Chieffi, P., Cozzolino, L., Kisslinger, A., Libertini, S., Staibano, S., Mansueto, G., De Rosa, G., Villacci, A., Vitale, M., Linardopoulos, S., et al. (2006). Aurora B expression directly correlates with prostate cancer malignancy and influence prostate cell proliferation. *Prostate* *66*, 326–333.
- Clapier, C.R., and Cairns, B.R. (2009). The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu. Rev. Biochem.* *78*, 273–304.
- Cmarko, D., Verschure, P.J., Rothblum, L.I., Hernandez-Verdun, D., Amalric, F., van Driel, R., and Fakan, S. (2000). Ultrastructural analysis of nucleolar transcription in cells microinjected with 5-bromo-UTP. *Histochem. Cell Biol.* *113*, 181–187.
- Colgan, D.F., and Manley, J.L. (1997). Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes Dev.* *11*, 2755–2766.
- Coller, H.A., Grandori, C., Tamayo, P., Colbert, T., Lander, E.S., Eisenman, R.N., and Golub, T.R. (2000). Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC

- regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *97*, 3260–3265.
- Collins, R., and Cheng, X. (2010). A case study in cross-talk: the histone lysine methyltransferases G9a and GLP. *Nucleic Acids Res.* *38*, 3503–3511.
- Conrad, T., and Akhtar, A. (2011). Dosage compensation in *Drosophila melanogaster*: epigenetic fine-tuning of chromosome-wide transcription. *Nat. Rev. Genet.* *13*, 123–134.
- Cook, M., and Tyers, M. (2007). Size control goes global. *Curr. Opin. Biotechnol.* *18*, 341–350.
- Cook, P.R. (1995). A chromomeric model for nuclear and chromosome structure. *J. Cell. Sci.* *108* (Pt 9), 2927–2935.
- Core, L.J., Waterfall, J.J., and Lis, J.T. (2008). Nascent RNA sequencing reveals widespread pausing and divergent initiation at human promoters. *Science* *322*, 1845–1848.
- Coré, N., Bel, S., Gaunt, S.J., Aurrand-Lions, M., Pearce, J., Fisher, A., and Djabali, M. (1997). Altered cellular proliferation and mesoderm patterning in Polycomb-M33-deficient mice. *Development* *124*, 721–729.
- Cuccurese, M., Russo, G., Russo, A., and Pietropaolo, C. (2005). Alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay regulate mammalian ribosomal gene expression. *Nucleic Acids Res* *33*, 5965–5977.
- Dabeva, M.D., and Warner, J.R. (1993). Ribosomal protein L32 of *Saccharomyces cerevisiae* regulates both splicing and translation of its own transcript. *J. Biol. Chem.* *268*, 19669–19674.
- Dahlberg, J.E., Lund, E., and Goodwin, E.B. (2003). Nuclear translation: what is the evidence? *RNA* *9*, 1–8.
- Dai, J., and Higgins, J.M.G. (2005). Haspin: a mitotic histone kinase required for metaphase chromosome alignment. *Cell Cycle* *4*, 665–668.
- Dai, J., Sultan, S., Taylor, S.S., and Higgins, J.M.G. (2005). The kinase haspin is required for mitotic histone H3 Thr 3 phosphorylation and normal metaphase chromosome alignment. *Genes Dev.* *19*, 472–488.
- Dai, M.-S., Arnold, H., Sun, X.-X., Sears, R., and Lu, H. (2007a). Inhibition of c-Myc activity by ribosomal protein L11. *Embo J.* *26*, 3332–3345.
- Dai, M.-S., and Lu, H. (2004). Inhibition of MDM2-mediated p53 ubiquitination and degradation by ribosomal protein L5. *J. Biol. Chem.* *279*, 44475–44482.
- Dai, M.-S., and Lu, H. (2008). Crosstalk between c-Myc and ribosome in ribosomal biogenesis and cancer. *J Cell Biochem* *105*, 670–677.
- Dai, M.-S., Sears, R., and Lu, H. (2007b). Feedback regulation of c-Myc by ribosomal protein L11. *Cell Cycle* *6*, 2735–2741.
- Dai, M.-S., Sun, X.-X., and Lu, H. (2010). Ribosomal protein L11 associates with c-Myc at 5 S rRNA and tRNA genes and regulates their expression. *J. Biol. Chem.* *285*, 12587–12594.
- Dai, M.-S., Zeng, S.X., Jin, Y., Sun, X.-X., David, L., and Lu, H. (2004). Ribosomal protein L23 activates p53 by inhibiting MDM2 function in response to ribosomal perturbation but not to translation inhibition. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 7654–7668.
- De, S., and Brogna, S. (2010). Are ribosomal proteins present at transcription sites on or off ribosomal subunits? *Biochem. Soc. Trans.* *38*, 1543–1547.
- De, S., Varsally, W., Falciani, F., and Brogna, S. (2011). Ribosomal proteins' association with transcription sites peaks at tRNA genes in *Schizosaccharomyces pombe*. *RNA* *17*, 1713–1726.
- Deaton, A.M., and Bird, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* *25*, 1010–1022.
- Debat, V., Bloyer, S., Faradji, F., Gidaszewski, N., Navarro, N., Orozco-Terwengel, P., Ribeiro, V., Schlötterer, C., Deutsch, J.S., and Peronnet, F. (2011). Developmental stability: a major role for cyclin G in *drosophila melanogaster*. *PLoS Genet.* *7*, e1002314.
- Déjardin, J., Rappailles, A., Cuvier, O., Grimaud, C., Decoville, M., Locker, D., and Cavalli, G. (2005). Recruitment of *Drosophila* Polycomb group proteins to chromatin by DSP1. *Nature* *434*, 533–538.

- Dekker, J. (2006). The three “C” s of chromosome conformation capture: controls, controls, controls. *Nat. Methods* 3, 17–21.
- Dey, A., Nishiyama, A., Karpova, T., McNally, J., and Ozato, K. (2009). Brd4 marks select genes on mitotic chromatin and directs postmitotic transcription. *Mol. Biol. Cell* 20, 4899–4909.
- Dhalluin, C., Carlson, J.E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A.K., and Zhou, M.M. (1999). Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* 399, 491–496.
- Diaconu, M., Kothe, U., Schlünzen, F., Fischer, N., Harms, J.M., Tonevitsky, A.G., Stark, H., Rodnina, M.V., and Wahl, M.C. (2005). Structural basis for the function of the ribosomal L7/12 stalk in factor binding and GTPase activation. *Cell* 121, 991–1004.
- Dieci, G., Ruotolo, R., Braglia, P., Carles, C., Carpentieri, A., Amoresano, A., and Ottonello, S. (2009). Positive modulation of RNA polymerase III transcription by ribosomal proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379, 489–493.
- Du, Y.-C.N., and Stillman, B. (2002). Yph1p, an ORC-interacting protein: potential links between cell proliferation control, DNA replication, and ribosome biogenesis. *Cell* 109, 835–848.
- Dundr, M., Hebert, M.D., Karpova, T.S., Stanek, D., Xu, H., Shpargel, K.B., Meier, U.T., Neugebauer, K.M., Matera, A.G., and Misteli, T. (2004). In vivo kinetics of Cajal body components. *J. Cell Biol.* 164, 831–842.
- Ebert, A., Schotta, G., Lein, S., Kubicek, S., Krauss, V., Jenuwein, T., and Reuter, G. (2004). Su(var) genes regulate the balance between euchromatin and heterochromatin in *Drosophila*. *Genes Dev.* 18, 2973–2983.
- Eissenberg, J.C. (2012). Structural biology of the chromodomain: form and function. *Gene* 496, 69–78.
- Eot-Houllier, G., Fulcrand, G., Watanabe, Y., Magnaghi-Jaulin, L., and Jaulin, C. (2008). Histone deacetylase 3 is required for centromeric H3K4 deacetylation and sister chromatid cohesion. *Genes Dev.* 22, 2639–2644.
- Faradji, F., Bloyer, S., Dardalhon-Cuménal, D., Randsholt, N.B., and Peronnet, F. (2011). *Drosophila melanogaster* Cyclin G coordinates cell growth and cell proliferation. *Cell Cycle* 10, 805–818.
- Feller, C., Prestel, M., Hartmann, H., Straub, T., Söding, J., and Becker, P.B. (2012a). The MOF-containing NSL complex associates globally with housekeeping genes, but activates only a defined subset. *Nucleic Acids Res.* 40, 1509–1522.
- Feller, C., Prestel, M., Hartmann, H., Straub, T., Söding, J., and Becker, P.B. (2012b). The MOF-containing NSL complex associates globally with housekeeping genes, but activates only a defined subset. *Nucleic Acids Res.* 40, 1509–1522.
- Feng, Q., Wang, H., Ng, H.H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Struhl, K., and Zhang, Y. (2002). Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. *Curr. Biol.* 12, 1052–1058.
- Fichelson, P., and Huynh, J.-R. (2009). [Asymmetric growth in *Drosophila* stem cells is related to ribosomal biogenesis]. *Med Sci (Paris)* 25, 780–781.
- Filipowicz, W., and Pogacić, V. (2002). Biogenesis of small nucleolar ribonucleoproteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 319–327.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811.
- Fischle, W., Tseng, B.S., Dormann, H.L., Ueberheide, B.M., Garcia, B.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Funabiki, H., and Allis, C.D. (2005). Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* 438, 1116–1122.
- Fischle, W., Wang, Y., Jacobs, S.A., Kim, Y., Allis, C.D., and Khorasanizadeh, S. (2003). Molecular Basis for the Discrimination of Repressive Methyl-Lysine Marks in Histone H3 by Polycomb and HP1 Chromodomains. *Genes Dev.* 17, 1870–1881.
- Fisher, A.E.O., Hohegger, H., Takeda, S., and Caldecott, K.W. (2007). Poly(ADP-ribose) polymerase 1 accelerates single-strand break repair in concert with poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Mol. Cell Biol.* 27, 5597–5605.

- Fraga, M.F., Ballestar, E., Paz, M.F., Ropero, S., Setien, F., Ballestar, M.L., Heine-Suñer, D., Cigudosa, J.C., Urioste, M., Benitez, J., et al. (2005). Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 10604–10609.
- Francis, D.D., Champagne, F.A., Liu, D., and Meaney, M.J. (1999). Maternal care, gene expression, and the development of individual differences in stress reactivity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *896*, 66–84.
- Fromont-Racine, M., Senger, B., Saveanu, C., and Fasiolo, F. (2003). Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene* *313*, 17–42.
- Fuda, N.J., Ardehali, M.B., and Lis, J.T. (2009). Defining mechanisms that regulate RNA polymerase II transcription in vivo. *Nature* *461*, 186–192.
- Fumagalli, S., Di Cara, A., Neb-Gulati, A., Natt, F., Schwemberger, S., Hall, J., Babcock, G.F., Bernardi, R., Pandolfi, P.P., and Thomas, G. (2009). Absence of nucleolar disruption after impairment of 40S ribosome biogenesis reveals an rpL11-translation-dependent mechanism of p53 induction. *Nat. Cell Biol.* *11*, 501–508.
- Fumagalli, S., and Thomas, G. (2011). The role of p53 in ribosomopathies. *Semin. Hematol.* *48*, 97–105.
- García-Marcos, A., Morreale, A., Guarinos, E., Briones, E., Remacha, M., Ortiz, A.R., and Ballesta, J.P.G. (2007). In vivo assembling of bacterial ribosomal protein L11 into yeast ribosomes makes the particles sensitive to the prokaryotic specific antibiotic thiostrepton. *Nucleic Acids Res.* *35*, 7109–7117.
- Gehani, S.S., Agrawal-Singh, S., Dietrich, N., Christophersen, N.S., Helin, K., and Hansen, K. (2010). Polycomb group protein displacement and gene activation through MSK-dependent H3K27me3S28 phosphorylation. *Mol. Cell* *39*, 886–900.
- Gilchrist, D.A., Fargo, D.C., and Adelman, K. (2009). Using ChIP-chip and ChIP-seq to study the regulation of gene expression: genome-wide localization studies reveal widespread regulation of transcription elongation. *Methods* *48*, 398–408.
- Gildea, J.J., Lopez, R., and Shearn, A. (2000). A screen for new trithorax group genes identified little imaginal discs, the *Drosophila melanogaster* homologue of human retinoblastoma binding protein 2. *Genetics* *156*, 645–663.
- Gilmour, D.S., and Lis, J.T. (1986). RNA polymerase II interacts with the promoter region of the noninduced hsp70 gene in *Drosophila melanogaster* cells. *Mol. Cell Biol.* *6*, 3984–3989.
- Gomez-Roman, N., Grandori, C., Eisenman, R.N., and White, R.J. (2003). Direct activation of RNA polymerase III transcription by c-Myc. *Nature* *421*, 290–294.
- Gonzalo, P., and Reboud, J.-P. (2003). The puzzling lateral flexible stalk of the ribosome. *Biol. Cell* *95*, 179–193.
- Goodman, R.H., and Smolik, S. (2000). CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev.* *14*, 1553–1577.
- Goto, H., Yasui, Y., Nigg, E.A., and Inagaki, M. (2002). Aurora-B phosphorylates Histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation. *Genes Cells* *7*, 11–17.
- Grandori, C., Gomez-Roman, N., Felton-Edkins, Z.A., Ngouenet, C., Galloway, D.A., Eisenman, R.N., and White, R.J. (2005). c-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I. *Nat. Cell Biol.* *7*, 311–318.
- Grewal, S.I.S., and Elgin, S.C.R. (2002). Heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *12*, 178–187.
- Grewal, S.S., Li, L., Orian, A., Eisenman, R.N., and Edgar, B.A. (2005). Myc-dependent regulation of ribosomal RNA synthesis during *Drosophila* development. *Nat. Cell Biol.* *7*, 295–302.
- Grimaud, C., Nègre, N., and Cavalli, G. (2006). From genetics to epigenetics: the tale of Polycomb group and trithorax group genes. *Chromosome Res.* *14*, 363–375.
- Guo, J., Garrett, M., Micklem, G., and Brogna, S. (2011). Poly(A) signals located near the 5' end of genes are silenced by a general mechanism that prevents premature 3'-end processing. *Mol. Cell Biol.* *31*, 639–651.

- Guo, Q.M., Malek, R.L., Kim, S., Chiao, C., He, M., Ruffly, M., Sanka, K., Lee, N.H., Dang, C.V., and Liu, E.T. (2000). Identification of c-myc responsive genes using rat cDNA microarray. *Cancer Res.* *60*, 5922–5928.
- Guruharsha, K.G., Rual, J.-F., Zhai, B., Mintseris, J., Vaidya, P., Vaidya, N., Beekman, C., Wong, C., Rhee, D.Y., Cenaj, O., et al. (2011a). A protein complex network of *Drosophila melanogaster*. *Cell* *147*, 690–703.
- Guruharsha, K.G., Rual, J.-F., Zhai, B., Mintseris, J., Vaidya, P., Vaidya, N., Beekman, C., Wong, C., Rhee, D.Y., Cenaj, O., et al. (2011b). A protein complex network of *Drosophila melanogaster*. *Cell* *147*, 690–703.
- Hampsey, M., and Reinberg, D. (2003). Tails of intrigue: phosphorylation of RNA polymerase II mediates histone methylation. *Cell* *113*, 429–432.
- Hampsey, M., Singh, B.N., Ansari, A., Lainé, J.-P., and Krishnamurthy, S. (2011). Control of eukaryotic gene expression: gene loops and transcriptional memory. *Adv. Enzyme Regul.* *51*, 118–125.
- Hartwell, L.H. (1974). *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Bacteriological Reviews* *38*, 164.
- Hendrix, D.A., Hong, J.-W., Zeitlinger, J., Rokhsar, D.S., and Levine, M.S. (2008). Promoter elements associated with RNA Pol II stalling in the *Drosophila* embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 7762–7767.
- Hernandez, V.P., and Fallon, A.M. (2007). Histone H1-like, lysine-rich low complexity amino acid extensions in mosquito ribosomal proteins RpL23a and RpS6 have evolved independently. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* *64*, 100–110.
- Hnilicová, J., Hozeifi, S., Dušková, E., Icha, J., Tománková, T., and Staněk, D. (2011). Histone deacetylase activity modulates alternative splicing. *PLoS ONE* *6*, e16727.
- Hnilicová, J., and Staněk, D. (2011). Where splicing joins chromatin. *Nucleus* *2*, 182–188.
- Holdermann, I., Meyer, N.H., Round, A., Wild, K., Sattler, M., and Sinning, I. (2012). Chromodomains read the arginine code of post-translational targeting. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *19*, 260–263.
- Hölzel, M., Orban, M., Hochstatter, J., Rohrmoser, M., Harasim, T., Malamoussi, A., Kremmer, E., Längst, G., and Eick, D. (2010). Defects in 18 S or 28 S rRNA processing activate the p53 pathway. *J. Biol. Chem.* *285*, 6364–6370.
- Horard, B., Tatout, C., Poux, S., and Pirrotta, V. (2000). Structure of a polycomb response element and in vitro binding of polycomb group complexes containing GAGA factor. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 3187–3197.
- Hou, H., and Yu, H. (2010). Structural insights into histone lysine demethylation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *20*, 739–748.
- Howe, K.J., Kane, C.M., and Ares, M., Jr (2003). Perturbation of transcription elongation influences the fidelity of internal exon inclusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* *9*, 993–1006.
- Huang, J., and Berger, S.L. (2008). The emerging field of dynamic lysine methylation of non-histone proteins. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *18*, 152–158.
- Hughes, R.M., Wiggins, K.R., Khorasanizadeh, S., and Waters, M.L. (2007). Recognition of trimethyllysine by a chromodomain is not driven by the hydrophobic effect. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 11184–11188.
- Hung, T., and Chang, H.Y. (2010). Long noncoding RNA in genome regulation: prospects and mechanisms. *RNA Biol* *7*, 582–585.
- Iborra, F.J., Jackson, D.A., and Cook, P.R. (2001). Coupled transcription and translation within nuclei of mammalian cells. *Science* *293*, 1139–1142.
- Ivanov, A.V., Malygin, A.A., and Karpova, G.G. (2005). Human ribosomal protein S26 suppresses the splicing of its pre-mRNA. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* *1727*, 134–140.
- Ivanov, A.V., Parakhnevich, N.M., Malygin, A.A., and Karpova, G.G. (2010). [Human ribosomal protein S16 inhibites excision of the first intron from its own]. *Mol. Biol. (Mosk.)* *44*, 90–97.

- Jacobs, S.A., Taverna, S.D., Zhang, Y., Briggs, S.D., Li, J., Eissenberg, J.C., Allis, C.D., and Khorasanizadeh, S. (2001). Specificity of the HP1 chromo domain for the methylated N-terminus of histone H3. *Embo J.* *20*, 5232–5241.
- Jacobson, R.H., Ladurner, A.G., King, D.S., and Tjian, R. (2000). Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. *Science* *288*, 1422–1425.
- Jain, A.K., and Barton, M.C. (2009). Regulation of p53: TRIM24 enters the RING. *Cell Cycle* *8*, 3668–3674.
- Jin, A., Itahana, K., O'Keefe, K., and Zhang, Y. (2004). Inhibition of HDM2 and activation of p53 by ribosomal protein L23. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 7669–7680.
- Johnston, G.C., Pringle, J.R., and Hartwell, L.H. (1977). Coordination of growth with cell division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Experimental Cell Research* *105*, 79–98.
- Jorgensen, P., Nishikawa, J.L., Breitenkreutz, B.-J., and Tyers, M. (2002). Systematic identification of pathways that couple cell growth and division in yeast. *Science* *297*, 395–400.
- Jorgensen, P., Rupes, I., Sharom, J.R., Schneper, L., Broach, J.R., and Tyers, M. (2004). A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size. *Genes Dev.* *18*, 2491–2505.
- Jorgensen, P., and Tyers, M. (2004). How cells coordinate growth and division. *Curr. Biol.* *14*, R1014–1027.
- Joshi, A.A., and Struhl, K. (2005). Eaf3 chromodomain interaction with methylated H3-K36 links histone deacetylation to Pol II elongation. *Mol. Cell* *20*, 971–978.
- Julien, E., and Herr, W. (2004). A switch in mitotic histone H4 lysine 20 methylation status is linked to M phase defects upon loss of HCF-1. *Mol. Cell* *14*, 713–725.
- Kadonaga, J.T. (2002). The DPE, a core promoter element for transcription by RNA polymerase II. *Exp. Mol. Med.* *34*, 259–264.
- Kal, A.J., Mahmoudi, T., Zak, N.B., and Verrijzer, C.P. (2000). The *Drosophila* brahma complex is an essential coactivator for the trithorax group protein zeste. *Genes Dev.* *14*, 1058–1071.
- Kao, S.Y., Calman, A.F., Luciw, P.A., and Peterlin, B.M. (1987). Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. *Nature* *330*, 489–493.
- Karam, C.S., Kellner, W.A., Takenaka, N., Clemmons, A.W., and Corces, V.G. (2010). 14-3-3 mediates histone cross-talk during transcription elongation in *Drosophila*. *PLoS Genet.* *6*, e1000975.
- Kearse, M.G., Chen, A.S., and Ware, V.C. (2011). Expression of ribosomal protein L22e family members in *Drosophila melanogaster*: rpL22-like is differentially expressed and alternatively spliced. *Nucleic Acids Res.* *39*, 2701–2716.
- Kennison, J.A., and Tamkun, J.W. (1988). Dosage-dependent modifiers of polycomb and antennapedia mutations in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *85*, 8136–8140.
- Kim, D., Blus, B.J., Chandra, V., Huang, P., Rastinejad, F., and Khorasanizadeh, S. (2010a). Corecognition of DNA and a methylated histone tail by the MSL3 chromodomain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *17*, 1027–1029.
- Kim, H., Erickson, B., Luo, W., Seward, D., Graber, J.H., Pollock, D.D., Megee, P.C., and Bentley, D.L. (2010b). Gene-specific RNA polymerase II phosphorylation and the CTD code. *Nature Structural & Molecular Biology* *17*, 1279–1286.
- Kim, M., Krogan, N.J., Vasiljeva, L., Rando, O.J., Nedeá, E., Greenblatt, J.F., and Buratowski, S. (2004). The yeast Rat1 exonuclease promotes transcription termination by RNA polymerase II. *Nature* *432*, 517–522.
- Kim, T.H., Barrera, L.O., Zheng, M., Qu, C., Singer, M.A., Richmond, T.A., Wu, Y., Green, R.D., and Ren, B. (2005). A high-resolution map of active promoters in the human genome. *Nature* *436*, 876–880.
- Kirmizis, A., Santos-Rosa, H., Penkett, C.J., Singer, M.A., Vermeulen, M., Mann, M., Bähler, J., Green, R.D., and Kouzarides, T. (2007). Arginine methylation at histone H3R2 controls deposition of H3K4 trimethylation. *Nature* *449*, 928–932.
- Klymenko, T. (2006). A Polycomb group protein complex with sequence-specific DNA-binding and selective methyl-lysine-binding activities. *Genes & Development* *20*, 1110–1122.

- Kodjabachian, L., Delaage, M., Maurel, C., Miassod, R., Jacq, B., and Rosset, R. (1998). Mutations in *ccf*, a novel *Drosophila* gene encoding a chromosomal factor, affect progression through mitosis and interact with Pc-G mutations. *Embo J* *17*, 1063–1075.
- Koleske, A.J., and Young, R.A. (1994). An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators. *Nature* *368*, 466–469.
- Komarnitsky, P. (2000). Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes & Development* *14*, 2452–2460.
- Komili, S., Farny, N.G., Roth, F.P., and Silver, P.A. (2007). Functional Specificity among Ribosomal Proteins Regulates Gene Expression. *Cell* *131*, 557–571.
- Kongsuwan, K., Yu, Q., Vincent, A., Frisardi, M.C., Rosbash, M., Lengyel, J.A., and Merriam, J. (1985). A *Drosophila* Minute gene encodes a ribosomal protein. *Nature* *317*, 555–558.
- Kornberg, R.D. (2007). The molecular basis of eucaryotic transcription. *Cell Death Differ.* *14*, 1989–1997.
- Krauss, V., and Reuter, G. (2011). DNA methylation in *Drosophila*--a critical evaluation. *Prog Mol Biol Transl Sci* *101*, 177–191.
- Kruiswijk, T., Kunst, A., Planta, R.J., and Mager, W.H. (1978). Modification of yeast ribosomal proteins. Methylation. *Biochem. J.* *175*, 221–225.
- Krumm, A., Meulia, T., Brunvand, M., and Groudine, M. (1992). The block to transcriptional elongation within the human *c-myc* gene is determined in the promoter-proximal region. *Genes Dev.* *6*, 2201–2213.
- Kuehner, J.N., Pearson, E.L., and Moore, C. (2011). Unravelling the means to an end: RNA polymerase II transcription termination. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *12*, 283–294.
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., and Jenuwein, T. (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* *410*, 116–120.
- Lafarga, M. (2002). Clastosome: A Subtype of Nuclear Body Enriched in 19S and 20S Proteasomes, Ubiquitin, and Protein Substrates of Proteasome. *Molecular Biology of the Cell* *13*, 2771–2782.
- Lagarou, A., Mohd-Sarip, A., Moshkin, Y.M., Chalkley, G.E., Bezstarosti, K., Demmers, J.A.A., and Verrijzer, C.P. (2008). dKDM2 couples histone H2A ubiquitylation to histone H3 demethylation during Polycomb group silencing. *Genes Dev.* *22*, 2799–2810.
- Lambertsson, A. (1998). The minute genes in *Drosophila* and their molecular functions. *Adv. Genet.* *38*, 69–134.
- Lau, P.N.I., and Cheung, P. (2011). Histone Code Pathway Involving H3 S28 Phosphorylation and K27 Acetylation Activates Transcription and Antagonizes Polycomb Silencing. *Pnas* *108*, 2801–2806.
- Laurent, B.C., Treitel, M.A., and Carlson, M. (1991). Functional interdependence of the yeast SNF2, SNF5, and SNF6 proteins in transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *88*, 2687–2691.
- Lee, C., Li, X., Hechmer, A., Eisen, M., Biggin, M.D., Venters, B.J., Jiang, C., Li, J., Pugh, B.F., and Gilmour, D.S. (2008). NELF and GAGA Factor Are Linked to Promoter-Proximal Pausing at Many Genes in *Drosophila*. *Molecular and Cellular Biology* *28*, 3290–3300.
- Lee, J.-S., Shukla, A., Schneider, J., Swanson, S.K., Washburn, M.P., Florens, L., Bhaumik, S.R., and Shilatifard, A. (2007). Histone crosstalk between H2B monoubiquitination and H3 methylation mediated by COMPASS. *Cell* *131*, 1084–1096.
- Lee, M.G., Wynder, C., Cooch, N., and Shiekhatar, R. (2005). An essential role for CoREST in nucleosomal histone 3 lysine 4 demethylation. *Nature* *437*, 432–435.
- Lee, S.-W., Berger, S.J., Martinović, S., Pasa-Tolić, L., Anderson, G.A., Shen, Y., Zhao, R., and Smith, R.D. (2002). Direct mass spectrometric analysis of intact proteins of the yeast large ribosomal subunit using capillary LC/FTICR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 5942–5947.
- Li, G., Sudlow, G., and Belmont, A.S. (1998). Interphase cell cycle dynamics of a late-replicating, heterochromatic homogeneously staining region: precise choreography of condensation/decondensation and nuclear positioning. *J. Cell Biol.* *140*, 975–989.
- Li, H., Pan, L., and Gou, K. (2010). Depletion of ribosomal protein L8 impairs *Drosophila* development and is associated with apoptosis. *Sci China Life Sci* *53*, 1092–1097.

- Lieberman-Aiden, E., van Berkum, N.L., Williams, L., Imakaev, M., Ragoczy, T., Telling, A., Amit, I., Lajoie, B.R., Sabo, P.J., Dorschner, M.O., et al. (2009). Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science* 326, 289–293.
- Lindsley, D.L., Sandler, L., Baker, B.S., Carpenter, A.T., Denell, R.E., Hall, J.C., Jacobs, P.A., Miklos, G.L., Davis, B.K., Gethmann, R.C., et al. (1972). Segmental aneuploidy and the genetic gross structure of the *Drosophila* genome. *Genetics* 71, 157–184.
- Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., Sharma, S., Pearson, D., Plotsky, P.M., and Meaney, M.J. (1997). Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* 277, 1659–1662.
- Liu, X., Bushnell, D.A., Silva, D.-A., Huang, X., and Kornberg, R.D. (2011). Initiation complex structure and promoter proofreading. *Science* 333, 633–637.
- Lo, K.-Y., Li, Z., Wang, F., Marcotte, E.M., and Johnson, A.W. (2009). Ribosome stalk assembly requires the dual-specificity phosphatase Yvh1 for the exchange of Mrt4 with P0. *The Journal of Cell Biology* 186, 849–862.
- Lopez, A., Higuete, D., Rosset, R., Deutsch, J., and Peronnet, F. (2001). genetically interacts with Pc-G and trx-G genes and maintains the anterior boundary of expression in larvae. *Molecular Genetics and Genomics* 266, 572–583.
- Lowe, S.W., and Sherr, C.J. (2003). Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, 77–83.
- Lyckegaard, E.M., and Clark, A.G. (1991). Evolution of ribosomal RNA gene copy number on the sex chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Evol.* 8, 458–474.
- LYON, M.F. (1961). Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* 190, 372–373.
- Maeda, R.K., and Karch, F. (2006). The ABC of the BX-C: the bithorax complex explained. *Development* 133, 1413–1422.
- Malygin, A.A., Parakhnevitch, N.M., Ivanov, A.V., Eperon, I.C., and Karpova, G.G. (2007). Human ribosomal protein S13 regulates expression of its own gene at the splicing step by a feedback mechanism. *Nucleic Acids Res* 35, 6414–6423.
- Mao, Y.S., Zhang, B., and Spector, D.L. (2011). Biogenesis and function of nuclear bodies. *Trends Genet.* 27, 295–306.
- del Mar Lorente, M., Marcos-Gutiérrez, C., Pérez, C., Schoorlemmer, J., Ramírez, A., Magin, T., and Vidal, M. (2000). Loss- and gain-of-function mutations show a polycomb group function for Ring1A in mice. *Development* 127, 5093–5100.
- Marenda, D.R., Zraly, C.B., and Dingwall, A.K. (2004). The *Drosophila* Brahma (SWI/SNF) chromatin remodeling complex exhibits cell-type specific activation and repression functions. *Dev. Biol.* 267, 279–293.
- Margueron, R., Trojer, P., and Reinberg, D. (2005). The key to development: interpreting the histone code? *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15, 163–176.
- Markaki, Y., Christogianni, A., Politou, A.S., and Georgatos, S.D. (2009). Phosphorylation of histone H3 at Thr3 is part of a combinatorial pattern that marks and configures mitotic chromatin. *J. Cell. Sci.* 122, 2809–2819.
- Martinez, A.-M., and Cavalli, G. (2006). The role of polycomb group proteins in cell cycle regulation during development. *Cell Cycle* 5, 1189–1197.
- Marygold, S.J., Roote, J., Reuter, G., Lambertsson, A., Ashburner, M., Millburn, G.H., Harrison, P.M., Yu, Z., Kenmochi, N., Kaufman, T.C., et al. (2007). The ribosomal protein genes and Minute loci of *Drosophila melanogaster*. *Genome Biol.* 8, R216.
- Maurer-Stroh, S., Dickens, N.J., Hughes-Davies, L., Kouzarides, T., Eisenhaber, F., and Ponting, C.P. (2003). The Tudor domain “Royal Family”: Tudor, plant Agenet, Chromo, PWWP and MBT domains. *Trends Biochem. Sci.* 28, 69–74.
- McCLINTOCK, B. (1950). The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 36, 344–355.

- McConkey, E.H., Bielka, H., Gordon, J., Lastick, S.M., Lin, A., Ogata, K., Reboud, J.P., Traugh, J.A., Traut, R.R., Warner, J.R., et al. (1979). Proposed uniform nomenclature for mammalian ribosomal proteins. *Mol. Gen. Genet.* *169*, 1–6.
- Mello, C.C., and Conte, D., Jr (2004). Revealing the world of RNA interference. *Nature* *431*, 338–342.
- Mendenhall, E.M., Koche, R.P., Truong, T., Zhou, V.W., Issac, B., Chi, A.S., Ku, M., and Bernstein, B.E. (2010). GC-rich sequence elements recruit PRC2 in mammalian ES cells. *PLoS Genet.* *6*, e1001244.
- Menssen, A., and Hermeking, H. (2002). Characterization of the c-MYC-regulated transcriptome by SAGE: identification and analysis of c-MYC target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 6274–6279.
- Messmer, S., Franke, A., and Paro, R. (1992). Analysis of the functional role of the Polycomb chromo domain in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.* *6*, 1241–1254.
- Metzger, E., Wissmann, M., Yin, N., Müller, J.M., Schneider, R., Peters, A.H.F.M., Günther, T., Buettner, R., and Schüle, R. (2005). LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature* *437*, 436–439.
- Miao, F., Li, S., Chavez, V., Lanting, L., and Natarajan, R. (2006). Coactivator-associated arginine methyltransferase-1 enhances nuclear factor-kappaB-mediated gene transcription through methylation of histone H3 at arginine 17. *Mol. Endocrinol.* *20*, 1562–1573.
- Mitrovich, Q.M. (2000). Unproductively spliced ribosomal protein mRNAs are natural targets of mRNA surveillance in *C. elegans*. *Genes & Development* *14*, 2173–2184.
- Morrison, A.J., and Shen, X. (2009a). Chromatin remodelling beyond transcription: the INO80 and SWR1 complexes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 373–384.
- Morrison, A.J., and Shen, X. (2009b). Chromatin remodelling beyond transcription: the INO80 and SWR1 complexes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *10*, 373–384.
- Mouchel-Vielh, E., Rougeot, J., Decoville, M., and Peronnet, F. (2011). The MAP kinase ERK and its scaffold protein MP1 interact with the chromatin regulator Corto during *Drosophila* wing tissue development. *BMC Dev Biol* *11*, 17.
- Mujtaba, S., Zeng, L., and Zhou, M.-M. (2007). Structure and acetyl-lysine recognition of the bromodomain. *Oncogene* *26*, 5521–5527.
- Murali, T., Pacifico, S., Yu, J., Guest, S., Roberts, G.G., 3rd, and Finley, R.L., Jr (2011a). DroID 2011: a comprehensive, integrated resource for protein, transcription factor, RNA and gene interactions for *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.* *39*, D736–743.
- Murali, T., Pacifico, S., Yu, J., Guest, S., Roberts, G.G., 3rd, and Finley, R.L., Jr (2011b). DroID 2011: a comprehensive, integrated resource for protein, transcription factor, RNA and gene interactions for *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.* *39*, D736–743.
- Murawsky, C.M., Brehm, A., Badenhorst, P., Lowe, N., Becker, P.B., and Travers, A.A. (2001). Tramtrack69 interacts with the dMi-2 subunit of the *Drosophila* NuRD chromatin remodelling complex. *EMBO Rep.* *2*, 1089–1094.
- Murayama, A., Ohmori, K., Fujimura, A., Minami, H., Yasuzawa-Tanaka, K., Kuroda, T., Oie, S., Daitoku, H., Okuwaki, M., Nagata, K., et al. (2008). Epigenetic control of rDNA loci in response to intracellular energy status. *Cell* *133*, 627–639.
- Muse, G.W., Gilchrist, D.A., Nechaev, S., Shah, R., Parker, J.S., Grissom, S.F., Zeitlinger, J., and Adelman, K. (2007). RNA polymerase is poised for activation across the genome. *Nat. Genet.* *39*, 1507–1511.
- Myer, V.E., and Young, R.A. (1998). RNA Polymerase II Holoenzymes and Subcomplexes. *J. Biol. Chem.* *273*, 27757–27760.
- Nakayama, J., Rice, J.C., Strahl, B.D., Allis, C.D., and Grewal, S.I. (2001). Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* *292*, 110–113.
- Nechaev, S., and Adelman, K. (2008). Promoter-proximal Pol II: when stalling speeds things up. *Cell Cycle* *7*, 1539–1544.

- Nechaev, S., and Adelman, K. (2011). Pol II waiting in the starting gates: Regulating the transition from transcription initiation into productive elongation. *Biochim. Biophys. Acta* 1809, 34–45.
- Nechaev, S., Fargo, D.C., dos Santos, G., Liu, L., Gao, Y., and Adelman, K. (2010). Global analysis of short RNAs reveals widespread promoter-proximal stalling and arrest of Pol II in *Drosophila*. *Science* 327, 335–338.
- Ng, H.H., and Bird, A. (2000). Histone deacetylases: silencers for hire. *Trends Biochem. Sci.* 25, 121–126.
- Ni, J.-Q. (2006). *Drosophila* ribosomal proteins are associated with linker histone H1 and suppress gene transcription. *Genes & Development* 20, 1959–1973.
- Nishida, H., Suzuki, T., Kondo, S., Miura, H., Fujimura, Y., and Hayashizaki, Y. (2006). Histone H3 acetylated at lysine 9 in promoter is associated with low nucleosome density in the vicinity of transcription start site in human cell. *Chromosome Res.* 14, 203–211.
- O’Kane, C.J., and Gehring, W.J. (1987). Detection in situ of genomic regulatory elements in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 9123–9127.
- Oeffinger, M., and Tollervey, D. (2003). Yeast Nop15p is an RNA-binding protein required for pre-rRNA processing and cytokinesis. *Embo J.* 22, 6573–6583.
- Oesterreich, F.C., Bieberstein, N., and Neugebauer, K.M. (2011). Pause locally, splice globally. *Trends Cell Biol.* 21, 328–335.
- Oskarsson, T., and Trumpp, A. (2005). The Myc trilogy: lord of RNA polymerases. *Nat. Cell Biol.* 7, 215–217.
- Ota, T., Suto, S., Katayama, H., Han, Z.-B., Suzuki, F., Maeda, M., Tanino, M., Terada, Y., and Tatsuka, M. (2002). Increased mitotic phosphorylation of histone H3 attributable to AIM-1/Aurora-B overexpression contributes to chromosome number instability. *Cancer Res.* 62, 5168–5177.
- Pal, M., Ponticelli, A.S., and Luse, D.S. (2005). The role of the transcription bubble and TFIIB in promoter clearance by RNA polymerase II. *Mol. Cell* 19, 101–110.
- Pang, C.N.I., Gasteiger, E., and Wilkins, M.R. (2010). Identification of arginine- and lysine-methylation in the proteome of *Saccharomyces cerevisiae* and its functional implications. *BMC Genomics* 11, 92.
- Papoulas, O., Beek, S.J., Moseley, S.L., McCallum, C.M., Sarte, M., Shearn, A., and Tamkun, J.W. (1998). The *Drosophila* trithorax group proteins BRM, ASH1 and ASH2 are subunits of distinct protein complexes. *Development* 125, 3955–3966.
- Paro, R., and Hogness, D.S. (1991). The Polycomb protein shares a homologous domain with a heterochromatin-associated protein of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 263–267.
- Pavlakis, G.N., Jordan, B.R., Wurst, R.M., and Voumakis, J.N. (1979). Sequence and secondary structure of *Drosophila melanogaster* 5.8S and 2S rRNAs and of the processing site between them. *Nucleic Acids Res.* 7, 2213–2238.
- Peng, J., Zhu, Y., Milton, J.T., and Price, D.H. (1998). Identification of multiple cyclin subunits of human P-TEFb. *Genes Dev.* 12, 755–762.
- Pérez-Lluch, S., Blanco, E., Carbonell, A., Raha, D., Snyder, M., Serras, F., and Corominas, M. (2011). Genome-wide chromatin occupancy analysis reveals a role for ASH2 in transcriptional pausing. *Nucleic Acids Res.* 39, 4628–4639.
- Pestov, D.G., Stockelman, M.G., Strezoska, Z., and Lau, L.F. (2001a). ERB1, the yeast homolog of mammalian Bop1, is an essential gene required for maturation of the 25S and 5.8S ribosomal RNAs. *Nucleic Acids Res.* 29, 3621–3630.
- Pestov, D.G., Strezoska, Z., and Lau, L.F. (2001b). Evidence of p53-dependent cross-talk between ribosome biogenesis and the cell cycle: effects of nucleolar protein Bop1 on G(1)/S transition. *Mol. Cell Biol.* 21, 4246–4255.
- Peterlin, B.M., and Price, D.H. (2006). Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. *Mol. Cell* 23, 297–305.
- Peterson, C.L., and Herskowitz, I. (1992). Characterization of the yeast SWI1, SWI2, and SWI3 genes, which encode a global activator of transcription. *Cell* 68, 573–583.

- Petesch, S.J., and Lis, J.T. (2012). Activator-induced spread of poly(ADP-ribose) polymerase promotes nucleosome loss at Hsp70. *Mol. Cell* 45, 64–74.
- Petruk, S., Sedkov, Y., Smith, S., Tillib, S., Kraevski, V., Nakamura, T., Canaani, E., Croce, C.M., and Mazo, A. (2001). Trithorax and dCBP acting in a complex to maintain expression of a homeotic gene. *Science* 294, 1331–1334.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Pinskaya, M., and Morillon, A. (2009). Histone H3 lysine 4 di-methylation: a novel mark for transcriptional fidelity? *Epigenetics* 4, 302–306.
- Plafker, S.M., and Macara, I.G. (2002). Ribosomal protein L12 uses a distinct nuclear import pathway mediated by importin 11. *Mol. Cell. Biol.* 22, 1266–1275.
- Platero, J.S., Hartnett, T., and Eissenberg, J.C. (1995). Functional analysis of the chromo domain of HP1. *Embo J.* 14, 3977–3986.
- Plath, K., Fang, J., Mlynarczyk-Evans, S.K., Cao, R., Worringer, K.A., Wang, H., de la Cruz, C.C., Otte, A.P., Panning, B., and Zhang, Y. (2003). Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science* 300, 131–135.
- Polevoda, B., and Sherman, F. (2007). Methylation of proteins involved in translation. *Molecular Microbiology* 65, 590–606.
- Porras-Yakushi, T.R., Whitelegge, J.P., and Clarke, S. (2006). A Novel SET Domain Methyltransferase in Yeast. *Journal of Biological Chemistry* 281, 35835–35845.
- Proshkin, S., Rahmouni, A.R., Mironov, A., and Nudler, E. (2010). Cooperation between translating ribosomes and RNA polymerase in transcription elongation. *Science* 328, 504–508.
- Qiu, D., Parada, P., Marcos, A.G., Cárdenas, D., Remacha, M., and Ballesta, J.P.G. (2006). Different roles of P1 and P2 *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal stalk proteins revealed by cross-linking. *Mol. Microbiol.* 62, 1191–1202.
- Rachez, C., and Freedman, L.P. (2001). Mediator complexes and transcription. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 274–280.
- Rahl, P.B., Lin, C.Y., Seila, A.C., Flynn, R.A., McCuine, S., Burge, C.B., Sharp, P.A., and Young, R.A. (2010). c-Myc regulates transcriptional pause release. *Cell* 141, 432–445.
- Rasmussen, E.B., and Lis, J.T. (1993). In vivo transcriptional pausing and cap formation on three *Drosophila* heat shock genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 7923–7927.
- Rassoulzadegan, M., Grandjean, V., Gounon, P., Vincent, S., Gillot, I., and Cuzin, F. (2006). RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature* 441, 469–474.
- Rea, S., Eisenhaber, F., O’Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D., et al. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 406, 593–599.
- Rea, S., Xouri, G., and Akhtar, A. (2007). Males absent on the first (MOF): from flies to humans. *Oncogene* 26, 5385–5394.
- Remacha, M., Jimenez-Diaz, A., Santos, C., Briones, E., Zambrano, R., Rodriguez Gabriel, M.A., Guarinos, E., and Ballesta, J.P. (1995). Proteins P1, P2, and P0, components of the eukaryotic ribosome stalk. New structural and functional aspects. *Biochem. Cell Biol.* 73, 959–968.
- Renner, D.B., Yamaguchi, Y., Wada, T., Handa, H., and Price, D.H. (2001). A highly purified RNA polymerase II elongation control system. *J. Biol. Chem.* 276, 42601–42609.
- Ridgway, P., and Almouzni, G. (2001). Chromatin Assembly and Organization. *J Cell Sci* 114, 2711–2712.
- Riggs, A.D., Russo, V.E.A., Martienssen, R.A. 1996 Epigenetic mechanisms of gene regulation. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY.
- Ringrose, L., and Paro, R. (2007). Polycomb/Trithorax response elements and epigenetic memory of cell identity. *Development* 134, 223–232.
- Ringrose, L., Rehmsmeier, M., Dura, J.-M., and Paro, R. (2003). Genome-wide prediction of Polycomb/Trithorax response elements in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Cell* 5, 759–771.

- Rinn, J.L., Kertesz, M., Wang, J.K., Squazzo, S.L., Xu, X., Brugmann, S.A., Goodnough, L.H., Helms, J.A., Farnham, P.J., Segal, E., et al. (2007). Functional Demarcation of Active and Silent Chromatin Domains in Human HOX Loci by Noncoding RNAs. *Cell* 129, 1311–1323.
- Roberts, J.W. (2010). Molecular biology. Syntheses that stay together. *Science* 328, 436–437.
- Rodriguez-Gabriel, M.A., Bou, G., Briones, E., Zambrano, R., Remacha, M., and Ballesta, J.P. (1999). Structure and function of the stalk, a putative regulatory element of the yeast ribosome. Role of stalk protein phosphorylation. *Folia Microbiol. (Praha)* 44, 153–163.
- Rodriguez-Mateos, M., Garcia-Gomez, J.J., Francisco-Velilla, R., Remacha, M., de la Cruz, J., and Ballesta, J.P.G. (2009). Role and dynamics of the ribosomal protein P0 and its related trans-acting factor Mrt4 during ribosome assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research* 37, 7519–7532.
- Rougvie, A.E., and Lis, J.T. (1988). The RNA polymerase II molecule at the 5' end of the uninduced hsp70 gene of *D. melanogaster* is transcriptionally engaged. *Cell* 54, 795–804.
- Rout, M.P., Blobel, G., and Aitchison, J.D. (1997). A distinct nuclear import pathway used by ribosomal proteins. *Cell* 89, 715–725.
- Roy, V., Monti-Dedieu, L., Chaminade, N., Siljak-Yakovlev, S., Aulard, S., Lemeunier, F., and Montchamp-Moreau, C. (2005). Evolution of the chromosomal location of rDNA genes in two *Drosophila* species subgroups: *ananassae* and *melanogaster*. *Heredity (Edinb)* 94, 388–395.
- De Rubertis, F., Kadosh, D., Henchoz, S., Pauli, D., Reuter, G., Struhl, K., and Spierer, P. (1996). The histone deacetylase RPD3 counteracts genomic silencing in *Drosophila* and yeast. *Nature* 384, 589–591.
- Russell, J., and Zomerdijk, J.C.B.M. (2005). RNA-polymerase-I-directed rDNA transcription, life and works. *Trends in Biochemical Sciences* 30, 87–96.
- Rybtsova, N., Leimgruber, E., Seguin-Estévez, Q., Dunand-Sauthier, I., Krawczyk, M., and Reith, W. (2007). Transcription-coupled deposition of histone modifications during MHC class II gene activation. *Nucleic Acids Res.* 35, 3431–3441.
- Sadaie, M., Shinmyozu, K., and Nakayama, J. (2008). A Conserved SET Domain Methyltransferase, Set11, Modifies Ribosomal Protein Rpl12 in Fission Yeast. *Journal of Biological Chemistry* 283, 7185–7195.
- Saeboe-Larsen, S., Lyamouri, M., Merriam, J., Oksvold, M.P., and Lambertsson, A. (1998). Ribosomal protein insufficiency and the minute syndrome in *Drosophila*: a dose-response relationship. *Genetics* 148, 1215–1224.
- Salvaing, J., Decoville, M., Mouchel-Vielh, E., Bussière, M., Daulny, A., Boldyreva, L., Zhimulev, I., Locker, D., and Peronnet, F. (2006). Corto and DSP1 interact and bind to a maintenance element of the *Scr* Hox gene: understanding the role of Enhancers of trithorax and Polycomb. *BMC Biol* 4, 9.
- Salvaing, J., Lopez, A., Boivin, A., Deutsch, J.S., and Peronnet, F. (2003). The *Drosophila* Corto protein interacts with Polycomb-group proteins and the GAGA factor. *Nucleic Acids Res* 31, 2873–2882.
- Salvaing, J., Mouchel-Vielh, E., Bloyer, S., Preiss, A., and Peronnet, F. (2008a). Regulation of Abd-B expression by Cyclin G and Corto in the abdominal epithelium of *Drosophila*. *Hereditas* 145, 138–146.
- Salvaing, J., Nagel, A.C., Mouchel-Vielh, E., Bloyer, S., Maier, D., Preiss, A., and Peronnet, F. (2008b). The Enhancer of Trithorax and Polycomb Corto Interacts with Cyclin G in *Drosophila*. *PLoS ONE* 3,
- Sankar, N., Baluchamy, S., Kadeppagari, R.-K., Singhal, G., Weitzman, S., and Thimmapaya, B. (2008). p300 provides a corepressor function by cooperating with YY1 and HDAC3 to repress c-Myc. *Oncogene* 27, 5717–5728.
- Saracino, F., Bassler, J., Muzzini, D., Hurt, E., and Agostoni Carbone, M.L. (2004). The yeast kinase Swe1 is required for proper entry into cell cycle after arrest due to ribosome biogenesis and protein synthesis defects. *Cell Cycle* 3, 648–654.

- Saurin, A.J., Shao, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Kingston, R.E. (2001). A *Drosophila* Polycomb group complex includes Zeste and dTAFII proteins. *Nature* *412*, 655–660.
- Saxena, A., and Carninci, P. (2011). Long non-coding RNA modifies chromatin: epigenetic silencing by long non-coding RNAs. *Bioessays* *33*, 830–839.
- Scheer, U., and Hock, R. (1999). Structure and function of the nucleolus. *Curr. Opin. Cell Biol.* *11*, 385–390.
- Scheuermann, J.C., de Ayala Alonso, A.G., Oktaba, K., Ly-Hartig, N., McGinty, R.K., Fraterman, S., Wilm, M., Muir, T.W., and Müller, J. (2010). Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB. *Nature* *465*, 243–247.
- Schmucker, D., Clemens, J.C., Shu, H., Worby, C.A., Xiao, J., Muda, M., Dixon, J.E., and Zipursky, S.L. (2000). *Drosophila* Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. *Cell* *101*, 671–684.
- Schneider, I. (1972). Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol* *27*, 353–365.
- Schotta, G., Ebert, A., Krauss, V., Fischer, A., Hoffmann, J., Rea, S., Jenuwein, T., Dorn, R., and Reuter, G. (2002). Central role of *Drosophila* SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *Embo J.* *21*, 1121–1131.
- Schotta, G., Lachner, M., Sarma, K., Ebert, A., Sengupta, R., Reuter, G., Reinberg, D., and Jenuwein, T. (2004). A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev.* *18*, 1251–1262.
- Schroder, P.A., and Moore, M.J. (2005). Association of ribosomal proteins with nascent transcripts in *S. cerevisiae*. *RNA* *11*, 1521–1529.
- Schuettengruber, B., and Cavalli, G. (2009). Recruitment of polycomb group complexes and their role in the dynamic regulation of cell fate choice. *Development* *136*, 3531–3542.
- Schuettengruber, B., Martinez, A.-M., Iovino, N., and Cavalli, G. (2011). Trithorax group proteins: switching genes on and keeping them active. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *12*, 799–814.
- Schurter, B.T., Koh, S.S., Chen, D., Bunick, G.J., Harp, J.M., Hanson, B.L., Henschen-Edman, A., Mackay, D.R., Stallcup, M.R., and Aswad, D.W. (2001). Methylation of histone H3 by coactivator-associated arginine methyltransferase 1. *Biochemistry* *40*, 5747–5756.
- Schwartz, S., Meshorer, E., and Ast, G. (2009). Chromatin organization marks exon-intron structure. *Nature Structural & Molecular Biology* *16*, 990–995.
- Schwartz, Y.B., and Pirrotta, V. (2008). Polycomb complexes and epigenetic states. *Curr. Opin. Cell Biol.* *20*, 266–273.
- Seki, Y., Williams, L., Vuguin, P.M., and Charron, M.J. (2012). Minireview: epigenetic programming of diabetes and obesity: animal models. *Endocrinology* *153*, 1031–1038.
- 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.
- Shao, Z., Raible, F., Mollaaghababa, R., Guyon, J.R., Wu, C.T., Bender, W., and Kingston, R.E. (1999a). Stabilization of chromatin structure by PRC1, a Polycomb complex. *Cell* *98*, 37–46.
- Shao, Z., Raible, F., Mollaaghababa, R., Guyon, J.R., Wu, C.T., Bender, W., and Kingston, R.E. (1999b). Stabilization of chromatin structure by PRC1, a Polycomb complex. *Cell* *98*, 37–46.
- Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J.R., Cole, P.A., Casero, R.A., and Shi, Y. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* *119*, 941–953.
- Shi, Y.-J., Matson, C., Lan, F., Iwase, S., Baba, T., and Shi, Y. (2005). Regulation of LSD1 histone demethylase activity by its associated factors. *Mol. Cell* *19*, 857–864.
- Shirai, A., Sadaie, M., Shinmyozu, K., and Nakayama, J. (2010). Methylation of ribosomal protein L42 regulates ribosomal function and stress-adapted cell growth. *J. Biol. Chem.* *285*, 22448–22460.

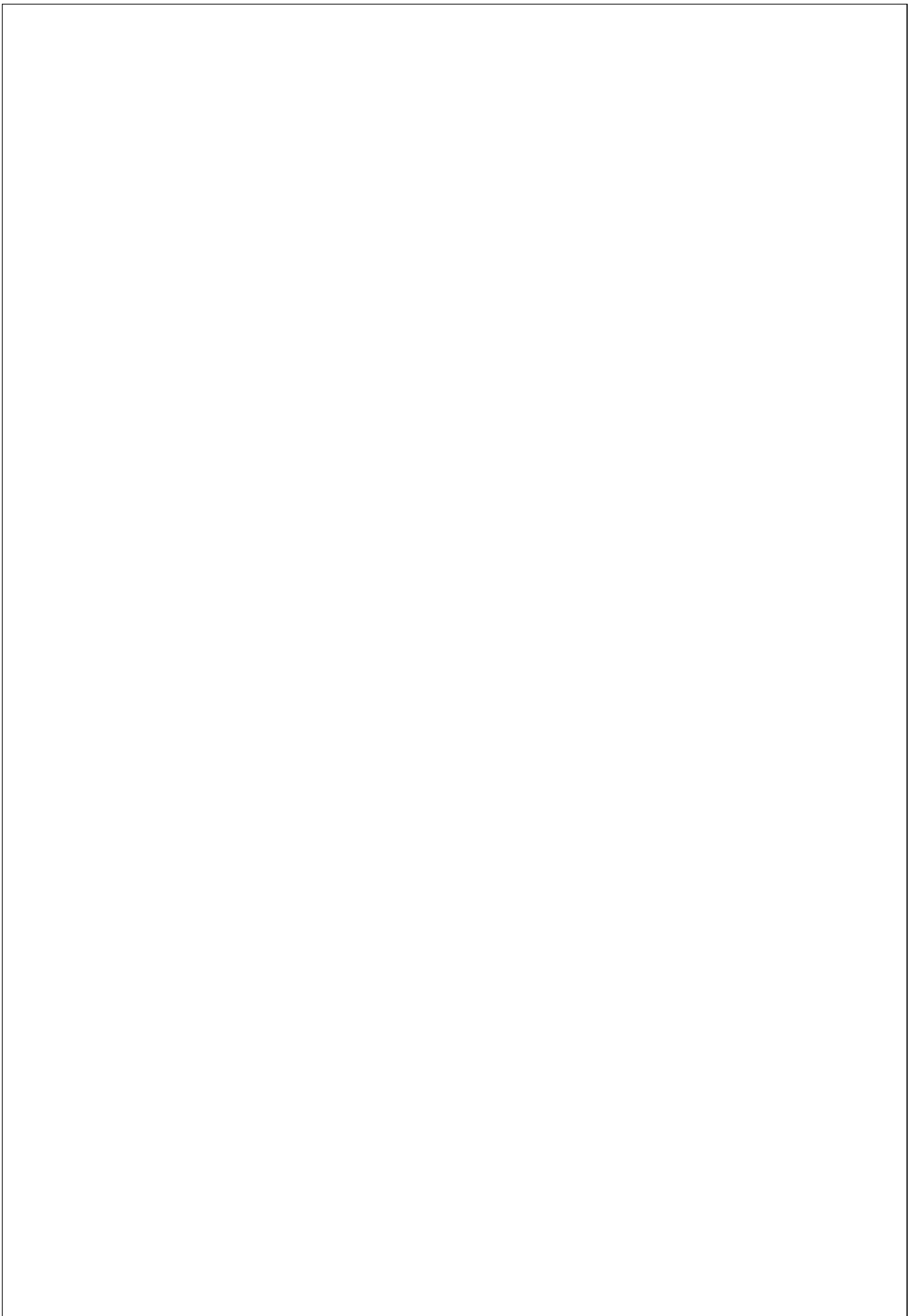
- Simonis, M., Klous, P., Splinter, E., Moshkin, Y., Willemsen, R., de Wit, E., van Steensel, B., and de Laat, W. (2006). Nuclear organization of active and inactive chromatin domains uncovered by chromosome conformation capture-on-chip (4C). *Nat. Genet.* *38*, 1348–1354.
- Sims, J.K., Houston, S.I., Magazinnik, T., and Rice, J.C. (2006). A trans-tail histone code defined by monomethylated H4 Lys-20 and H3 Lys-9 demarcates distinct regions of silent chromatin. *J. Biol. Chem.* *281*, 12760–12766.
- Sing, A., Pannell, D., Karaiskakis, A., Sturgeon, K., Djabali, M., Ellis, J., Lipshitz, H.D., and Cordes, S.P. (2009). A vertebrate Polycomb response element governs segmentation of the posterior hindbrain. *Cell* *138*, 885–897.
- Sistayanarain, A., Tsuneyama, K., Zheng, H., Takahashi, H., Nomoto, K., Cheng, C., Murai, Y., Tanaka, A., and Takano, Y. (2006). Expression of Aurora-B kinase and phosphorylated histone H3 in hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res.* *26*, 3585–3593.
- Smith, E.R., Lee, M.G., Winter, B., Droz, N.M., Eissenberg, J.C., Shiekhatar, R., and Shilatifard, A. (2008). Drosophila UTX is a histone H3 Lys27 demethylase that colocalizes with the elongating form of RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 1041–1046.
- Smulders-Srinivasan, T.K., Szakmary, A., and Lin, H. (2010). A Drosophila Chromatin Factor Interacts With the Piwi-Interacting RNA Mechanism in Niche Cells to Regulate Germline Stem Cell Self-Renewal. *Genetics* *186*, 573–583.
- Souza, P.P., Völkel, P., Trinel, D., Vandamme, J., Rosnoblet, C., Héliot, L., and Angrand, P.-O. (2009). The histone methyltransferase SUV420H2 and Heterochromatin Proteins HP1 interact but show different dynamic behaviours. *BMC Cell Biol.* *10*, 41.
- Stark, C., Breikreutz, B.-J., Reguly, T., Boucher, L., Breikreutz, A., and Tyers, M. (2006). BioGRID: a general repository for interaction datasets. *Nucleic Acids Res.* *34*, D535–539.
- Steitz, T.A. (2008). A structural understanding of the dynamic ribosome machine. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 242–253.
- Stelzl, U., Worm, U., Lalowski, M., Haenig, C., Brembeck, F.H., Goehler, H., Stroedicke, M., Zenkner, M., Schoenherr, A., Koeppen, S., et al. (2005). A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome. *Cell* *122*, 957–968.
- Strahl, B.D., and Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* *403*, 41–45.
- Strezoska, Z., Pestov, D.G., and Lau, L.F. (2002). Functional inactivation of the mouse nucleolar protein Bop1 inhibits multiple steps in pre-rRNA processing and blocks cell cycle progression. *J. Biol. Chem.* *277*, 29617–29625.
- Sugiyama, K., Sugiura, K., Hara, T., Sugimoto, K., Shima, H., Honda, K., Furukawa, K., Yamashita, S., and Urano, T. (2002). Aurora-B associated protein phosphatases as negative regulators of kinase activation. *Oncogene* *21*, 3103–3111.
- Sun, X.-X., Wang, Y.-G., Xirodimas, D.P., and Dai, M.-S. (2010). Perturbation of 60 S ribosomal biogenesis results in ribosomal protein L5- and L11-dependent p53 activation. *J. Biol. Chem.* *285*, 25812–25821.
- Sural, T.H., Peng, S., Li, B., Workman, J.L., Park, P.J., and Kuroda, M.I. (2008). The MSL3 chromodomain directs a key targeting step for dosage compensation of the Drosophila melanogaster X chromosome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *15*, 1318–1325.
- Surovtseva, Y.V., Shutt, T.E., Cotney, J., Cimen, H., Chen, S.Y., Koc, E.C., and Shadel, G.S. (2011). Mitochondrial Ribosomal Protein L12 selectively associates with human mitochondrial RNA polymerase to activate transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *108*, 17921–17926.
- Tajul-Arifin, K., Teasdale, R., Ravasi, T., Hume, D.A., and Mattick, J.S. (2003). Identification and analysis of chromodomain-containing proteins encoded in the mouse transcriptome. *Genome Res.* *13*, 1416–1429.
- Takahashi, J., Fujigasaki, H., Iwabuchi, K., Bruni, A.C., Uchihara, T., El Hachimi, K.H., Stevanin, G., Dürr, A., Lebre, A.S., Trotter, Y., et al. (2003). PML nuclear bodies and neuronal intranuclear inclusion in polyglutamine diseases. *Neurobiol. Dis.* *13*, 230–237.

- Tamkun, J.W., Deuring, R., Scott, M.P., Kissinger, M., Pattatucci, A.M., Kaufman, T.C., and Kennison, J.A. (1992). *brahma*: a regulator of *Drosophila* homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell* 68, 561–572.
- Tan, M., Luo, H., Lee, S., Jin, F., Yang, J.S., Montellier, E., Buchou, T., Cheng, Z., Rousseaux, S., Rajagopal, N., et al. (2011). Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell* 146, 1016–1028.
- Tanaka, Y., Katagiri, Z.-I., Kawahashi, K., Kioussis, D., and Kitajima, S. (2007). Trithorax-group protein ASH1 methylates histone H3 lysine 36. *Gene* 397, 161–168.
- Tang, L., Nogales, E., and Ciferri, C. (2010). Structure and function of SWI/SNF chromatin remodeling complexes and mechanistic implications for transcription. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 102, 122–128.
- Tan-Wong, S.M., Wijayatilake, H.D., and Proudfoot, N.J. (2009). Gene loops function to maintain transcriptional memory through interaction with the nuclear pore complex. *Genes & Development* 23, 2610–2624.
- Tasheva, E.S., and Roufa, D.J. (1995). Regulation of human RPS14 transcription by intronic antisense RNAs and ribosomal protein S14. *Genes Dev.* 9, 304–316.
- Taverna, S.D., Li, H., Ruthenburg, A.J., Allis, C.D., and Patel, D.J. (2007). How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 1025–1040.
- Tie, F., Banerjee, R., Stratton, C.A., Prasad-Sinha, J., Stepanik, V., Zlobin, A., Diaz, M.O., Scacheri, P.C., and Harte, P.J. (2009). CBP-mediated acetylation of histone H3 lysine 27 antagonizes *Drosophila* Polycomb silencing. *Development* 136, 3131–3141.
- Tu, W.-Y., Huang, Y.-C., Liu, L.-F., Chang, L.-H., and Tam, M.F. (2011). Rpl12p affects the transcription of the PHO pathway high-affinity inorganic phosphate transporters and repressible phosphatases. *Yeast* 28, 481–493.
- Vaquero, A., Scher, M., Lee, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Reinberg, D. (2004). Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Mol. Cell* 16, 93–105.
- Varier, R.A., Outchkourov, N.S., de Graaf, P., van Schaik, F.M.A., Ensing, H.J.L., Wang, F., Higgins, J.M.G., Kops, G.J.P.L., and Timmers, H.T.M. (2010). A phospho/methyl switch at histone H3 regulates TFIID association with mitotic chromosomes. *Embo J.* 29, 3967–3978.
- Venema, J., and Tollervey, D. (1999). Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.* 33, 261–311.
- Verdel, A., Vavasseur, A., Le Gorrec, M., and Touat-Todeschini, L. (2009). Common themes in siRNA-mediated epigenetic silencing pathways. *Int. J. Dev. Biol.* 53, 245–257.
- Wahl, M.C., and Möller, W. (2002). Structure and function of the acidic ribosomal stalk proteins. *Curr. Protein Pept. Sci.* 3, 93–106.
- Wan, F., Anderson, D.E., Barnitz, R.A., Snow, A., Bidere, N., Zheng, L., Hegde, V., Lam, L.T., Staudt, L.M., Levens, D., et al. (2007). Ribosomal protein S3: a KH domain subunit in NF- κ B complexes that mediates selective gene regulation. *Cell* 131, 927–939.
- Wang, C., Cai, W., Li, Y., Deng, H., Bao, X., Girton, J., Johansen, J., and Johansen, K.M. (2011). The epigenetic H3S10 phosphorylation mark is required for counteracting heterochromatic spreading and gene silencing in *Drosophila melanogaster*. *J. Cell. Sci.* 124, 4309–4317.
- Warner, J.R., and McIntosh, K.B. (2009). How Common Are Extraribosomal Functions of Ribosomal Proteins? *Molecular Cell* 34, 3–11.
- Waterland, R.A., Travisano, M., Tahiliani, K.G., Rached, M.T., and Mirza, S. (2008). Methyl donor supplementation prevents transgenerational amplification of obesity. *International Journal of Obesity* 32, 1373–1379.
- Webb, K.J., Lipson, R.S., Al-Hadid, Q., Whitelegge, J.P., and Clarke, S.G. (2010). Identification of protein N-terminal methyltransferases in yeast and humans. *Biochemistry* 49, 5225–5235.
- Weiler, K.S., and Wakimoto, B.T. (1995). Heterochromatin and gene expression in *Drosophila*. *Annu. Rev. Genet.* 29, 577–605.

- Wen, Y., and Shatkin, A.J. (1999). Transcription elongation factor hSPT5 stimulates mRNA capping. *Genes Dev.* *13*, 1774–1779.
- Werner, F. (2012). A nexus for gene expression-molecular mechanisms of Spt5 and NusG in the three domains of life. *J. Mol. Biol.* *417*, 13–27.
- Wessler, S.R. (2006). Transposable elements and the evolution of eukaryotic genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 17600–17601.
- Wheeler, B.S., Ruderman, B.T., Willard, H.F., and Scott, K.C. (2011). Uncoupling of Genomic and Epigenetic Signals in the Maintenance and Inheritance of Heterochromatin Domains in Fission Yeast. *Genetics* *190*, 549–557.
- White, R.J. (2011). Transcription by RNA polymerase III: more complex than we thought. *Nat. Rev. Genet.* *12*, 459–463.
- Wiles, A.M., Doderer, M., Ruan, J., Gu, T.-T., Ravi, D., Blackman, B., and Bishop, A.J.R. (2010). Building and analyzing protein interactome networks by cross-species comparisons. *BMC Syst Biol* *4*, 36.
- Will, C.L., and Lührmann, R. (2011). Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *3*.
- Winston, F., and Carlson, M. (1992). Yeast SNF/SWI transcriptional activators and the SPT/SIN chromatin connection. *Trends in Genetics* *8*, 387–391.
- Winter, S., Fischle, W., and Seiser, C. (2008a). Modulation of 14-3-3 interaction with phosphorylated histone H3 by combinatorial modification patterns. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* *7*, 1336.
- Winter, S., Simboeck, E., Fischle, W., Zupkovitz, G., Dohnal, I., Mechtler, K., Ammerer, G., and Seiser, C. (2008b). 14-3-3 proteins recognize a histone code at histone H3 and are required for transcriptional activation. *Embo J.* *27*, 88–99.
- Wissmann, M., Yin, N., Müller, J.M., Greschik, H., Fodor, B.D., Jenuwein, T., Vogler, C., Schneider, R., Günther, T., Buettner, R., et al. (2007). Cooperative demethylation by JMJD2C and LSD1 promotes androgen receptor-dependent gene expression. *Nat. Cell Biol.* *9*, 347–353.
- Wojtowicz, W.M., Flanagan, J.J., Millard, S.S., Zipursky, S.L., and Clemens, J.C. (2004). Alternative splicing of *Drosophila* Dscam generates axon guidance receptors that exhibit isoform-specific homophilic binding. *Cell* *118*, 619–633.
- Wolf, J.B., and Wade, M.J. (2009). What are maternal effects (and what are they not)? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* *364*, 1107.
- Wolffe, A.P., and Hayes, J.J. (1999). Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Res.* *27*, 711–720.
- Wool, I.G., Chan, Y.L., Glück, A., and Suzuki, K. (1991). The primary structure of rat ribosomal proteins P0, P1, and P2 and a proposal for a uniform nomenclature for mammalian and yeast ribosomal proteins. *Biochimie* *73*, 861–870.
- Xiang, Y., Zhu, Z., Han, G., Lin, H., Xu, L., and Chen, C.D. (2007). JMJD3 is a histone H3K27 demethylase. *Cell Res.* *17*, 850–857.
- Xiong, X., Zhao, Y., He, H., and Sun, Y. (2011). Ribosomal protein S27-like and S27 interplay with p53-MDM2 axis as a target, a substrate and a regulator. *Oncogene* *30*, 1798–1811.
- Yamaguchi, Y., Narita, T., Inukai, N., Wada, T., and Handa, H. (2001). SPT genes: key players in the regulation of transcription, chromatin structure and other cellular processes. *J. Biochem.* *129*, 185–191.
- Yang, X.-J., and Seto, E. (2008). Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications. *Mol. Cell* *31*, 449–461.
- Yap, K.L., Li, S., Muñoz-Cabello, A.M., Raguz, S., Zeng, L., Mujtaba, S., Gil, J., Walsh, M.J., and Zhou, M.-M. (2010). Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. *Mol. Cell* *38*, 662–674.
- Yap, K.L., and Zhou, M.-M. (2010). Keeping it in the family: diverse histone recognition by conserved structural folds. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *45*, 488–505.

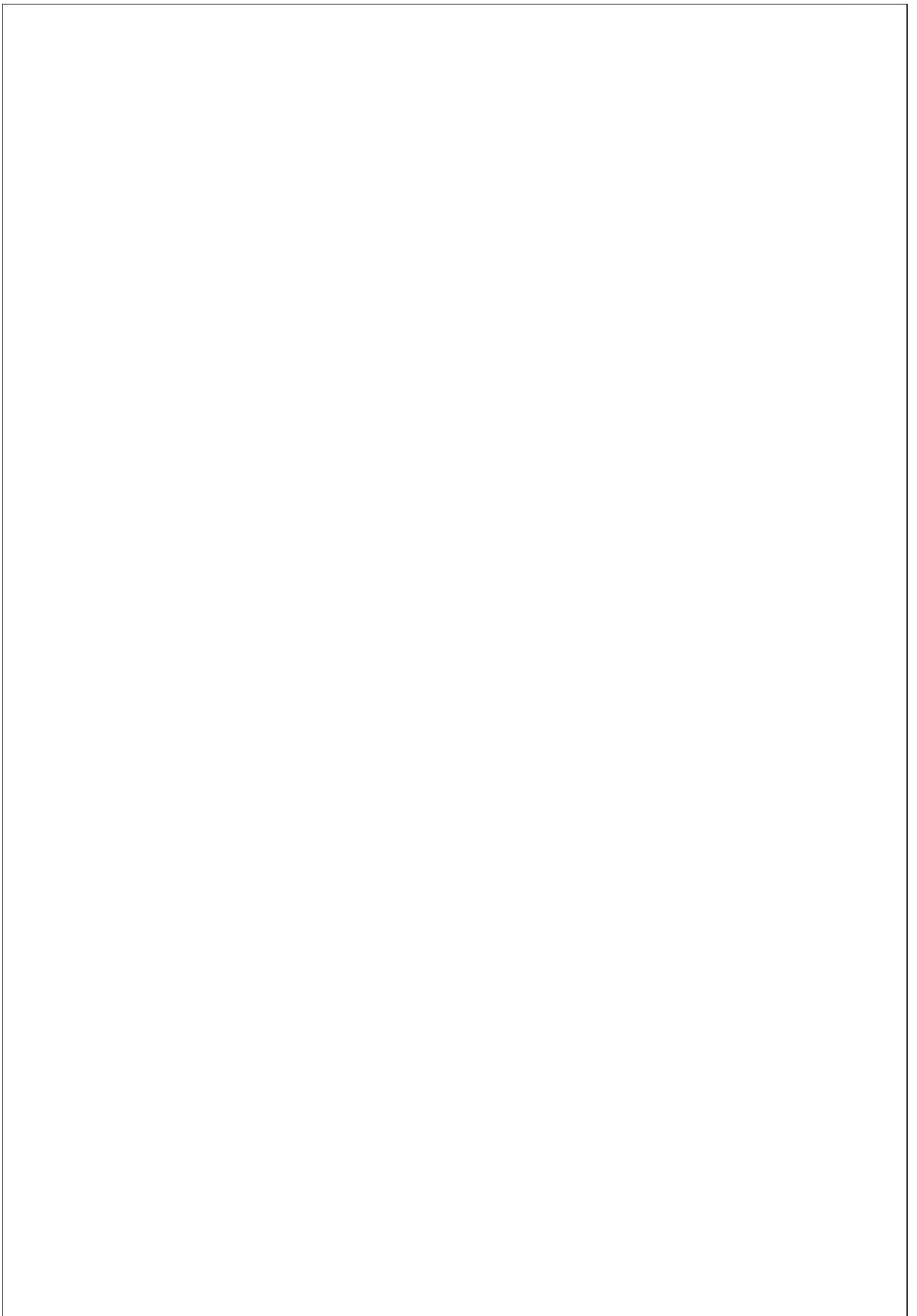
- Yap, K.L., and Zhou, M.-M. (2011). Structure and mechanisms of lysine methylation recognition by the chromodomain in gene transcription. *Biochemistry* 50, 1966–1980.
- Yin, H., Sweeney, S., Raha, D., Snyder, M., and Lin, H. (2011). A high-resolution whole-genome map of key chromatin modifications in the adult *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet.* 7, e1002380.
- Yuan, G., and Zhu, B. (2012). Histone variants and epigenetic inheritance. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1819, 222–229.
- Yuan, W., Xu, M., Huang, C., Liu, N., Chen, S., and Zhu, B. (2011). H3K36 methylation antagonizes PRC2-mediated H3K27 methylation. *J. Biol. Chem.* 286, 7983–7989.
- Zaidi, S.K., Young, D.W., Montecino, M.A., Lian, J.B., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., and Stein, G.S. (2010). Mitotic bookmarking of genes: a novel dimension to epigenetic control. *Nature Reviews Genetics* 11, 583–589.
- Zawel, L., Kumar, K.P., and Reinberg, D. (1995). Recycling of the general transcription factors during RNA polymerase II transcription. *Genes Dev.* 9, 1479–1490.
- Zeitlinger, J., Stark, A., Kellis, M., Hong, J.-W., Nechaev, S., Adelman, K., Levine, M., and Young, R.A. (2007). RNA polymerase stalling at developmental control genes in the *Drosophila melanogaster* embryo. *Nat. Genet.* 39, 1512–1516.
- Zhai, Y., and Fallon, A.M. (2005). PCR cloning of a histone H1 gene from *Anopheles stephensi* mosquito cells: comparison of the protein sequence with histone H1-like, C-terminal extensions on mosquito ribosomal protein S6. *BMC Genomics* 6, 8.
- Zhang, P., Du, J., Sun, B., Dong, X., Xu, G., Zhou, J., Huang, Q., Liu, Q., Hao, Q., and Ding, J. (2006a). Structure of human MRG15 chromo domain and its binding to Lys36-methylated histone H3. *Nucleic Acids Res.* 34, 6621–6628.
- Zhang, P., Zhao, J., Wang, B., Du, J., Lu, Y., Chen, J., and Ding, J. (2006b). The MRG domain of human MRG15 uses a shallow hydrophobic pocket to interact with the N-terminal region of PAM14. *Protein Sci.* 15, 2423–2434.
- Zhang, S., Rattanatrakul, L., McMillen, I.C., Suter, C.M., and Morrison, J.L. (2011). Periconceptional nutrition and the early programming of a life of obesity or adversity. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 106, 307–314.
- Zhang, X., Wen, H., and Shi, X. (2012). Lysine methylation: beyond histones. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 44, 14–27.
- Zhang, Y., Wang, J., Yuan, Y., Zhang, W., Guan, W., Wu, Z., Jin, C., Chen, H., Zhang, L., Yang, X., et al. (2010). Negative regulation of HDM2 to attenuate p53 degradation by ribosomal protein L26. *Nucleic Acids Res.* 38, 6544–6554.
- Zhou, X., Hao, Q., Liao, J., Zhang, Q., and Lu, H. (2012). Ribosomal protein S14 unties the MDM2-p53 loop upon ribosomal stress. *Oncogene*.
- Zhu, B., Zheng, Y., Pham, A.-D., Mandal, S.S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Reinberg, D. (2005). Monoubiquitination of human histone H2B: the factors involved and their roles in HOX gene regulation. *Mol. Cell* 20, 601–611.
- Zhu, P., Zhou, W., Wang, J., Puc, J., Ohgi, K.A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (2007). A histone H2A deubiquitinase complex coordinating histone acetylation and H1 dissociation in transcriptional regulation. *Mol. Cell* 27, 609–621.
- Zhu, Y., Poyurovsky, M.V., Li, Y., Biderman, L., Stahl, J., Jacq, X., and Prives, C. (2009). Ribosomal protein S7 is both a regulator and a substrate of MDM2. *Mol. Cell* 35, 316–326.

ANNEXES



Contenu des Annexes

Annexe 1 : RNA polymerase II holoenzyme components in <i>S. cerevisiae</i>.....	
Annexe 2 : Conservation des familles de remodeleurs de la chromatine de la levure à l'humain.	
Annexe 3 : Nouvelle nomenclature des enzymes de modification de la chromatine.....	
Annexe 4 : Tableau 1 de la revue « Readers of histone modifications »	
Annexe 5 : Tableau des complexes Polycomb, Trithorax et de leurs recruteurs..	
Annexe 6 : Figures et tables supplémentaires de l'Article.....	
Annexe 7 : Liste de publications antérieures à la thèse.....	
Annexe 8 : Principe de méthodes utilisées	



Annexe 1 : RNA polymerase II holoenzyme components in *S. cerevisiae* adapté de Myers et Young, 1998

Factor	Gene	Subunit kDa	Essential ?	Features	Refs .	
RNA polymerase II	<i>RPB1</i>	192	Y	Heptapeptide repeat	71, 72, 73	
	<i>RPB2</i>	139	Y		74	
	<i>RPB3</i>	35	Y		75	
	<i>RPB4</i>	25	N		76	
	<i>RPB5</i>	25	Y	Shared with Poll, II, III	77	
	<i>RPB6</i>	18	Y	Shared with Poll, II, III	77, 78	
	<i>RPB7</i>	19	Y		79	
	<i>RPB8</i>	17	Y	Shared with Poll, II, III	77	
	<i>RPB9</i>	14	N		80	
	<i>RPB10</i>	8	Y	Shared with Poll, II, III	81	
	<i>RPB11</i>	14	Y		82	
	<i>RPB12</i>	8	Y	Shared with Poll, II, III	83	
TFIIH	<i>TFB1</i>	73	Y	Nucleotide excision repair	84	
	<i>TFB2</i>	59	Y	Nucleotide excision repair	85	
	<i>TFB3</i>	32	Y	Nucleotide excision repair	85	
	<i>TFB4</i>	37	Y		85	
	<i>RAD3</i>	90	Y	DNA helicase	86	
	<i>SSL1</i>	52	Y	Nucleotide excision repair	86	
	<i>SSL2/RAD25</i>	95	Y	DNA helicase	87	
	<i>KIN28</i>	35	Y	Cyclin-dependent CTD kinase	88	
	<i>CCL1</i>	45	Y	Kin28 cyclin partner	89	
TFIIE	<i>TFA1</i>	55	Y		90	
	<i>TFA2</i>	37	Y		90	
TFIIF	<i>SSU1/TFG1</i>	82	Y		91	
	<i>TFG2</i>	47	Y		91	
	<i>ANC1/TFG3</i>	27	N		91	
TFIIB	<i>SUA7</i>	38	Y		92	
Srb	<i>SRB2</i>	23	N		1, 2, 4, 8, 30, 35	
	<i>SRB4</i>	78	Y		1, 4, 8,	
					35	
	<i>SRB5</i>	34	N		1, 4, 8, 35	
	<i>SRB6</i>	14	Y		1, 4, 8, 35	
	<i>SRB7</i>	16	Y		36	
	<i>SRB8</i>	166	N		36	
	<i>SRB9</i>	160	N		36	
	<i>SRB10</i>	63	N	Cyclin-dependent CTD kinase	55, 60	
	<i>SRB11</i>	38	N	Srb10 cyclin partner	55, 60	
Meds	<i>MED1</i>	64	N		29	
	<i>MED2</i>	48	N		29	
	<i>MED4</i>	32	Y		29	
	<i>MED6</i>	33	Y		29, 39	
	<i>MED7</i>	26	Y		29	
	<i>MED8</i>	25	Y		29	
	Gal11	<i>GAL11</i>	120	N		54, 93
	Rgr1	<i>RGR1</i>	123	Y		54
Sin4	<i>SIN4</i>	111	N		54	
Pgd1	<i>PGD1</i>	47	N		29, 46	
Rox3	<i>ROX3</i>	25	Y		94	
Swi/Snf	<i>SWI1</i>	148	N		63, 64	
	<i>SWI2/SNF2</i>	194	N	DNA-dependent ATPase	63, 64	
	<i>SWI3</i>	93	N		63, 64	
	<i>SNF5</i>	103	N		63, 64	
	<i>SNF6</i>	38	N		63, 64	
	<i>SNF11</i>	19	N		65	
	<i>SWp59p</i>	~59	?		63, 64	
	<i>SWp61p</i>	~61	?		63, 64	
	<i>SNF12/SWp73p</i>	64	N		95	
	<i>SWp82p</i>	~82	?		63, 64	
<i>ANC1/TFG3</i>	27	N		96		

1. Koleske, A. J., and Young, R. A. (1994) *Nature* **368**, 466-469
2. Nonet, M. L., and Young, R. A. (1989) *Genetics* **123**, 715-724
4. Kim, Y.-J., Bjorklund, S., Li, Y., Sayre, M. H., and Kornberg, R. D. (1994) *Cell* **77**, 599-608
8. Thompson, C. M., Koleske, A. J., Chao, D. M., and Young, R. A. (1993) *Cell* **73**, 1361-1375
29. Myers, L. C., Gustafsson, C. M., Bushnell, D. A., Lui, M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Kornberg, R. D. (1998) *Genes Dev.* **12**, 45-54
30. Koleske, A. J., Buratowski, S., Nonet, M., and Young, R. A. (1992) *Cell* **69**, 883-894
35. Koh, S. S., Ansari, A. Z., Ptashne, M., and Young, R. A. (1998) *Mol. Cell* **1**, 895-904
36. Hengartner, C. J., Thompson, C. M., Zhang, J., Chao, D. M., Liao, S.-M., Koleske, A. J., Okamura, S., and Young, R. A. (1995) *Genes Dev.* **9**, 897-910
39. Lee, Y. C., Min, S., Gim, B. S., and Kim, Y. J. (1997) *Mol. Cell. Biol.* **17**, 4622-4632
46. Piruat, J. I., Chavez, S., and Aguilera, A. (1997) *Genetics* **147**, 1585-1594
54. Li, Y., Bjorklund, S., Jiang, Y.-W., Kim, Y.-J., Lane, W. S., Stillman, D. J., and Kornberg, R. D. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 10864-10868
55. Liao, S.-M., Zhang, J., Jeffery, D. A., Koleske, A. J., Thompson, C. M., Chao, D. M., Viljoen, M., van Vuuren, H. J. J., and Young, R. A. (1995) *Nature* **374**, 193-196
60. Hengartner, C. J., Myer, V. E., Liao, S. M., Wilson, C. J., Koh, S. S., and Young, R. A. (1998) *Mol. Cell* **2**, 43-53
63. Treich, I., Cairns, B. R., de los Santos, T., Brewster, E., and Carlson, M. (1995) *Mol. Cell. Biol.* **15**, 4240-4248
64. Winston, F., and Carlson, M. (1992) *Trends & Genet.* **8**, 387-391
65. Peterson, C. L., and Tamkun, J. W. (1995) *Trends Biochem. Sci.* **20**, 143-146
71. Young, R. A., and Davis, R. W. (1983) *Science* **222**, 778-782
72. Ingles, C. J., Himmelfarb, H. J., Shales, M., Greenleaf, A. L., and Friesen, J. D. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 2157-2161
73. Allison, L. A., Moyle, M., Shales, M., and Ingles, C. J. (1985) *Cell* **42**, 599-610
74. Sweetser, D., Nonet, M., and Young, R. A. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 1192-1196
75. Kolodziej, P., and Young, R. A. (1989) *Mol. Cell. Biol.* **9**, 5387-5394
76. Woychik, N. A., and Young, R. A. (1989) *Mol. Cell. Biol.* **9**, 2854-2859
77. Woychik, N. A., Liao, S. M., Kolodziej, P. A., and Young, R. A. (1990) *Genes Dev.* **4**, 313-323
78. Woychik, N. A., and Young, R. A. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 3999-4003
79. McKune, K., Richards, K. L., Edwards, A. M., Young, R. A., and Woychik, N. A. (1993) *Yeast* **9**, 295-299
80. Woychik, N. A., Lane, W. S., and Young, R. A. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 19053-19055
81. Woychik, N. A., and Young, R. A. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 17816-17819
82. Woychik, N. A., McKune, K., Lane, W. S., and Young, R. A. (1993) *Gene Expr.* **3**, 77-82
83. Treich, I., Carles, C., Riva, M., and Sentenac, A. (1992) *Gene Expr.* **2**, 31-37
84. Gileadi, O., Feaver, W. J., and Kornberg, R. D. (1992) *Science* **257**, 1389-1392
85. Feaver, W. J., Henry, N. L., Wang, Z., Wu, X., Svejstrup, J. Q., Bushnell, D. A., Friedberg, E. C., and Kornberg, R. D. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 19319-19327
86. Feaver, W. J., Svejstrup, J. Q., Bardwell, L., Bardwell, A. J., Buratowski, S., Gulyas, K. D., Donahue, T. F., Friedberg, E. C., and Kornberg, R. D. (1993) *Cell* **75**, 1379-1387
87. Svejstrup, J. Q., Wang, Z., Feaver, W. J., Wu, X., Bushnell, D. A., Donahue, T. F., Friedberg, E. C., and Kornberg, R. D. (1995) *Cell* **80**, 21-28
88. Feaver, W. J., Svejstrup, J. Q., Henry, N. L., and Kornberg, R. D. (1994) *Cell* **79**, 1103-1109
89. Svejstrup, J. Q., and Feaver, W. J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 643-645
90. Feaver, W. J., Henry, N. L., Bushnell, D. A., Sayre, M. H., Brickner, J. H., Gileadi, O., and Kornberg, R. D. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 27549-27553
91. Henry, N. L., Campbell, A. M., Feaver, W. J., Poon, D., Weil, P. A., and Kornberg, R. D. (1994) *Genes Dev.* **8**, 2868-2878
92. Pinto, I., Ware, D. E., and Hampsey, M. (1992) *Cell* **68**, 977-988
93. Barberis, A., Pearlberg, J., Simkovich, N., Farrell, S., Reinagel, P., Bamdad, C., Sigal, G., and Ptashne, M. (1995) *Cell* **81**, 359-368
94. Gustafsson, C. M., Myers, L. C., Li, Y., Redd, M. J., Lui, M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Kornberg, R. D. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 48-50
95. Cairns, B. R., Levinson, R. S., Yamamoto, K. R., and Kornberg, R. D. (1996) *Genes Dev.* **10**, 2131-2144
96. Cairns, B. R., Henry, N. L., and Kornberg, R. D. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**,

Annexe 2 : Conservation des familles de remodeleurs de la chromatine de la levure à l'humain.

Tiré de Clapier et Cairns, 2009

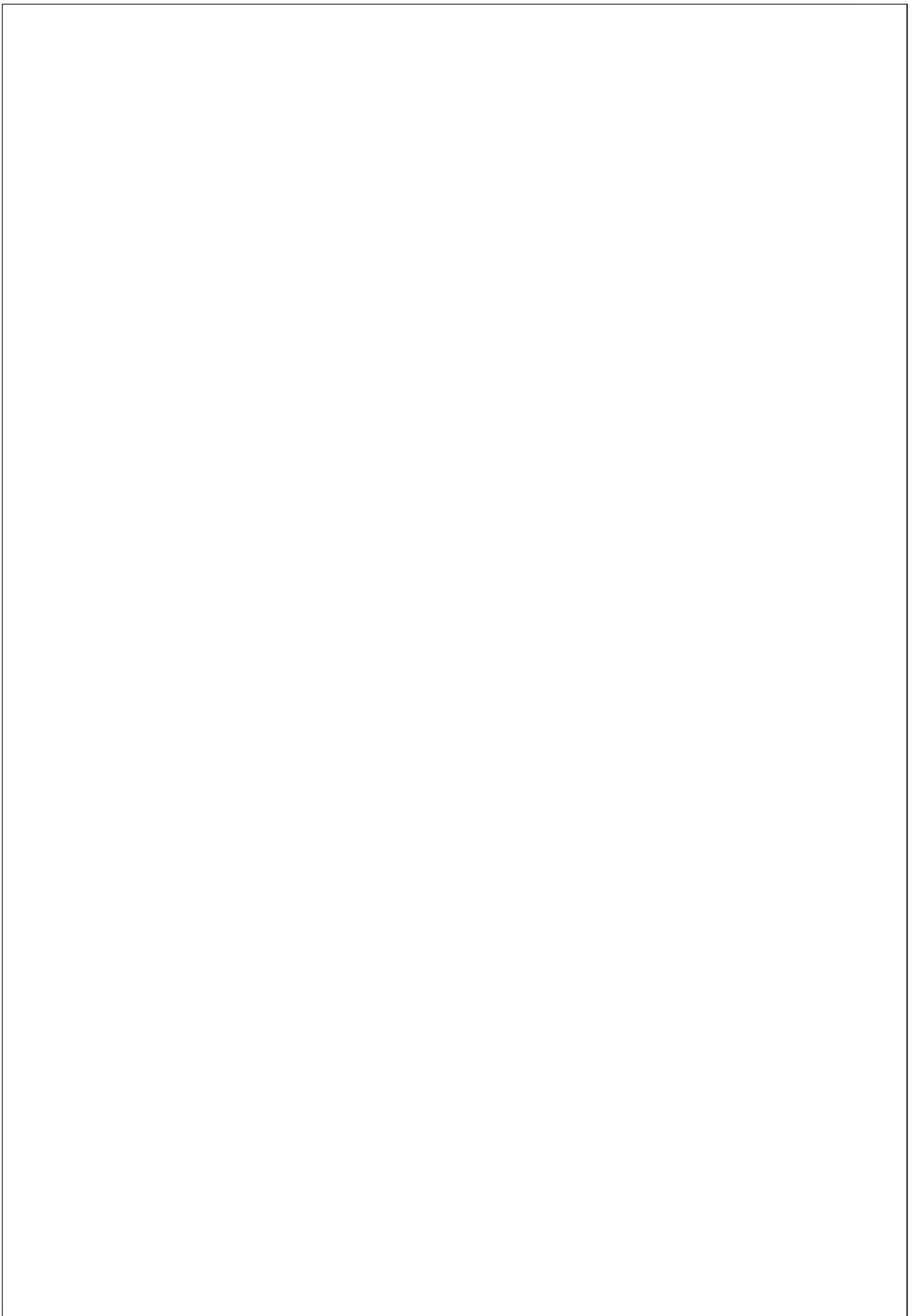
Family and composition	Organisms										
	Yeast			Fly			Human				
SWI/SNF	Complex	SWI/SNF	RSC	BAP	PBAP	BAF	PBAF				
	ATPase	Swi2/Snf2	Sth1	BRM/Brahma		hBRM or BRG1		BRG1			
	Noncatalytic homologous subunits	Swi1/Adr6		OSA/eyelid	Polybromo BAP170		BAF250/hOSA1		BAF180 BAF200		
		Swi3	Rsc8/Swh3	MOR/BAP155		BAF155, BAF170					
		Swp73	Rsc6	BAP60		BAF60a or b or c					
		Snf5	Sfh1	SNR1/BAP45		hSNF5/BAF47/INI1					
				BAP111/dalao		BAF57					
		Arp7, Arp9	BAP55 or BAP47		BAF53a or b						
		Actin		β-actin							
Unique	a	b									
ISWI	Complex	ISWIa	ISWIb	ISW2	NURF	CHRAC	ACF	NURF	CHRAC	ACF	
	ATPase	Isw1		Isw2	ISWI		SNF2L	SNF2H ^c			
	Noncatalytic homologous subunits			Ite1	NURF301	ACF1		BPTF	hACF1/WCRF180		
						CHRAC14			hCHRAC17		
					NURF55/p55			RbAp46 or 48	hCHRAC15		
Unique	loc3	loc2, loc4		NURF38							
CHD	Complex	CHD1		CHD1	Mi-2/NuRD	CHD1	NuRD				
	ATPase	Chd1		dCHD1	dMi-2	CHD1	Mi-2α/CHD3, Mi-2β/CHD4				
	Noncatalytic homologous subunits					dMBD2/3		MBD3			
						dMTA		MTA1,2,3			
						dRPD3		HDAC1,2			
						p55		RbAp46 or 48			
				p66/68		p66α,β					
Unique						DOC-1?					
INO80	Complex	INO80	SWR1	Pho-dINO80	Tip60	INO80	SRCAP	TRRAP/Tip60			
	ATPase	Ino80	Swr1	dIno80	Domino	hIno80	SRCAP	p400			
	Noncatalytic homologous subunits		Rvb1,2		Reptin, Pontin		RUVBL1,2/Tip49a,b				
			Arp5,8	Arp6	dArp5,8	BAP55	BAF53a				
			Arp4, Actin1		dActin1	Actin87E	Arp5,8	Arp6	Actin		
			Taf14	Yaf9		dGAS41		GAS41			
			les2,6				hles2,6				
				Swc4/Eaf2		dMAP1		DMAP1			
				Swc2/Vps72		dYL-1		YL-1			
				Bdf1		dBrd8		Brd8/TRC/p12C			
				H2AZ,H2B		H2Av,H2B		H2AZ,H2B			
			Swc6/Vps71				ZnF-IIT1				
				dTra1		TRRAP					
				dTip60		Tip60					
				dMRG15		MRG15					
				dEaf6		MRGX					
				dMRGBP		FLJ11730					
				E(Pc)		MRGBP					
				dING3		EPC1, EPC-like					
Unique	les1,les3-5,Nhp10	Swc3,5,7	Pho			d	ING3				

^aSwp82, Taf14, Snf6, Snf11.

^bRsc1 or Rsc2, Rsc3-5, 7, 9, 10, 30, Htt1, Ldb7, Rtt102.

^cIn addition, SNF2H associates respectively with Tip5, RSF1, and WSTF to form NoRC, RSF, and WICH remodelers.

^dAmida, NFRKB, MCRS1, UCH37, FLJ90652, FLJ20309.



Annexe 3 : Nouvelle nomenclature des enzymes de modification de la chromatine.

Par Allis et al, 2007

(1) Lysines-Déméthylases (KDM anciennement Lysine Déméthylases)

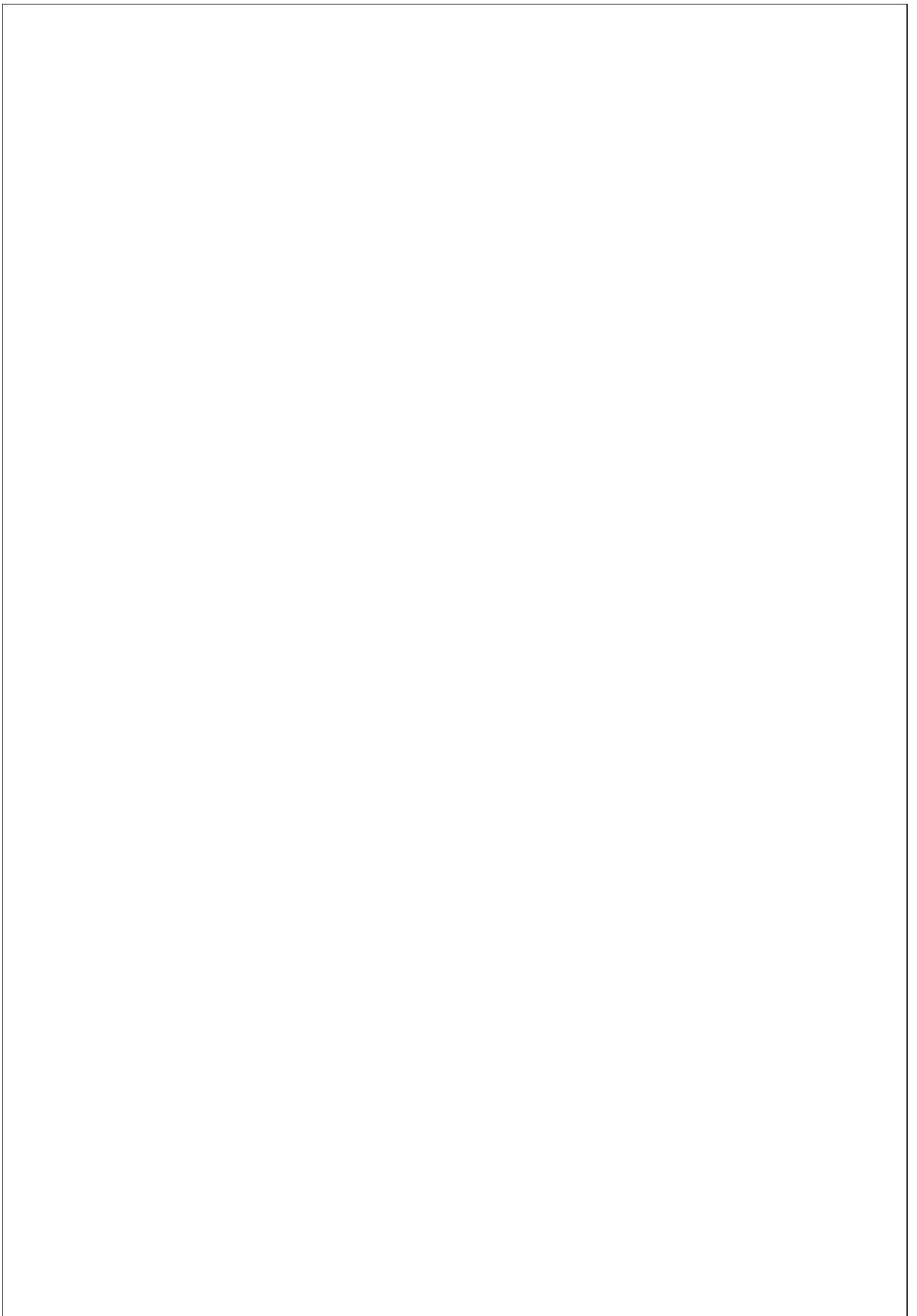
New Name	Human	<i>D. melanogaster</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	Substrate Specificity	Function
KDM1	LSD1/BHC110	Su(var)3-3		SpLsd1/Swm1/ Saf110	H3K4me1/2, H3K9me1/2	Transcription activation and repression, heterochromatin formation
KDM2			Jhd1		H3K36me1/2	Transcription elongation
KDM2A	JHDM1a/FBXL11				H3K36me1/2	
KDM2B	JHDM1b/FBXL10				H3K36me1/2	
KDM3A	JHDM2a				H3K9me1/2	Androgen receptor gene activation, spermatogenesis
KDM3B	JHDM2b				H3K9me	
KDM4			Rph1		H3K9/ K36me2/3	Transcription elongation
KDM4A	JMJD2A/JHDM3A				H3K9/ K36me2/3	Transcription repression, genome integrity
KDM4B	JMJD2B				H3K9/ H3K36me2/3	Heterochromatin formation
KDM4C	JMJD2C/GASC1				H3K9/ K36me2/3	Putative oncogene
KDM4D	JMJD2D				H3K9me2/3	
KDM5		Lid	Jhd2	Jmj2	H3K4me2/3	
KDM5A	JARID1A/RBP2				H3K4me2/3	Retinoblastoma-interacting protein
KDM5B	JARID1B/PLU-1				H3K4me1/2/3	Transcription repression
KDM5C	JARID1C/SMCX				H3K4me2/3	X-linked mental retardation
KDM5D	JARID1D/SMCY				H3K4me2/3	Male-specific antigen
KDM6A	UTX				H3K27me2/3	Transcription activation
KDM6B	JMJD3				H3K27me2/3	Transcription activation

(2) Lysines-Acétyltransférases (KATs; anciennement Acétyltransférases)

New Name	Human	<i>D. melanogaster</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	Substrate Specificity	Function
KAT1	HAT1	CG2051	Hat1	Hat1/ Hag603	H4 (5, 12)	Histone deposition, DNA repair
KAT2		dGCN5/PCAF	Gcn5	Gcn5	H3 (9, 14, 18, 23, 36)/ H2B; yHtz1 (14)	Transcription activation, DNA repair
KAT2A	hGCN5				H3 (9, 14, 18)/H2B	Transcription activation
KAT2B	PCAF				H3 (9, 14, 18)/H2B	Transcription activation
KAT3		dCBP/NEJ			H4 (5, 8); H3 (14, 18)	Transcription activation, DNA repair
KAT3A	CBP				H2A (5); H2B (12, 15)	Transcription activation
KAT3B	P300				H2A (5); H2B (12, 15)	Transcription activation
KAT4	TAF1	dTAF1	Taf1	Taf1	H3 > H4	Transcription activation
KAT5	TIP60/PLIP	dTIP60	Esa1	Mst1	H4 (5, 8, 12, 16); H2A (yeast 4, 7; chicken 5, 9, 13, 15); dH2Av/yHtz1 (14)	Transcription activation, DNA repair
KAT6		(CG1894)	Sas3	(Mst2)	H3 (14, 23)	Transcription activation and elongation, DNA replication
KAT6A	MOZ/MYST3	ENOK			H3 (14)	Transcription activation
KAT6B	MORF/MYST4				H3 (14)	Transcription activation
KAT7	HBO1/MYST2	CHM		(Mst2)	H4 (5, 8, 12) > H3	Transcription, DNA replication
KAT8	HMOF/MYST1	dMOF (CG1894)	Sas2	(Mst2)	H4 (16)	Chromatin boundaries, dosage compensation, DNA repair
KAT9	ELP3	dELP3/ CG15433	Elp3	Elp3	H3	
KAT10			Hap2		H3 (14); H4	
KAT11			Rtt109		H3 (56)	Genome stability, transcription elongation
KAT12	TFIIIC90				H3 (9, 14, 18)	Pol III transcription
KAT13A	SRC1				H3/H4	Transcription activation
KAT13B	ACTR				H3/H4	Transcription activation
KAT13C	P160				H3/H4	Transcription activation
KAT13D	CLOCK				H3/H4	Transcription activation

3 Lysines-Méthyltransférases (KMTs; anciennement Lysine Méthyltransférases)

New Name	Human	<i>D. melanogaster</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	Substrate Specificity	Function
KMT1		<i>Su(Var)3-9</i>		<i>Clr4</i>	H3K9	Heterochromatin formation/silencing
KMT1A	SUV39H1				H3K9	Heterochromatin formation/silencing
KMT1B	SUV39H2				H3K9	Heterochromatin formation/silencing
KMT1C	G9a				H3K9	Heterochromatin formation/silencing
KMT1D	EuHMTase/GLP				H3K9	Heterochromatin formation/silencing
KMT1E	ESET/SETDB1				H3K9	Transcription repression
KMT1F	CLL8					
KMT2			<i>Set1</i>	<i>Set1</i>	H3K4	Transcription activation
KMT2A	MLL1	<i>Trx</i>			H3K4	Transcription activation
KMT2B	MLL2	<i>Trx</i>			H3K4	Transcription activation
KMT2C	MLL3	<i>Trr</i>			H3K4	Transcription activation
KMT2D	MLL4	<i>Trr</i>			H3K4	Transcription activation
KMT2E	MLL5				H3K4	Transcription activation
KMT2F	hSET1A				H3K4	Transcription activation
KMT2G	hSET1B				H3K4	Transcription activation
KMT2H	ASH1	<i>Ash1</i>			H3K4	Transcription activation
KMT3			<i>Set2</i>	<i>Set2</i>	H3K36	Transcription activation
KMT3A	SET2				H3K36	Transcription activation
KMT3B	NSD1				H3K36	
KMT3C	SYMD2				H3K36 (p53)	Transcription activation
KMT4	DOT1L		<i>Dot1</i>		H3K79	Transcription activation
KMT5				<i>Set9</i>	H4K20	DNA-damage response
KMT5A	Pr-SET7/8	<i>PR-set7</i>			H4K20	Transcription repression
KMT5B	SUV4-20H1	<i>Suv4-20</i>			H4K20	DNA-damage response
KMT5C	SUV4-20H2					
KMT6	EZH2	<i>E(Z)</i>			H3K27	Polycomb silencing
KMT7	SET7/9				H3K4 (p53 and TAF10)	
KMT8	RIZ1				H3K9	Transcription repression



Annexe 4 : Tableau 1 de la revue « Readers of histone modifications »
par Yun et al, 2011

PTMs	Position	Recognition Module(s)	Protein	Related Modifications		Functions	3D	References*	
				Enhanced by	Inhibited by				
Lysine Methylation	H3	PHD	BHC80			LSD1.com	Y	[24]	
			AIRE		H3R2me	Autoimmune regulator	Y	[5, 36]	
			WDR5/WDR9			HAT	Y	[44, 53]	
		K4me	ADD	Dnm3L		K4me	DNA methylation	Y	[35]
				CHD1		ATPase	Y	[13, 41]	
				RAG2		Recombination		[28]	
			PHD	ING2			HDAC	Y	[40]
				BPTF	H3K9Ac, H3K14Ac		ATPase	Y	[47, 54]
				TAF3	H3K9Ac, H3K14Ac	H3R2me2	TFIID	Y	[47-48]
				PHF2			H3K9 demethylation		[52]
				ING4			HBO1.com, H3 acetylation		[17]
				YNG1			NuA3, histone acetylation		[43]
				PHF8	H3K9Ac, H3K14Ac		Histone demethylation	Y	[22, 47]
			Tudor	JMJD2A			Histone demethylase		[16]
				JMJD2C			Histone demethylase		[3]
				Sgf29	H3K9Ac, H3K14Ac		Histone acetylation (SAGA)		[47]
			MBT	PHF20L1			-		[21]
			ZFCW	ZCWPW1			Novel PTM reader	Y	[15]
		K9	Chromo	HP1	SU(VAR) Protein	Y41Ph, S10Ph	Heterochromatin	Y	[1, 10, 20, 23, 34]
				CDY1					[21]
				CDY, CDYL, CDYL2		S10Ph	Repressor of REST		[11, 33, 47]
		PHD	SMCX			Demethylation		[19]	
		Tudor	TDRD7			-		[3]	
			UHRF1			-	Y	[39]	
		WD40	EED			PRC2 activity	Y	[31]	

PTMs	Position	Recognition Module(s)	Protein	Related Modifications		Functions	3D	Reference(s)	
				Enhanced by	Inhibited by				
Arginine Methylation	H4	Ankyrin Repeats Chromo WD40	LRWD1			DNA replication (ORC binding)		[47]	
			G9a/GLP			Methyltransferase	Y	[7]	
			MPP8			-			[38]
			EED			PRC mediated repression	Y	[31]	
			LRWD1			DNA replication (ORC binding)		[47]	
			PC			PRC1	Y	[12]	
			CDY, CDYL, CDYL2			-		[11]	
			CBX7			PRC mediated repression		[59]	
			MPP8			-		[3]	
			Eed3			Histone deacetylation	Y	[56]	
			MSL3			Dosage compensation		[25]	
			MIRG15			Splicing		[29]	
			DNMT3A			Guide DNA methylation		[9]	
			BRPF1			Histone acetylation (MOZ1)	Y	[49]	
			NSD1,2,3			Histone methylation		[47]	
MSH-6			DNA mismatch recognition		[47]				
N-PAC			Transcription elongation		[47]				
K79		Tudor	53BP1		DSB response		[18]		
K20		Tudor	53BP1/Crb2		DNA damage repair	Y	[2]		
			PHF20		-		[21]		
		MBT	PHF20L1		-		[21]		
			L3MBTL1		Chromatin lock	Y	[43]		
			Sfinb1		Polycomb group repression	Y	[14]		
		PWWP	Pdp1		Localizes Setb, promotes K20me3		[51]		
		WD40	LRWD1		DNA replication (ORC binding)		[47]		
	H1	MBT	L3MBTL1		Chromatin lock		[43]		
		WD40	EED		Inhibits PRC2 methyltransferase		[55]		
	H3								
	R2								

PTMs	Position		Recognition Module(s)	Protein	Related Modifications		Functions	3D	References ^a
					Enhanced by	Inhibited by			
	R17	Tudor		TDRD3			Transcription activation		[58]
		R26							
	H4	Tudor		TDRD3			Transcription activation		[58]
Phosphorylation		?		PCAF or p300			H3 acetylation		[27]
		ADD		Dnmt3a					[61]
		(Gen5)		Gen5			Histone acetylation	Y	[6]
		2014-3-3		2014-3-3			Adaptor protein	Y	[30]
				Bmh1, Bmh2			Adaptor protein		[50]
		Y41					Exclude HP1 α binding		[8]
	H2A,X	S139		BRCT repeat			Damage repair		[42]
	H2B	K120/123	?	Cps35			H3K4 methylation		[26, 62]
	H2A	K119	-						
	H3	K14	Tandem PHD	DIPF3b			Remodelling (BAF.com)	Y	[60]
Acetylation			Tandem Bromo	Rsc4			Remodelling	Y	[46]
			Bromo 2	Polybromo			Remodelling (hPBAF.com)		[4]
		K56		Snf5			Gene expression		[57]
	H4	K5,8	Bromo	Brd1			Chromatin compaction	Y	[32]
		K16	Bromo	GCN5			Histone acetylation	Y	[37]

References for Table 1: 1.Nature (2001) V410,120-124; 2.Cell (2006) V127,1361-1373; 3.PLoS One (2009) V4,e6789; 4.Cell Res (2010) V20,529-538; 5.Nucleic Acids Res (2009) V37,2951-2961; 6.Mol Cell (2003) V12,461-473; 7.Nat Struct Mol Biol (2008) V15,245-250; 8.Nature (2009) V461,819-822; 9.J Biol Chem (2010) V285,26114-26120; 10.Mol Cell Biol (2007) V27,453-465; 11.J Biol Chem (2008) V283,19626-19635; 12.Genes Dev (2003) V17,1870-1881; 13.Nature (2005) V438,1181-1185; 14.EMBO J (2009) V28,1965-1977; 15.Structure (2010) V18,1127-1139; 16.Science (2006) V312,748-751; 17.Mol Cell (2009) V33,248-256; 18.Nature (2004) V432,406-411; 19.Cell (2007) V128,1077-1088; 20.Science (2002) V295,2080-2083; 21.EMBO Rep (2006) V7,397-403; 22.Mol Cell (2010) V38,165-178; 23.Nature (2001) V410,116-120; 24.Nature (2007) V448,718-722; 25.Mol Cell (2005) V20,199-211; 31.Nature (2009) V461,762-767; 32.Nature (2007) V131,1084-1096; 27.Blood (2010) V115,2028-2037; 28.Immunity (2007) V27,561-571; 29.Science (2010) V327,996-1000; 30.Mol Cell (2005) V20,199-211; 31.Nature (2009) V461,762-767; 32.Nature (2007) V131,1084-1096; 27.Blood (2010) V115,2028-2037; 726; 34.Nature (2002) V416,103-107; 35.Nature (2007) V448,714-717; 36.EMBO Rep (2008) V9,370-376; 37.EMBO J (2000) V19,6141-6149; 38.Nucleic Acids Res (2010) V38,e11; 39.Nucleic Acids Res (2010) V38,1796-1804; 40.Nature (2006) V442,96-99; 41.J Biol Chem (2005) V280,41789-41792; 42.Cell (2005) V123,1213-1226; 43.Mol Cell (2006) V24,785-796; 44.Nat Struct Mol Biol (2009) V16,678-680; 45.Cell (2007) V129,915-928; 46.Mol Cell (2007) V27,817-828; 47.Cell (2010) V142,967-980; 48.Cell (2007) V131,58-69; 49.Nat Struct Mol Biol (2010) V17,617-619; 50.Mol Cell Biol (2008) V28,2840-2849; 51.Mol Cell (2009) V33,428-437; 52.J Biol Chem (2010) V285,9322-9326; 53.Cell (2005) V121,859-872; 54.Nature (2006) V442,86-90; 55.Proc Natl Acad Sci U S A (2010) V 56,Structure (2008) V16,1740-1750; 57.Cell (2005) V121,375-385; 58.Mol Cell (2010) V40,1016-1023; 59.Mol Cell (2010) V38,662-674; 60.Nature (2010) V466,258-262; 61.Nat Struct Mol Biol (2009) V16,304-311; 62.Mol Cell Biol (2010) V30,3635-3645;

Notes: Y in the "3D" column represents that the corresponding 3-D structure has been solved.

Annexe 5 : Tableau des complexes Polycomb, Trithorax et de leurs recruteurs.

Complexes (D.m.)	Protein (D.m.)	Homologues (H.s.)	Functional domains	Described activity
PhoRC complex				
<i>PhoRC complex</i> (Tetyana Klymenko, 2006)	pleiohomeotic (Pho) (Simon et al., 1992)	YY1	Zn finger, C2H2-type/integrase, DNA-binding	chromatin DNA binding
	pleiohomeotic like (Phol) (Brown et al., 2003)	YY2	Zn finger, C2H2-type/integrase, DNA-binding	sequence-specific DNA binding
	Scm-related gene containing four mbt domains (dSfmbt)	L3MBTL2	Zn finger, Mbt repeat; SAM domain	H4K20me1 binding
PcG complexes				
<i>Polycomb repressive complex2 (PRC2)</i> (Cao et al., 2002)	Enhancer of Zest (E(Z)) (JONES and GELBART, 1990)	EZH1, EZH2	SET, SANT	HMTase H3K27me3
	Extra sex combs (ESC) (Struhl, 1981)	EED	WD40	Acetylated histones recognition
	ESC-Like (ESCL)	?	WD40 repeat	
	Suppressor of Zeste-12 (Su(Z)12) (Birve et al., 2001)	SUZ12	VEFS box, Zn finger	?
	<i>NURF55 (p55)/CAF1</i> (BULGER et al., 1995)	RBBP4/RbpAp48 RBBP7/RbAp46	WD40	?
<i>PRC2-associated factors</i>	Sex comb on midleg (SCM) (Jürgens, 1985)	SCMH1	SAM, MBT, Zn finger	?
	Polycomblike (Pcl) (Duncan, 1982)	PHF1	Tudor domain, Zinc finger, PHD-finger	
	Rpd3 (Rubertis et al., 1996)	HDAC2	HDAC	HDAC
	Sir2 (Rosenberg and Parkhurst, 2002)	SIRT1	sirtuin family	HDAC
<i>Polycomb repressive complex1 (PRC1)</i> (Saurin et al., 2001)	Polycomb (PC) (Lewis, 1978)	CBX2/HPC1/M33 CBX4/HPC2 CBX8/HPC3/PC3	Chromodomain	H3K27me3 binding
	Polyhomeotic (PHP/PHD) (Dura et al., 1985)	PHC1/EDR1/HPH1 PHC2/EDR2/HPH2 PHC3/EDR3/HPH3	Zn finger, SAM	?
	Posterior sex combs (PSC) (Jürgens, 1985)	BMI1 PCGF2/RNF110/ZFP144 ZNF134	RING <i>finger</i>	dRing co-activator
	Sex comb extra (Sce)/dRing (BREEN and DUNCAN, 1986)	RING1/RING1A/RNF1 RNF2/RING1B/RING2	RING <i>finger</i>	E3 Ubiquitin ligase H2AK119
	Zeste (Z) (M P Shamon, 1972)			
	TBP-associated factor (TAFs)	TBP-associated factor (TAFs)		TFIID components

Complexes (<i>D.m.</i>)	Protein (<i>D.m.</i>)	Homologues (<i>H.s.</i>)	Functional domains	Described activity
Trithorax Complexes				
<i>SWI/SNF</i> – <i>Brahma</i> – <i>BRG1</i> <i>complex</i> (Arnoud J Kal, 2000; Daniel R Marenda, 2003)	brahma (brm) (Kennison and Tamkun, 1988)	SMARCA2/BRM SMARCA4/BRG1	domain, DEAD-like helicase; Glutamine-Leucine-Glutamine, QLQ; HAS subgroup, SANT, SNF2-related	ATP-dependent chromatin remodeling complex
	Osa (Vazquez et al., 1999)	ARID1A/BAF250	ARID/BRIGHT DNA-binding domain	
	moira (mor) (Kennison and Tamkun, 1988)	SMARCC2 /BAF170	Homeodomain-like, Myb, SANT, SWIRM	
	Zeste (<i>Z</i>) (M P Shannon, 1972)			
	Snf5-related 1 (Snr1) (DINGWALL et al., 1995)	SMARCB1/hSNF5/BAF4 7	SNF5/SMARCB1/INI1,	
Nucleosome remodeling factor (<i>NURF</i>) <i>complex</i> (Tsukiyama and Wu, 1995)	Gaga factor / Trithorax-like (Trl) (Farkas et al., 1994)	Zbtb3	Zn finger, BTB/POZ	DNA binding activity
	Imitation SWI (Iswi) (ELFRING et al., 1994)	SMARCA1/SNF2L/ISWI	ATPase, HAND domain; DEAD- like helicase, Homeodomain-like; SANT domain, SLIDE; SNF2- related	Chromatin remodeling
	Nucleosome remodeling factor - 38kD (Nurf-38) (Tsukiyama and Wu, 1995)	?	Inorganic pyrophosphatase	inorganic diphosphatase activity
	Nurf-55/ Chromatin assembly factor 1 subunit (Caf1) (BULGER et al., 1995)	RBBP4/RbpAp48 RBBP7/RbAp46	Histone-binding protein RBBP4, WD40 repeat	
	Enhancer of bithorax E(bx)/Nurf-301 (Bhosekar and Babu, 1987)	BPTF	AT hook, DNA-binding motif, Bromodomain, DDT domain, Zinc finger, PHD-finger	H3K4me3 binding
<i>TAC1 complex</i> (Petruk et al., 2001)	Trithorax (Trx) (Ingham and Whittle, 1980)	* Human homologs exist (see below for Trx homologs MLL1-3), but the homolog complex has not been found. Instead, MLL complexes have been isolated, which are not known in flies.	SET, FY-rich, Zinc finger, PHD- finger,	HMTase H3K4me3
	nejire (nej/dCBP) (Hou et al., 1997)		Bromodomain, Coactivator CBP, KIX, HAT, Zinc finger, PHD-type	H3-K27 and H3-K18 specific HAT
	SET domain binding factor (Sbf1) (Zev Bryant, 1999)		PHD, DENN, GRAM, dDENN	Chromatin binding
<i>Ash1 complex</i> (Papoulas et al., 1998; Frédéric Bantignies, 2000)	absent, small, or homeotic discs 1 (Ash1) (Shearn, 1989)	* Homologs exist in human, but it is unknown whether they form a complex	SET, AT hook, Bromo adjacent homology (BAH) domain, Zinc finger, PHD-finger	HMTase H3K4, -K36me3
	nejire (nej/dCBP) (Hou et al., 1997)		Bromodomain, Coactivator CBP, KIX, HAT, Zinc finger, PHD-type,	H3-K27 and H3-K18 specific HAT
<i>Ash2 complex</i> (Papoulas et al., 1998)	absent, small, or homeotic discs 2 (Ash2) (Shearn, 1989)	ASH2L	PHD-finger, SPRY domain, Zinc finger, PHD-type, RING finger	Required for H3K4me3
MLL COMPASS	* Fly homologs of the MLL subunits exist, but no MLL complexes have been isolated in flies	MLL/ALL-1/HRX/TRX1 MLL2 MLL3 WDR5 ASH2L RBBP5/SWD1 C10orf9/CFP1	(complex of proteins associated with Set1)-like complexes For review see (Edwin Smith, 2011)	

PcG/trxG recruiters				
	Dorsal switch protein 1 (Dsp1) (Déjardin et al., 2005)	HMGB2	HMG box A	DNA binding activity
	grainy head (Grh)	GRHL1, 2, 3	CP2 transcription factor	DNA binding activity
<i>FACT</i> (Facilitates Chromatin Transcription) <i>complex</i> (Tsukasa Shimojima, 2003)	Gaga factor / Trithorax-like (Trl) (Farkas et al., 1994)	Zbtb3	Zn finger, BTB/POZ	RNA polymerase II elongation
	dre4 (Saurin et al., 2001)	SPT16		
	Structure specific recognition protein (Ssrp) (S L Bruhn, 1993)	SSRP1	HMG1/HMG2	
	lola like (Lolal)/Batman (M Faucheux, 2003)	?	BTB/POZ	DNA binding activity
	pipsqueak (Psq) (Siegel et al., 1993)	?	BTB/POZ	DNA binding activity
	Zeste (Z) (Gans, 1948)	?	ATPase, Homeodomain-like	DNA binding activity
	?	E2F transcription factor 6 (E2F6)	DNA binding domain, dimerization domain	inhibitor of E2F-dependent transcription
	?	B-cell lymphoma 6 protein (BCL6)	Zn finger, BTB/POZ	sequence-specific repressor of transcription
	Retinoblastoma-family protein (Rbf) (Du et al., 1996)	RB1 RBL1	Cyclin-like; Domain, A-box; Retinoblastoma-associated protein, B-box	
	?	Promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) zinc finger and BTB domain containing 16	Zn finger, BTB/POZ	
	Cramped (CRM) (Yamamoto et al., 1997)	CRAMP1L	SANT	DNA binding
	Enhancer of Polycomb (E(Pc)) (Takashi Sato, 1983)	EPC1		
	Multi sex combs (MXC) (Santamaría and Randsholt, 1995)	NPAT		DNA binding activity
	Corto (Kodjabachian et al., 1998)		Chromodomain	RNA binding activity Bind RpL12K3me3

Complexes (<i>D.m.</i>)	Protein (<i>D.m.</i>)	Homologues (<i>H.s.</i>)	Functional domains	Described activity
PcG/trxG related proteins				
	little imaginal discs (Lid) (Gildea et al., 2000)	JARID1C/XLMR/SMCX JARID1B/PLU-1	Lysine-specific demethylase-like domain (jumonji family), ARID/BRIGHT DNA-binding domain, Zinc finger, PHD-finger	H3K4 demethylase, H3-K9 specific HAT
	dUTX (Edwin R Smith, 2008)	UTX JMJD3	Lysine-specific demethylase-like domain (jumonji family), Tetratricopeptide TPR-1	H3K27 demethylases
Polycomb repressive deubiquitinase (<i>PR-DUB</i>) complex (Scheuermann et al., 2010)	Additional sex combs (<i>Asx</i>) (Jürgens, 1985)	ASXL1 ASXL2	Zinc finger, PHD-finger	H2AK119Ub deubiquitylation
	Calypso (Andrés Gaytán de Ayala Alonso, 2007)	BAP1	Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase, Peptidase C12	
<i>TIP60</i> complex (Kusch T, 2004)	Tip60 (Brody et al., 2002)	KAT5	HAT, Chromoshadow, MOZ/SAS-like protein	HAT complex
	Domino (Dom) (Ruhf et al., 2001)	EP400/P400	DEAD-like helicase, MYB-like, SNF2-related, DNA binding	
	dMRG15 (Bertram and Pereira-Smith, 2001)	MRG15	Chromoshadow	
	Reptin (Rept) (Carrera et al., 1998)	RuvB-like 2	ATPase, OB-fold-like; TIP49	
	Pontin (Pont) (Andreas Bauer, 2000)	RuvB-like 1	ATPase, OB-fold-like; TIP49,	
	Enhancer of Polycomb (<i>E(Pc)</i>) (Sato et al., 1984)	EPC1		
<i>NURD</i> complex (Chris M Murawsky, 2001)	Mi-2 (Kehle et al., 1998)	CHD4/Mi-2	ATPase, chromodomain, chromoshadow, DEAD-like helicase, Zinc finger, PHD-finger, HMG box-like	HDAC complex
	Tramtrack (<i>ttk</i>) (S D Harrison, 1990)	Ttk69	AT hook, BTB/POZ, Zinc finger, C2H2-type/integrase	
	Rpd3 (Sinclair, 1983)	HDAC2	HDAC	

	kismet (<i>kis</i>) (Daubresse et al., 1999)	CHD7	BRK domain, Chromodomain, chromoshadow, DEAD-like helicase	ATP-dependent helicase activity
	Devenir/Breathless (<i>Dev/Btl</i>) (Maixner et al., 1998)	FGFR1 FGFR2	Immunoglobulin I-set, ATP binding site, fibroblast growth factor receptor-related	Serine-threonine/tyrosine-protein kinase
	Suppressor of Zeste 2 (<i>Su(Z)2</i>) (Adler et al., 1989)		Zinc finger	
	tonalli (<i>tna</i>) (Gutierrez et al., 2003)	ZMIZ2	Zinc finger, MIZ-type	chromatin-mediated maintenance of transcription
	Taranis (<i>tara</i>) (Stéphane Calgaro, 2002)	SERTAD2	SERTA	
	modifier of <i>mdg4</i> (<i>mod(mdg4)</i>) (Georgiev and Gerasimova, 1989)		BTB/POZ domain, Zinc finger	
Mediator complex (Janody et al., 2003)	kohtalo (<i>kto</i>) (Treisman, 2001)	MED12L/TRAP230/TRALP	LCEWAV-domain	RNA polymerase II transcription cofactor activity
	skuld (<i>skd</i>) (Kennison and Tamkun, 1988)	THRAP2/TRAP240/MED13		
	super sex combs (<i>Sxc</i>) (Ingham, 1984)		Tetratricopeptide TPR-1	Acetylglucosaminyltransferase activity
dRing-associated factors (dRAF) complex (Lagarou et al., 2008)	Sex comb extra (<i>Sce</i>)/dRing (BREEN and DUNCAN, 1986)	RING1/RING1A/RNF1 RNF2/RING1B/RING2	RING finger	E3 Ubiquitin ligase H2AK119
	Posterior sex combs (<i>PSC</i>) (Jürgens, 1985)	BMI1 PCGF2/RNF110 ZFP144 ZNF134	RING <i>finger</i>	dRing co-activator
	Lysine (K)-specific demethylase 2 (<i>KDM2</i>) (Das et al., 2002)	KDM2	F-box, jumonji/aspartyl beta-hydroxylase	H3K36me2 déméthylation, H2A ubiquitylation

Annexe 6 : Figures et tables supplémentaires de l'Article.

Supp-fig 1 : Corto overlaps with transcriptional factories

Supp-table3 : Gènes up régulés dans la condition sd ::Gal4>FH-CortoCD

Supp-table 4 : Gènes up régulés dans la condition sd ::Gal4>RpL12-Myc

Supp-table5 : Gènes down régulés dans la condition sd ::Gal4>FH-CortoCD

Supp-table6 : Gènes down régulés dans la condition sd ::Gal4>RpL12-Myc

Supp-table7 :gènes dérégulés communs à sd ::Gal4>FH-CortoCD et sd ::Gal4>RpL12Myc

Supp-table 8 : Gene Ontology des gènes up régulés par sd ::Gal4>FH-CortoCD et sd ::Gal4>RpL12Myc

Supp-table 9 : Gene Ontology des gènes down régulés par sd ::Gal4>FH-CortoCD et sd ::Gal4>RpL12Myc

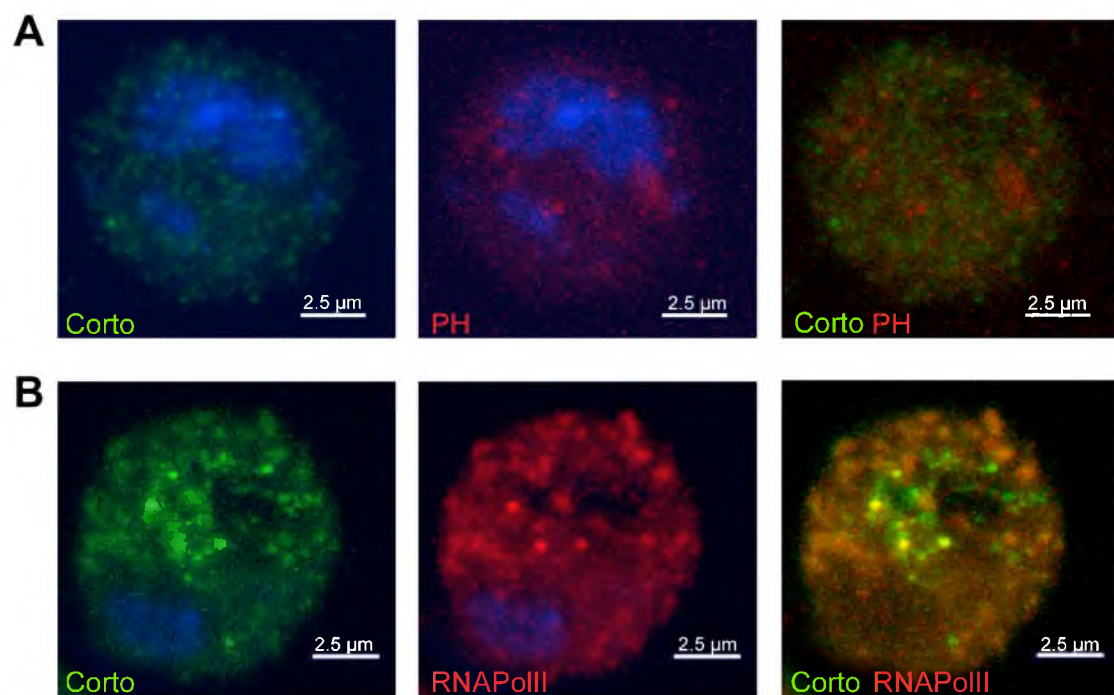
Supplementary Figure 1: Corto overlaps with transcriptional factories.

(A) Immunostaining of S2 cells with anti-Corto (green) and anti-PH (red) antibodies showing that Corto bodies and Polycomb bodies did not overlap.

Blue: DAPI. Close-up of a nucleus.

(B) Immunostaining of S2 cells with anti-Corto (green) and anti-RNAPoIII (red) antibodies showing that Corto bodies and transcriptional factories overlapped.

Blue: DAPI. Close-up of a nucleus.



CR41539	FBgn0085796	FBtr0114250	1168	179	2,65979E-141	2,70601
spen	FBgn0016977	FBtr0078122	412	63	2,80057E-50	2,70922
spen	FBgn0016977	FBtr0078121,FBtr0306341	412	63	2,80057E-50	2,70922
CR40642	FBgn0085761	FBtr0114211	1042	159	1,51184E-126	2,71226
Lcp2	FBgn0002533	FBtr0088761	375	57	5,66580E-46	2,71786
CR41613	FBgn0085822	FBtr0114280	978	143	3,91405E-122	2,77382
Rpl31	FBgn0025286	FBtr0088527	63967	9249	0	2,78996
Rpl31	FBgn0025286	FBtr0088526,FBtr0088525	63967	9247	0	2,79027
CR34335	FBgn0085364	FBtr0307366	116759	16764	0	2,80010
CG5021	FBgn0035944	FBtr0301140	295	42	8,52333E-38	2,81225
CG5021	FBgn0035944	FBtr0076513,FBtr0301139	295	42	8,52333E-38	2,81225
CG5021	FBgn0035944	FBtr0076514	295	42	8,52333E-38	2,81225
CR40766	FBgn0085773	FBtr0114223	606	86	2,54423E-77	2,81691
shot	FBgn0013733	FBtr0301964,FBtr0087621,FBtr0087617, FBtr0087618,FBtr0087619,FBtr0087620, FBtr0087616,FBtr0273222,FBtr0273223, FBtr0273224,FBtr0273225,FBtr0273226, FBtr0301591,FBtr0301592,FBtr0301593, FBtr0304847,FBtr0304848,FBtr0304849, FBtr0304850,FBtr0304852,FBtr0304853	3232	451	0	2,84123
Msp-300	FBgn0261836	FBtr0303383,FBtr0303385,FBtr0303388, FBtr0303389	1405	196	2,23395E-180	2,84164
CG7580	FBgn0036728	FBtr0075222,FBtr0302510	4472	604	0	2,88830
shot	FBgn0013733	FBtr0087621	2299	309	7,42956E-302	2,89533
RpS19a	FBgn0010412	FBtr0074313	5770	770	0	2,90564
l(2)efl	FBgn0011296	FBtr0072101	136	18	1,16224E-18	2,91754
l(2)efl	FBgn0011296	FBtr0072100	136	18	1,16224E-18	2,91754
CG7580	FBgn0036728	FBtr0302509	5172	678	0	2,93137
pie	FBgn0005626	FBtr0076956,FBtr0076957	313	41	4,67102E-42	2,93247
Msp-300	FBgn0261836	FBtr0303384	10170	1318	0	2,94790
Msp-300	FBgn0261836	FBtr0303387	10155	1307	0	2,95786
CR41535	FBgn0085795	FBtr0114249	1735	220	8,22182E-236	2,97936
CR40668	FBgn0085764	FBtr0114214	1511	189	5,45978E-207	2,99055
shot	FBgn0013733	FBtr0087617,FBtr0087618,FBtr0087619, FBtr0087616,FBtr0273222,FBtr0273223, FBtr0273224,FBtr0273225,FBtr0273226, FBtr0301591,FBtr0301592,FBtr0304849, FBtr0304850	226	27	3,11258E-32	3,06529
Lcp4	FBgn0002535	FBtr0088744	486	58	1,12664E-68	3,06683
zyc	FBgn0036985	FBtr0078191	147	17	1,72053E-21	3,11221
Lcp3	FBgn0002534	FBtr0088743	183	21	1,24018E-26	3,12338
CG42500	FBgn0260226	FBtr0300627	282	32	3,83167E-41	3,13955
Msp-300	FBgn0261836	FBtr0303383,FBtr0303384,FBtr0303385, FBtr0303386,FBtr0303387,FBtr0303388, FBtr0303389	704	76	3,04342E-104	3,21150
CG7580	FBgn0036728	FBtr0075222	700	74	7,99058E-105	3,24176
CG7580	FBgn0036728	FBtr0302510	700	74	7,99058E-105	3,24176
RpS19a	FBgn0010412	FBtr0074312,FBtr0074311	5476	576	0	3,24898
CR41609	FBgn0085819	FBtr0114277	651	66	2,20914E-99	3,30212
CG34227	FBgn0085256	FBtr0112420	158	16	1,26353E-24	3,30378
Lin29	FBgn0262636	FBtr0307043,FBtr0307044,FBtr0307045, FBtr0307046,FBtr0089129,FBtr0089128	230	23	1,44564E-35	3,32193
CG6793	FBgn0036242	FBtr0076051	172	17	4,96306E-27	3,33880
CR40546	FBgn0085742	FBtr0114192	1356	133	8,49863E-210	3,34986
dp	FBgn0053196	FBtr0290006,FBtr0305136,FBtr0305138, FBtr0305139,FBtr0305140,FBtr0305141, FBtr0305142,FBtr0305143,FBtr0305144, FBtr0305146	594	56	1,17436E-93	3,40696
Msp-300	FBgn0261836	FBtr0303383,FBtr0303385	152	14	1,69611E-24	3,44057
shot	FBgn0013733	FBtr0087617,FBtr0087616,FBtr0273222, FBtr0273223,FBtr0273224,FBtr0301591, FBtr0304849,FBtr0304850	243	21	5,13686E-40	3,53250
CR40596	FBgn0085753	FBtr0114203	1657	137	4,78875E-275	3,59633
Lcp1	FBgn0002531	FBtr0088763	789	63	4,96932E-133	3,64660
CG11854	FBgn0039299	FBtr0084811	113	9	1,40418E-19	3,65025
shot	FBgn0013733	FBtr0087618,FBtr0087619,FBtr0273225, FBtr0273226,FBtr0301592	362	28	8,52855E-62	3,69249
RpS4	FBgn0011284	FBtr0075884	1107	82	1,67400E-191	3,75489
CR40963	FBgn0085779	FBtr0114230	112	8	4,26876E-20	3,80735
GstS1	FBgn0010226	FBtr0087006	100	7	3,82447E-18	3,83650
7SLRNA:CR42652	FBgn0261504	FBtr0302398	689	44	3,01389E-125	3,96893
CG17374	FBgn0040001	FBtr0305959	216	13	3,81913E-40	4,05445
RpS4	FBgn0011284	FBtr0075885	1058	62	4,68864E-197	4,09293
dp	FBgn0053196	FBtr0290006,FBtr0305136,FBtr0305137, FBtr0305138,FBtr0305139,FBtr0305140, FBtr0305144,FBtr0305146	446	26	1,70905E-83	4,10046
dp	FBgn0053196	FBtr0290006,FBtr0305136,FBtr0305137, FBtr0305139,FBtr0305140,FBtr0305141, FBtr0305142,FBtr0305143,FBtr0305144, FBtr0305146	457	25	7,59119E-87	4,19219
dp	FBgn0053196	FBtr0290006,FBtr0305136,FBtr0305137, FBtr0305138,FBtr0305139,FBtr0305140, FBtr0305143,FBtr0305146	397	21	3,73179E-76	4,24068
7SLRNA:CR32864	FBgn0000003	FBtr0081624	1163	57	2,25588E-227	4,35075
dp	FBgn0053196	FBtr0290006,FBtr0305136,FBtr0305137, FBtr0305138,FBtr0305139,FBtr0305140, FBtr0305141,FBtr0305142,FBtr0305143, FBtr0305144	3523	157	0	4,48797
Or2a	FBgn0023523	FBtr0070397	961	31	5,00750E-205	4,95420
dp	FBgn0053196	FBtr0290006,FBtr0305137,FBtr0305138, FBtr0305139,FBtr0305140,FBtr0305141, FBtr0305142,FBtr0305143,FBtr0305144	121	3	3,55179E-27	5,33390
Cyp4g1	FBgn0010019	FBtr0070099	204	5	1,64451E-45	5,35050
RNaseMRP:RNA	FBgn0065098	FBtr0091662	641	11	3,72336E-149	5,86475
Obp56d	FBgn0034470	FBtr0086477	1032	16	2,51983E-242	6,01123
CG8664	FBgn0030836	FBtr0074445	133	2	1,57588E-31	6,05528
CG14302	FBgn0038647	FBtr0083673	84	1	2,82643E-20	6,39232
CG30025	FBgn0050025	FBtr0088158	109	1	9,98671E-27	6,76818

Jon65Aiv	FBgn0250815	FBtr0077040	704	5	7,35623E-175	7,13750
yip7	FBgn0040060	FBtr0077038	282	2	6,30492E-70	7,13955
CG30031	FBgn0050031	FBtr0088123	243	1	2,03050E-61	7,92481
Jon65Aiii	FBgn0035665	FBtr0077041	585	2	2,34171E-149	8,19229
CG33333	FBgn0053333	FBtr0083441	119	0	5,38256E-31	Infinity
gammaTry	FBgn0010359	FBtr0088159	123	0	4,24171E-32	Infinity
Jon25Bi	FBgn0020906	FBtr0100432	201	0	1,27844E-52	Infinity
Jon25Bi	FBgn0020906	FBtr0079054	201	0	1,27844E-52	Infinity
deltaTry	FBgn0010358	FBtr0088124	255	0	7,45484E-67	Infinity
CG42834	FBgn0262023	FBtr0303853	278	0	6,67100E-73	Infinity
CG14332	FBgn0038509	FBtr0083446	394	0	1,97948E-103	Infinity

CG7580	FBgn0036728	Fbtr0302509	3937	678		0	2,53774
CR41539	FBgn0085796	Fbtr0114250	1050	179		1,43038E-111	2,55236
Doa	FBgn0256220	Fbtr0299743	659	111		5,85723E-71	2,56972
CR41613	FBgn0085822	Fbtr0114280	865	143		4,27492E-94	2,59668
shot	FBgn0013733	Fbtr0087617,Fbtr0087619,Fbtr0087616, Fbtr0273222,Fbtr0273223,Fbtr0273224, Fbtr0273225,Fbtr0273226,Fbtr0301591, Fbtr0301592,Fbtr0301593,Fbtr0304847, Fbtr0304848,Fbtr0304849,Fbtr0304850, Fbtr0304851,Fbtr0304852,Fbtr0304853	301	49		1,33127E-33	2,61891
Msp-300	FBgn0261836	Fbtr0303383,Fbtr0303385,Fbtr0303388, Fbtr0303389	1211	196		9,03802E-134	2,62727
CG5021	FBgn0035944	Fbtr0301140	266	42		1,89011E-30	2,66297
CG5021	FBgn0035944	Fbtr0076514	266	42		1,89011E-30	2,66297
CG5021	FBgn0035944	Fbtr0076513,Fbtr0301139	266	42		1,89011E-30	2,66297
dp	FBgn0053196	Fbtr0290006,Fbtr0305136,Fbtr0305137, Fbtr0305138,Fbtr0305139,Fbtr0305140, Fbtr0305141,Fbtr0305143,Fbtr0305144, Fbtr0305145,Fbtr0305146	1069	165		3,63714E-122	2,69572
CR40766	FBgn0085773	Fbtr0114223	576	86		9,73860E-68	2,74366
LBR	FBgn0034657	Fbtr0071712	255	38		2,93383E-30	2,74643
RpS19a	FBgn0010412	Fbtr0074313	5172	770		0	2,74779
Msp-300	FBgn0261836	Fbtr0303384	8863	1318		0	2,74944
CR40668	FBgn0085764	Fbtr0114214	1273	189		1,84661E-149	2,75177
Msp-300	FBgn0261836	Fbtr0303387	8847	1307		0	2,75893
CR41535	FBgn0085795	Fbtr0114249	1557	220		1,13033E-188	2,82319
shot	FBgn0013733	Fbtr0087621	2321	309		6,23090E-292	2,90907
shot	FBgn0013733	Fbtr0301964,Fbtr0087621,Fbtr0087617, Fbtr0087618,Fbtr0087619,Fbtr0087620, Fbtr0087616,Fbtr0273222,Fbtr0273223, Fbtr0273224,Fbtr0273225,Fbtr0273226, Fbtr0301591,Fbtr0301592,Fbtr0301593, Fbtr0304847,Fbtr0304848,Fbtr0304849, Fbtr0304850,Fbtr0304852,Fbtr0304853	3476	451		0	2,94623
shot	FBgn0013733	Fbtr0087617,Fbtr0087618,Fbtr0087619, Fbtr0087616,Fbtr0273222,Fbtr0273223, Fbtr0273224,Fbtr0273225,Fbtr0273226, Fbtr0301591,Fbtr0301592,Fbtr0304849, Fbtr0304850	218	27		4,71026E-29	3,01330
CG7580	FBgn0036728	Fbtr0075222	601	74		2,13652E-79	3,02177
CG7580	FBgn0036728	Fbtr0302510	601	74		2,13652E-79	3,02177
RpS19a	FBgn0010412	Fbtr0074312,Fbtr0074311	4923	576		0	3,09540
dp	FBgn0053196	Fbtr0290006,Fbtr0305136,Fbtr0305138, Fbtr0305139,Fbtr0305140,Fbtr0305141, Fbtr0305142,Fbtr0305143,Fbtr0305144, Fbtr0305146	481	56		8,38778E-66	3,10254
CG6793	FBgn0036242	Fbtr0076051	153	17		7,82312E-22	3,16992
7SLRNA:CR42652	FBgn0261504	Fbtr0302398	397	44		9,97671E-56	3,17356
CG34227	FBgn0085256	Fbtr0112420	151	16		5,97235E-22	3,23840
Lcp4	FBgn0002535	Fbtr0088744	549	58		7,46502E-79	3,24268
Lcp2	FBgn0002533	Fbtr0088761	541	57		1,28545E-77	3,24859
CG42500	FBgn0260226	Fbtr0300627	304	32		7,16354E-44	3,24793
CR41609	FBgn0085819	Fbtr0114277	639	66		1,10696E-92	3,27528
CR40546	FBgn0085742	Fbtr0114192	1289	133		2,05515E-186	3,27675
CR40596	FBgn0085753	Fbtr0114203	1377	137		1,52824E-202	3,32928
Msp-300	FBgn0261836	Fbtr0303383,Fbtr0303384,Fbtr0303385, Fbtr0303386,Fbtr0303387,Fbtr0303388, Fbtr0303389	770	76		5,32955E-114	3,34079
CG32249	FBgn0052249	Fbtr0303003	124	12		5,98986E-19	3,36923
7SLRNA:CR32864	FBgn0000003	Fbtr0081624	504	57		3,69132E-89	3,38143
CG31676	FBgn0051676	Fbtr0081424	168	16		1,26871E-25	3,39232
Msp-300	FBgn0261836	Fbtr0303383,Fbtr0303385	148	14		9,40593E-23	3,40210
shot	FBgn0013733	Fbtr0087617,Fbtr0087616,Fbtr0273222, Fbtr0273223,Fbtr0273224,Fbtr0301591, Fbtr0304849,Fbtr0304850	245	21		6,66763E-39	3,54432
zye	FBgn0036985	Fbtr0078191	199	17		9,68261E-32	3,54916
RpS4	FBgn0011284	Fbtr0075884	970	82		2,32340E-153	3,56429
shot	FBgn0013733	Fbtr0087618,Fbtr0087619,Fbtr0273225, Fbtr0273226,Fbtr0301592	363	28		1,30971E-59	3,69647
CG11854	FBgn0039299	Fbtr0084811	124	9		3,20425E-21	3,78427
Sgs3	FBgn0003373	Fbtr0076096	131	9		1,29458E-22	3,86350
RpS4	FBgn0011284	Fbtr0075885	911	62		5,90811E-156	3,87711
dp	FBgn0053196	Fbtr0290006,Fbtr0305136,Fbtr0305137, Fbtr0305139,Fbtr0305140,Fbtr0305141, Fbtr0305142,Fbtr0305143,Fbtr0305144, Fbtr0305146	407	25		2,48580E-72	4,02503
dp	FBgn0053196	Fbtr0290006,Fbtr0305136,Fbtr0305137, Fbtr0305138,Fbtr0305139,Fbtr0305140, Fbtr0305143,Fbtr0305146	345	21		1,46952E-61	4,03814
Obp56d	FBgn0034470	Fbtr0086477	284	16		7,19216E-52	4,14975
fzo	FBgn0011596	Fbtr0084399	125	7		5,78661E-23	4,15843
dp	FBgn0053196	Fbtr0290006,Fbtr0305136,Fbtr0305137, Fbtr0305138,Fbtr0305139,Fbtr0305140, Fbtr0305141,Fbtr0305142,Fbtr0305143, Fbtr0305144	2921	157	0		4,21763
Lcp1	FBgn0002531	Fbtr0088763	1190	63		8,83966E-220	4,23947
dp	FBgn0053196	Fbtr0290006,Fbtr0305136,Fbtr0305137, Fbtr0305138,Fbtr0305139,Fbtr0305140, Fbtr0305144,Fbtr0305146	495	26		7,91398E-92	4,25084
CG13323	FBgn0033788	Fbtr0087797	1012	53		1,71492E-187	4,25507
Lcp3	FBgn0002534	Fbtr0088743	401	21		1,85618E-74	4,25514
RNaseMRP:RNA	FBgn0065098	Fbtr0091662	505	11		1,10730E-110	5,20771
Jon25Bii	FBgn0031654	Fbtr0079055	384	6		2,09111E-87	6
CG8997	FBgn0028920	Fbtr0080563	464	6		1,76286E-107	6,27302
CG7953	FBgn0028533	Fbtr0080550	559	4		1,12901E-134	7,12870
CG14302	FBgn0038647	Fbtr0083673	199	1		1,07591E-48	7,63662
CG12115	FBgn0030097	Fbtr0071341	203	1		9,78933E-50	7,66534
CG33346	FBgn0053346	Fbtr0302527	432	2		4,93881E-106	7,75489
CG13324	FBgn0033789	Fbtr0087796	233	1		2,81714E-57	7,86419
CG8664	FBgn0030836	Fbtr0074445	591	2		2,43871E-146	8,20701
yip7	FBgn0040060	Fbtr0077038	1014	2		1,82092E-254	8,98584
CG30025	FBgn0050025	Fbtr0088158	919	1		1,66024E-232	9,84392
CG10912	FBgn0034296	Fbtr0086807	2431	0		0	Infinity

<i>Jon25Bi</i>	FBgn0020906	FTr0079054	627	0	4,81400E-160	Infinity
<i>CG42834</i>	FBgn0262023	FTr0303853	99	0	3,91641E-25	Infinity
<i>Jon25Bi</i>	FBgn0020906	FTr0100432	627	0	4,81400E-160	Infinity
<i>betaTry</i>	FBgn0010357	FTr0088122	77	0	1,61178E-19	Infinity
<i>gammaTry</i>	FBgn0010359	FTr0088159	853	0	2,70298E-218	Infinity
<i>Phae1</i>	FBgn0263234	FTr0080334	106	0	1,11263E-26	Infinity
<i>CG31789</i>	FBgn0051789	FTr0081071	523	0	1,28207E-133	Infinity
<i>fu12</i>	FBgn0026718	FTr0079703, FTr0079704, FTr0302160	131	0	3,39076E-33	Infinity
<i>Mur29B</i>	FBgn0051901	FTr0079607	245	0	2,68673E-62	Infinity
<i>dro2</i>	FBgn0052279	FTr0073059	348	0	9,41430E-89	Infinity
<i>CG32302</i>	FBgn0052302	FTr0072881	875	0	5,91697E-224	Infinity
<i>CG33333</i>	FBgn0053333	FTr0083441	251	0	6,34766E-64	Infinity
<i>alphaTry</i>	FBgn0003863	FTr0088161	398	0	1,96420E-101	Infinity
<i>CG8661</i>	FBgn0030837	FTr0074444	106	0	1,11263E-26	Infinity
<i>CG15044</i>	FBgn0030928	FTr0074627	144	0	2,37484E-36	Infinity
<i>CG14332</i>	FBgn0038509	FTr0083446	142	0	4,11540E-36	Infinity
<i>CG15818</i>	FBgn0031910	FTr0079442	593	0	1,84237E-151	Infinity
<i>CG6933</i>	FBgn0036952	FTr0074853, FTr0074854, FTr0074855	266	0	1,06148E-67	Infinity
<i>deltaTry</i>	FBgn0010358	FTr0088124	1855	0	0	Infinity
<i>CG7465</i>	FBgn0035551	FTr0073306	1184	0	2,83852E-303	Infinity

Supplementary Table 5: Genes down-regulated in *sd::Gal4>UAS::FH-cortoCD* vs *sd::Gal4/+*. FC: Fold Change.

Flybase Gene Symbol	Flybase ID Genes	Flybase ID Transcripts	Number of reads		Adjusted P-value	log ₂ (FC)
			<i>sd::Gal4>UAS::FH-cortoCD</i>	<i>sd::Gal4/+</i>		
CaMKI	FBgn0016126	F Btr0089069, F Btr0089066, F Btr0089067, F Btr0089068	250	500	6.56626E-30	-1,00000
Atf6	FBgn0033010	F Btr0086079, F Btr0086080	1038	2078	4.33038E-122	-1,00139
CG11266	FBgn0031883	F Btr0089637, F Btr0089635, F Btr0089636	432	866	1.91378E-51	-1,00334
CG11266	FBgn0031883	F Btr0089638, F Btr0089639, F Btr0089640	429	861	3.28916E-51	-1,00504
eyg	FBgn0000625	F Btr0075979	248	498	4.70554E-30	-1,00581
Dcp2	FBgn0036534	F Btr0304975	6152	12369	0.00000E+00	-1,00760
par-1	FBgn0260934	F Btr0100391, F Btr0100392, F Btr0301504	730	1468	3.38598E-87	-1,00788
Scm	FBgn0003334	F Btr0082102	768	1546	6.75490E-92	-1,00936
gish	FBgn0250823	F Btr0301304, F Btr0305071, F Btr0305072	1312	2644	6.46761E-157	-1,01095
tna	FBgn0026160	F Btr0301658	491	995	4.23945E-60	-1,01897
Nipped-B	FBgn0026401	F Btr0301454, F Btr0301455, F Btr0301456	572	1162	2.51391E-70	-1,02252
RecQ5	FBgn0027375	F Btr0075714, F Btr0075715, F Btr0100362	329	669	6.64369E-41	-1,02392
HmqZ	FBgn0010228	F Btr0071673, F Btr0071674	4231	8618	0.00000E+00	-1,02635
CG14135	FBgn0036193	F Btr0290309	154	314	9.19721E-20	-1,02783
CG11486	FBgn0035397	F Btr0072998, F Btr0072999, F Btr0073000, F Btr0073001, F Btr0073002, F Btr0073003, F Btr0072991, F Btr0072992, F Btr0113130, F Btr0113131	357	730	5.79395E-45	-1,03197
CG17528	FBgn0261387	F Btr0111276, F Btr0111275, F Btr0111277	238	487	2.28810E-30	-1,03296
Nipped-B	FBgn0026401	F Btr0111119, F Btr0111118	574	1175	4.78325E-72	-1,03354
pho	FBgn0002521	F Btr0089204	165	338	2.13210E-21	-1,03456
CR42722	FBgn0261639	F Btr0303009	270	556	6.67483E-35	-1,04213
heph	FBgn0011224	F Btr0085885	148	305	1.32839E-19	-1,04321
Sap47	FBgn0013334	F Btr0083204, F Btr0083205, F Btr0083206, F Btr0083207, F Btr0083208, F Btr0083209, F Btr0083210, F Btr0301655	929	1917	6.73693E-119	-1,04510
pAbp	FBgn0261619	F Btr0086740	788	1627	3.81698E-101	-1,04595
Bsg	FBgn0261822	F Btr0079570, F Btr0079574, F Btr0079567, F Btr0079566	457	944	5.02225E-59	-1,04659
Ckl1beta	FBgn0000259	F Btr0073558	3149	6510	0.00000E+00	-1,04776
Gef26	FBgn0021873	F Btr0300039	176	364	2.37699E-23	-1,04836
heph	FBgn0011224	F Btr0300268, F Btr0300269	234	484	1.08720E-30	-1,04850
Bsg	FBgn0261822	F Btr0079573	474	981	1.88276E-61	-1,04937
gro	FBgn0001139	F Btr0084962, F Btr0084963, F Btr0084964, F Btr0084965, F Btr0084966, F Btr0302951, F Btr0302952	926	1919	6.28211E-120	-1,05127
l(2)s5379	FBgn0010704	F Btr0100673	1785	3701	8.81470E-231	-1,05199
l(2)s5379	FBgn0010704	F Btr0077840	1785	3702	6.09765E-231	-1,05238
CG971	FBgn0035253	F Btr0072806	283	587	2.53582E-37	-1,05256
hth	FBgn0001235	F Btr0082256, F Btr0082254, F Btr0082255, F Btr0082253, F Btr0301345, F Btr0301956	2636	5471	0.00000E+00	-1,05345
sdt	FBgn0261873	F Btr0089978, F Btr0100376, F Btr0111034, F Btr0089975, F Btr0100375, F Btr0089974, F Btr0308218, F Btr0308219, F Btr0308220	588	1224	2.93396E-77	-1,05772
lolal	FBgn0022238	F Btr0086776, F Btr0086777, F Btr0086778, F Btr0086779, F Btr0300483, F Btr0300484, F Btr0305270	1665	3469	3.68144E-218	-1,05900
pncr013:4	FBgn0262731	F Btr0091952	490	1021	9.36144E-65	-1,05913
CG6700	FBgn0032305	F Btr0080187	2046	4276	4.15016E-270	-1,06346
prominin-like	FBgn0026189	F Btr0073118, F Btr0306258	2132	4461	2.38759E-282	-1,06516
Pdk1	FBgn0020386	F Btr0072464, F Btr0072465	739	1548	1.19573E-98	-1,06676
CG13025	FBgn0036660	F Btr0075346	709	1486	9.81035E-95	-1,06758
Mitf	FBgn0263112	F Btr0307326, F Btr0307327, F Btr0307329, F Btr0307330	239	501	1.64678E-32	-1,06780
Bsg	FBgn0261822	F Btr0079568, F Btr0079569, F Btr0079571, F Btr0079572	537	1126	4.67877E-72	-1,06821
Adar	FBgn0026086	F Btr0070299, F Btr0070300, F Btr0100557, F Btr0307895, F Btr0305498	196	411	8.23339E-27	-1,06828
Cf2	FBgn0000286	F Btr0089647, F Btr0089648, F Btr0089649	528	1111	1.58197E-71	-1,07325
bun	FBgn0259176	F Btr0299656	469	987	1.25064E-63	-1,07346
CrebA	FBgn0004396	F Btr0075557	768	1618	4.33277E-104	-1,07503
unk	FBgn0004395	F Btr0305573	1399	2953	7.62875E-190	-1,07779
cib	FBgn0026084	F Btr0070641, F Btr0307206	10217	21574	0.00000E+00	-1,07832
Antp	FBgn0260642	F Btr0081654, F Btr0081655	477	1009	1.57313E-65	-1,08087
Gs1	FBgn0001142	F Btr0078115	259	548	5.69284E-36	-1,08122
Rbp2	FBgn0262734	F Btr0074279, F Btr0074280	8823	18674	0.00000E+00	-1,08169
CG8116	FBgn0037614	F Btr0300543	164	348	3.07728E-23	-1,08539
CG4502	FBgn0031896	F Btr0079417	384	816	1.38407E-53	-1,08746
CG40196	FBgn0058196	F Btr0113831	253	538	1.12422E-35	-1,08847
Sdc	FBgn0010415	F Btr0071707, F Btr0301557	455	968	1.56036E-63	-1,08914
Sdc	FBgn0010415	F Btr0071706, F Btr0071705, F Btr0273206, F Btr0273207	453	964	2.24892E-63	-1,08952
pncr013:4	FBgn0262731	F Btr0303019, F Btr0303020, F Btr0303021	221	471	1.85836E-31	-1,09168
Dyrk3	FBgn0027101	F Btr0100406	621	1324	7.11001E-87	-1,09224
CG4502	FBgn0031896	F Btr0079416	379	809	1.56795E-53	-1,09394
Gs1	FBgn0001142	F Btr0300568	219	474	5.98769E-32	-1,10084
Parp	FBgn0010247	F Btr0113885	2203	4726	5.8334E-312	-1,10115
CG12054	FBgn0039831	F Btr0305118	1800	3863	3.19430E-255	-1,10172
gish	FBgn0250823	F Btr0301304, F Btr0083262, F Btr0083261, F Btr0083264, F Btr0100331, F Btr0100332, F Btr0100333, F Btr0305071, F Btr0305072	160	344	2.05306E-23	-1,10434
CG11180	FBgn0034528	F Btr0086254	678	1463	6.48815E-98	-1,10957
		F Btr0301360, F Btr0301361	3239	6999	0.00000E+00	-1,11160
		F Btr0303296	3239	6999	0.00000E+00	-1,11160
CG1115	FBgn0037299	F Btr0305001	148	320	3.52764E-22	-1,11247
Cf2	FBgn0000286	F Btr0304887	539	1166	1.49484E-78	-1,11321
hth	FBgn0001235	F Btr0100454	4826	10441	0.00000E+00	-1,11336
A2bp1	FBgn0052062	F Btr0305093, F Btr0305096	1616	3499	1.32868E-234	-1,11452
CG1115	FBgn0037299	F Btr0078777, F Btr0305002	168	364	3.64102E-25	-1,11548
akirin	FBgn0082598	F Btr0302544	4448	9640	0.00000E+00	-1,11588

<i>myoglianin</i>	FBgn0026199	FBtr0089092,FBtr0089093,FBtr0089094,FBtr0089095	1167	2537	2,67258E-171	-1,12032
<i>how</i>	FBgn0017397	FBtr0084177	1913	4160	9,86398E-281	-1,12075
<i>UbcD2</i>	FBgn0015320	FBtr0080115,FBtr0080116	870	1897	7,55026E-129	-1,12463
<i>shi</i>	FBgn0003392	FBtr0111036,FBtr0111037,FBtr0074118,FBtr0074119,FBtr0074121,FBtr0074122,FBtr0301597	596	1300	1,27784E-88	-1,12513
<i>cals</i>	FBgn0039928	FBtr0089207	142	310	9,62498E-22	-1,12638
<i>R</i>	FBgn0004636	FBtr0072867,FBtr0303154	5306	11589	0,00000E+00	-1,12706
<i>Mkk4</i>	FBgn0024326	FBtr0300443	788	1722	1,43309E-117	-1,12782
<i>Nos</i>	FBgn0011676	FBtr0100484	513	1126	1,30630E-77	-1,13418
<i>Sh3beta</i>	FBgn0035772	FBtr0302548	225	495	1,00933E-34	-1,13750
<i>bowl</i>	FBgn0004893	FBtr0077490,FBtr0077491,FBtr0077492,FBtr0307026,FBtr0307027,FBtr0307028,FBtr0307029	539	1186	4,81152E-82	-1,13775
<i>Mkk4</i>	FBgn0024326	FBtr0081892	827	1820	1,76362E-125	-1,13798
<i>ogre</i>	FBgn0004646	FBtr0071036	1968	4345	2,41522E-300	-1,14263
<i>CG5059</i>	FBgn0037007	FBtr0078216,FBtr0078217,FBtr0078218,FBtr0078219	1265	2794	1,97969E-193	-1,14319
<i>Dsp1</i>	FBgn0011764	FBtr0089262,FBtr0289960	1896	4190	3,74759E-290	-1,14399
<i>Dyb</i>	FBgn0033739	FBtr0087930,FBtr0087929,FBtr0100298,FBtr0305077	275	608	8,95658E-43	-1,14464
<i>TBPH</i>	FBgn0025790	FBtr0089624,FBtr0089626,FBtr0089627,FBtr0301643,FBtr0301644	161	356	2,60566E-25	-1,14482
<i>Ptp10D</i>	FBgn0004370	FBtr0073524,FBtr0273235	861	1904	2,33165E-132	-1,14495
<i>elF5</i>	FBgn0030719	FBtr0074147,FBtr0074146,FBtr0074144,FBtr0074148,FBtr0074145,FBtr0074150	164	363	7,16997E-26	-1,14627
<i>prominin-like</i>	FBgn0026189	FBtr0073119,FBtr0073120	966	2144	1,12338E-149	-1,15021
<i>Cklalpha</i>	FBgn0015024	FBtr0073681,FBtr0073682,FBtr0300380	5036	11209	0,00000E+00	-1,15431
<i>CR42723</i>	FBgn00261640	FBtr0303010	237	528	1,27183E-37	-1,15565
<i>Galpha49B</i>	FBgn0004435	FBtr0087829,FBtr0087830	417	930	7,93344E-66	-1,15718
<i>kn</i>	FBgn0001319	FBtr0087465,FBtr0112810,FBtr0301400	257	575	2,83418E-41	-1,16179
<i>Bsg</i>	FBgn0261822	FBtr0079570,FBtr0079568,FBtr0079569,FBtr0079573,FBtr0079567,FBtr0079571,FBtr0079572,FBtr0079566	1764	3947	9,57366E-279	-1,16191
<i>tup</i>	FBgn0003896	FBtr0081112	224	503	2,47060E-36	-1,16706
<i>qkr58E-3</i>	FBgn0022984	FBtr0290254	1092	2461	5,28351E-176	-1,17227
<i>CG5500</i>	FBgn0037754	FBtr0082139	192	433	1,25381E-31	-1,17326
<i>mrj</i>	FBgn0034091	FBtr0087193,FBtr0087194,FBtr0087195,FBtr0087196,FBtr0113084,FBtr0306652,FBtr0306653	623	1405	7,10353E-101	-1,17327
<i>TotA</i>	FBgn0028396	FBtr0083971	117	264	1,45357E-19	-1,17403
<i>Gs1</i>	FBgn0001142	FBtr0078114	224	506	7,69237E-37	-1,17564
<i>how</i>	FBgn0017397	FBtr0301401	1792	4049	3,78457E-290	-1,17599
<i>CG11727</i>	FBgn0262740	FBtr0073547	840	1902	4,30508E-137	-1,17906
<i>lim19</i>	FBgn0015509	FBtr0088846	140	317	1,95354E-23	-1,17906
<i>tup</i>	FBgn0003896	FBtr0081111	222	503	7,20278E-37	-1,18000
<i>pho</i>	FBgn0002521	FBtr0089204,FBtr0089205	1815	4113	4,29367E-296	-1,18022
<i>Mhcl</i>	FBgn0026059	FBtr0083231	176	399	1,89475E-29	-1,18081
<i>CG11266</i>	FBgn0031883	FBtr0089638,FBtr0089639,FBtr0089635	228	517	8,36609E-38	-1,18113
<i>CaMKI</i>	FBgn0016126	FBtr0089065	552	1255	2,73006E-91	-1,18495
<i>Hr46</i>	FBgn0000448	FBtr0306346	405	922	2,46024E-67	-1,18684
<i>CG5065</i>	FBgn0034145	FBtr0087108,FBtr0302206	161	367	2,40451E-27	-1,18872
<i>CG4768</i>	FBgn0030790	FBtr0074332	470	1073	1,10401E-78	-1,19092
<i>mRpS5</i>	FBgn0044510	FBtr0111147,FBtr0111146	489	1117	6,09039E-82	-1,19172
<i>tna</i>	FBgn0026160	FBtr0076267	876	2005	6,77293E-147	-1,19460
<i>CG11266</i>	FBgn0031883	FBtr0089637	228	522	7,67132E-39	-1,19502
<i>tal-2A</i>	FBgn0259731	FBtr0299998	442	1015	5,74508E-75	-1,19936
<i>tal-1A</i>	FBgn0259730	FBtr0299997	442	1015	5,74508E-75	-1,19936
<i>tal-3A</i>	FBgn0259732	FBtr0299999	442	1015	5,74508E-75	-1,19936
<i>tal-AA</i>	FBgn0259733	FBtr0299996	442	1015	5,74508E-75	-1,19936
<i>mt-Cyt-b</i>	FBgn0013678	FBtr0100884	14497	33580	0,00000E+00	-1,21099
<i>Pdk1</i>	FBgn0020386	FBtr0072470,FBtr0072471,FBtr0072466,FBtr0072467	895	2088	2,96546E-157	-1,22216
<i>CG30343</i>	FBgn0050343	FBtr0308205	202	474	1,19602E-36	-1,23053
<i>qkr58E-3</i>	FBgn0022984	FBtr0307214	1156	2715	2,27542E-206	-1,23181
<i>CG11727</i>	FBgn0262740	FBtr0300733	663	1561	2,60548E-119	-1,23539
<i>CR41597</i>	FBgn0085810	FBtr0114264	218	514	7,05753E-40	-1,23744
<i>CG4662</i>	FBgn0038735	FBtr0083814	119	281	2,77533E-22	-1,23961
<i>CG17715</i>	FBgn0041004	FBtr0111249	893	2109	1,11451E-161	-1,23983
<i>E2f</i>	FBgn0011766	FBtr0084119	306	723	5,50342E-56	-1,24046
<i>Zyx</i>	FBgn0011642	FBtr0089210,FBtr0089213,FBtr0089215	256	605	6,64457E-47	-1,24079
<i>Zyx</i>	FBgn0011642	FBtr0089211,FBtr0089212,FBtr0089214,FBtr0089216	297	702	2,62206E-54	-1,24101
<i>CG17683</i>	FBgn0262115	FBtr0111301	158	374	2,17093E-29	-1,24311
<i>mt:Coll1</i>	FBgn0013676	FBtr0100868	33823	80212	0,00000E+00	-1,24581
<i>AP-1gamma</i>	FBgn0030089	FBtr0071295,FBtr0071297,FBtr0071298,FBtr0112965	99	235	8,37405E-19	-1,24716
<i>CG15923</i>	FBgn0038814	FBtr0113254	877	2089	3,57269E-162	-1,25216
<i>zip</i>	FBgn0005634	FBtr0072399,FBtr0100466,FBtr0100467,FBtr0302572,FBtr0302573,FBtr0302574,FBtr0302575,FBtr0306576	1131	2712	1,96335E-212	-1,26176
<i>gus</i>	FBgn0026238	FBtr0089755,FBtr0089752,FBtr0089754,FBtr0089757,FBtr0089753,FBtr0089756	558	1339	2,36463E-105	-1,26282
<i>CG17715</i>	FBgn0041004	FBtr0111247	621	1491	2,61716E-117	-1,26362
<i>gro</i>	FBgn0001139	FBtr0305047	1898	4562	0,00000E+00	-1,26519
<i>PRL-1</i>	FBgn0024734	FBtr0080857,FBtr0080856	3306	8009	0,00000E+00	-1,27654
<i>myoglianin</i>	FBgn0026199	FBtr0089095	110	267	5,02911E-22	-1,27934
<i>syd</i>	FBgn0024187	FBtr0076769,FBtr0300412,FBtr0300413	129	314	8,16745E-26	-1,28339
<i>Pi4Klalpha</i>	FBgn0037339	FBtr0078755,FBtr0078756,FBtr0078757	111	272	1,20779E-22	-1,29305
<i>Hr46</i>	FBgn0000448	FBtr0306345	864	2122	7,22224E-172	-1,29632
<i>PMCA</i>	FBgn0259214	FBtr0304046,FBtr0304047,FBtr0304048,FBtr0304049,FBtr0300554,FBtr0300555,FBtr0300556,FBtr0300557	306	753	1,07181E-61	-1,29912
<i>CG8419</i>	FBgn0031999	FBtr0079589	164	404	1,58062E-33	-1,30066
<i>sky</i>	FBgn0032901	FBtr0081445	310	764	1,08040E-62	-1,30130

CG12567	FBgn0039958	FBtr0113704,FBtr0113705,FBtr0300702,FBtr0300703,FBtr0300704	533	1316	1,19764E-107	-1,30395
pIexA	FBgn0025741	FBtr0089225,FBtr0089226,FBtr0089223	230	573	7,52185E-48	-1,31690
CadN	FBgn0015609	FBtr0081016,FBtr0081015,FBtr0100313,FBtr0100315	170	424	9,70881E-36	-1,31853
gish	FBgn0250823	FBtr0083262,FBtr0083261,FBtr0083265,FBtr0083264,FBtr0100332,FBtr0100333	924	2311	8,11501E-192	-1,32255
grk	FBgn0001137	FBtr0079708	135	338	9,55854E-29	-1,32406
lin19	FBgn0015509	FBtr0088845	121	304	5,12092E-26	-1,32906
CG6357	FBgn0033875	FBtr0087638	267	671	1,28653E-56	-1,32947
CrebA	FBgn0004396	FBtr0075558	1399	3520	2,46196E-294	-1,33118
Zyx	FBgn0011642	FBtr0089210,FBtr0089213	181	457	5,03067E-39	-1,33620
CG17698	FBgn0040056	FBtr0111168,FBtr0111167	372	941	1,10358E-79	-1,33889
dbr	FBgn0067779	FBtr0306536,FBtr0306538	152	386	2,55554E-33	-1,34453
qkr54B	FBgn0022987	FBtr0306248	707	1804	7,07324E-154	-1,35142
vn	FBgn0003984	FBtr0077082	283	725	1,26624E-62	-1,35718
Ptp10D	FBgn0004370	FBtr0073525,FBtr0073522	366	942	1,05130E-81	-1,36388
bw	FBgn0000241	FBtr0072117	134	345	2,44673E-30	-1,36436
eIF-4B	FBgn0020660	FBtr0113679	182	469	4,02730E-41	-1,36565
H	FBgn0001169	FBtr0083915,FBtr0083916	225	580	1,15099E-50	-1,36613
crq	FBgn0015924	FBtr0078087	644	1670	1,60109E-145	-1,37472
CG17683	FBgn0262115	FBtr0111298,FBtr0111299	94	244	6,34165E-22	-1,37615
Zyx	FBgn0011642	FBtr0089212,FBtr0089215	182	476	1,95322E-42	-1,38702
Lsd-1	FBgn0039114	FBtr0084455,FBtr0084456,FBtr0084457	76	199	3,26991E-18	-1,38870
Zyx	FBgn0011642	FBtr0089211,FBtr0089216	181	474	2,23363E-42	-1,38890
linx2	FBgn0027108	FBtr0071005,FBtr0071006	15078	39521	0,00000E+00	-1,39017
Muc11A	FBgn0052656	FBtr0089803	144	378	4,09263E-34	-1,39232
Mnt	FBgn0023215	FBtr0307278,FBtr0301823	803	2113	1,68494E-187	-1,39582
Hsc70-3	FBgn0001218	FBtr0073608	85	225	8,05487E-21	-1,40439
Pur-alpha	FBgn0022361	FBtr0089996,FBtr0089995,FBtr0089994,FBtr0089993	514	1363	2,88923E-122	-1,40695
CG30343	FBgn0050343	FBtr0088594	293	778	3,55503E-70	-1,40887
sgg	FBgn0003371	FBtr0070475,FBtr0070476,FBtr0301966	1341	3564	7,5676E-320	-1,41019
Cklalpha	FBgn0015024	FBtr0073680	5372	14301	0,00000E+00	-1,41258
CG17528	FBgn0261387	FBtr0111274	85	227	3,35784E-21	-1,41716
CaMKI	FBgn0016126	FBtr0089067	181	484	1,89474E-44	-1,41902
stai	FBgn0051641	FBtr0304908	2437	6517	0,00000E+00	-1,41910
stai	FBgn0051641	FBtr0079196,FBtr0079197,FBtr0079198	2424	6490	0,00000E+00	-1,42083
sgg	FBgn0003371	FBtr0070471,FBtr0070472,FBtr0070473,FBtr0070466,FBtr0070468,FBtr0070469,FBtr0070470	1345	3607	0,00000E+00	-1,42319
CG42258	FBgn0259143	FBtr0299558,FBtr0299559	426	1149	2,40675E-105	-1,43145
Ioia	FBgn0005630	FBtr0089365,FBtr0089347,FBtr0089361,FBtr0089360,FBtr0089366,FBtr0089355,FBtr0089354,FBtr0089346,FBtr0089345,FBtr0089364	192	518	5,82406E-48	-1,43185
zip	FBgn0005634	FBtr0072398	1540	4169	0,00000E+00	-1,43677
fwe	FBgn0261722	FBtr0075543	91	250	4,98808E-24	-1,45799
		FBtr0082858	13736	37797	0,00000E+00	-1,46031
Antp	FBgn0260642	FBtr0081647,FBtr0081648,FBtr0081649,FBtr0081650,FBtr0081651,FBtr0081652,FBtr0081653,FBtr0081656	672	1855	1,08982E-174	-1,46489
pAbp	FBgn0261619	FBtr0086738	446	1240	6,88759E-118	-1,47522
pAbp	FBgn0261619	FBtr0086743,FBtr0086739	446	1240	6,88759E-118	-1,47522
CaMKII	FBgn0004624	FBtr0089218,FBtr0089219,FBtr0089217	554	1545	2,71559E-147	-1,47965
CaMKII	FBgn0004624	FBtr0100146,FBtr0100147,FBtr0100148,FBtr0300378	554	1546	1,74278E-147	-1,48058
CG8745	FBgn0036381	FBtr0075801	96	268	3,08241E-26	-1,48113
CR43241	FBgn0262886	FBtr0306297	98	274	9,98207E-27	-1,48332
Hr46	FBgn0000448	FBtr0088366,FBtr0088368,FBtr0112799,FBtr0302438	659	1848	2,53620E-177	-1,48761
CaMKI	FBgn0016126	FBtr0089069	70	198	8,66801E-20	-1,50007
Mbs	FBgn0005536	FBtr0112850,FBtr0112851,FBtr0112852,FBtr0301472,FBtr0301473,FBtr0301575,FBtr0308213,FBtr0308214,FBtr0308215,FBtr0308216	466	1340	1,53076E-132	-1,52383
CG41520	FBgn0087011	FBtr0114111,FBtr0114112,FBtr0302581,FBtr0302582	134	390	1,27207E-39	-1,54124
Fas3	FBgn0000636	FBtr0081051,FBtr0081052	2666	7762	0,00000E+00	-1,54175
Cklbeta	FBgn0000259	FBtr0073562	63	185	1,95058E-19	-1,55410
Ank	FBgn0011747	FBtr0089174	157	465	6,28408E-48	-1,56647
CG17715	FBgn0041004	FBtr0111244,FBtr0111246,FBtr0111245,FBtr0111248,FBtr0306550,FBtr0306551	200	593	5,68733E-61	-1,56803
dbr	FBgn0067779	FBtr0078100,FBtr0306537,FBtr0306539	180	540	1,99059E-56	-1,58496
Nrg	FBgn0002968	FBtr0071207,FBtr0071209,FBtr0301762,FBtr0301764,FBtr0305914	1144	3445	0,00000E+00	-1,59042
DF31	FBgn0022893	FBtr0085919,FBtr0085920	27141	81808	0,00000E+00	-1,59177
DF31	FBgn0022893	FBtr0100293	27249	82324	0,00000E+00	-1,59511
pallidin	FBgn0036192	FBtr0300097,FBtr0300725,FBtr0300726	93	282	4,31882E-30	-1,60039
Cam	FBgn0000253	FBtr0088001,FBtr0088002	7691	23442	0,00000E+00	-1,60785
Galalpha49B	FBgn0004435	FBtr0304955	1132	3452	0,00000E+00	-1,60856
mt:Coll	FBgn0013675	FBtr0100863	10541	32317	0,00000E+00	-1,61628
gish	FBgn0250823	FBtr0083263	1002	3086	0,00000E+00	-1,62286
Fbp1	FBgn0000639	FBtr0075750	8274	25614	0,00000E+00	-1,63028
Fbp1	FBgn0000639	FBtr0075749	8273	25613	0,00000E+00	-1,63039
Akap200	FBgn0027932	FBtr0079665,FBtr0079667	5459	16929	0,00000E+00	-1,63279
Akap200	FBgn0027932	FBtr0079664,FBtr0079666	5459	16932	0,00000E+00	-1,63304
eIF-4B	FBgn0020660	FBtr0113680	70	218	5,21822E-24	-1,63890
Mnt	FBgn0023215	FBtr0307277,FBtr0301822	882	2748	7,28101E-296	-1,63953
CG7115	FBgn0027515	FBtr0079523	98	306	1,38606E-33	-1,64268
CG11266	FBgn0031883	FBtr0089639,FBtr0089635	63	197	6,85753E-22	-1,64477
Pdp1	FBgn0016694	FBtr0076775,FBtr0076776,FBtr0076777,FBtr0076780,FBtr0076782,FBtr0300499,FBtr0300500	194	608	2,88267E-66	-1,64801
Rfabg	FBgn0087002	FBtr0089188	676	2127	1,72179E-231	-1,65372
CG7367	FBgn0031976	FBtr0306002	102	323	5,14858E-36	-1,66297
Pdp1	FBgn0016694	FBtr0306535	195	623	3,12539E-69	-1,67576

Hr39	FBgn0261239	FBtr0081480	302	966	3.61776E-107	-1,67747
mt:Col	FBgn0013674	FBtr0100861	45828	146749	0.00000E+00	-1,67905
CG7367	FBgn0031976	FBtr0301128	143	460	1.05238E-51	-1,68562
Ank	FBgn0011747	FBtr0089173,FBtr0089171,F Btr0089172,FBtr0300497,FBtr0300498	133	429	1.99072E-48	-1,68955
swi2	FBgn0034262	FBtr0086889	88	284	2.22491E-32	-1,69032
Pabp2	FBgn0005648	FBtr0088786	143	462	3.99826E-52	-1,69188
Cam	FBgn0000253	FBtr0304963,FBtr0304964	8288	26840	0.00000E+00	-1,69529
Pdp1	FBgn0016694	FBtr0076776,FBtr0076777,FBtr0300499,FBtr0306535	80	265	7.38196E-31	-1,72792
Eph	FBgn0025936	FBtr0089082,FBtr0089083,FBtr0089084	370	1229	2.35036E-141	-1,73189
Akap200	FBgn0027932	FBtr0079665	95	324	8.68849E-39	-1,76999
Galpha49B	FBgn0004435	FBtr0087829,FBtr0087830,FBtr0087831,FBtr0087833,FBtr0087834,FBtr0304954	710	2445	1.24882E-290	-1,78394
ventrally-expressed-protein-D	FBgn0053200	FBtr0307213	48	167	8.87292E-21	-1,79874
H	FBgn0001169	FBtr0083914,FBtr0083917	541	1911	1.09238E-232	-1,82063
Eph	FBgn0025936	FBtr0089086	303	1076	8.65538E-132	-1,82829
myoglianin	FBgn0026199	FBtr0089092,FBtr0089093	105	373	3.33842E-46	-1,82879
CG14526	FBgn0027578	FBtr0301945	46	164	9.10662E-21	-1,83399
CG2225	FBgn0032957	FBtr0304885	133	476	5.49543E-59	-1,83954
		FBtr0076660	623	2241	3.80748E-277	-1,84684
Hr39	FBgn0261239	FBtr0081479,FBtr0081481	881	3193	0.00000E+00	-1,85770
CG32016	FBgn0052016	FBtr0089232	84	307	5.03507E-39	-1,86978
CG9894	FBgn0031453	FBtr0307080	4227	15511	0.00000E+00	-1,87559
Cyp6g1	FBgn0025454	FBtr0087992	66	243	3.09904E-31	-1,88042
CG9894	FBgn0031453	FBtr0077713,FBtr0077714,FBtr0307080	1452	5391	0.00000E+00	-1,89251
pncr013:4	FBgn0262731	FBtr0303019	94	351	2.11269E-45	-1,90074
UBL3	FBgn0026076	FBtr0074175	54	204	7.39942E-27	-1,91754
CG10417	FBgn0033021	FBtr0086092	90	341	1.07016E-44	-1,92177
CG9894	FBgn0031453	FBtr0077713,FBtr0077714	2930	11197	0.00000E+00	-1,93414
Fbp2	FBgn0000640	FBtr0079808	817	3125	0.00000E+00	-1,93545
CG32016	FBgn0052016	FBtr0089229	82	321	2.67820E-43	-1,96888
CG17471	FBgn0039924	FBtr0100544	60	238	1.42722E-32	-1,98793
CG17471	FBgn0039924	FBtr0100543	60	241	2.92884E-33	-2,00600
CG32016	FBgn0052016	FBtr0089233	105	424	2.21138E-58	-2,01367
CG5958	FBgn0031913	FBtr0079466	32	135	1.47629E-19	-2,07682
CR43241	FBgn0262886	FBtr0306296	34	149	4.12348E-22	-2,13171
nimC2	FBgn0028939	FBtr0080589,FBtr0080588	69	304	7.11246E-45	-2,13940
CG12990	FBgn0030859	FBtr0074479	49	226	1.21449E-34	-2,20547
Rbp1-like	FBgn0030479	FBtr0073790	215	997	5.50079E-151	-2,21326
TpnC25D	FBgn0031692	FBtr0079063	38	178	9.44630E-28	-2,22781
E2f	FBgn0011766	FBtr0084118	120	569	1.13696E-87	-2,24539
CG10417	FBgn0033021	FBtr0086091	100	485	4.95101E-76	-2,27798
CG40196	FBgn0058196	FBtr0113829,FBtr0113830,FBtr0301121	53	258	7.55758E-41	-2,28331
CG9894	FBgn0033669	FBtr0088052	64	316	2.18492E-50	-2,30378
Act5C	FBgn0000042	FBtr0070822,FBtr0100662,FBtr0100663	1371	7183	0.00000E+00	-2,38936
UBL3	FBgn0026076	FBtr0074174,FBtr0300787	94	533	7.59301E-92	-2,50340
Pabp2	FBgn0005648	FBtr0088785	941	5443	0.00000E+00	-2,53214
CG2233	FBgn0029990	FBtr0071123	192	1126	3.64705E-197	-2,55203
mt:rRNA:G	FBgn0013694	FBtr0100869	18	115	1.31510E-21	-2,67557
mt:rRNA:Y	FBgn0013710	FBtr0100860	15	96	3.07578E-18	-2,67807
CG3999	FBgn0037801	FBtr0082225	21	135	2.00174E-25	-2,68450
CG10006	FBgn0036461	FBtr0113171	19	124	1.43049E-23	-2,70627
CG32016	FBgn0052016	FBtr0089234	33	217	1.13543E-40	-2,71716
Zyx	FBgn0011642	FBtr0089210,FBtr0089211,FBtr0089212	39	257	3.55007E-48	-2,72022
Zyx	FBgn0011642	FBtr0089213,FBtr0089215,FBtr0089216	39	257	3.55007E-48	-2,72022
Zyx	FBgn0011642	FBtr0089214	38	255	2.51803E-48	-2,74643
mt:ND4	FBgn0262952	FBtr0100879	1500	11843	0.00000E+00	-2,98100
mt:rRNA:W	FBgn0013709	FBtr0100858	14	112	2.85095E-23	-3,00000
pncr013:4	FBgn0262731	FBtr0303020,FBtr0303021	77	623	1.71565E-127	-3,01630
mt:ND5	FBgn0013684	FBtr0100877	3108	26146	0.00000E+00	-3,07253
mt:ND3	FBgn0013681	FBtr0100870	99	871	2.46348E-184	-3,13717
CG10514	FBgn0039312	FBtr0084864	11	132	1.97103E-31	-3,58496
CG10513	FBgn0039311	FBtr0114505	6	78	2.91618E-19	-3,70044
CG11892	FBgn0039313	FBtr0089644	18	235	4.90467E-57	-3,70659
CG11892	FBgn0039313	FBtr0089645	18	235	4.90467E-57	-3,70659
mt:rRNA:C	FBgn0013690	FBtr0100859	11	144	3.36099E-35	-3,71049
CG32016	FBgn0052016	FBtr0089230,FBtr0089231	10	133	1.17438E-32	-3,73335
mt:rRNA:L:UUR	FBgn0013699	FBtr0100862	7	95	1.26312E-23	-3,76250
CG9259	FBgn0032913	FBtr0081464	16	232	7.35809E-58	-3,85798
mt:ATPase6	FBgn0013672	FBtr0100867	2522	36678	0.00000E+00	-3,86227
CG40351	FBgn0040022	FBtr0302248	4	75	4.45652E-20	-4,22882
CG40351	FBgn0040022	FBtr0113869,FBtr0302244	4	75	4.45652E-20	-4,22882
CG40351	FBgn0040022	FBtr0302243	4	93	6.84826E-26	-4,53916
CG40351	FBgn0040022	FBtr0113870,FBtr0113871	6	147	5.26998E-41	-4,61471
CG16727	FBgn0038719	FBtr0083780	15	386	7.41482E-108	-4,68557
mt:ND1	FBgn0013679	FBtr0100886	365	9585	0.00000E+00	-4,71481
CG3292	FBgn0034710	FBtr0071783	16	462	2.51399E-131	-4,85175
mt:ATPase8	FBgn0013673	FBtr0100866	567	16433	0.00000E+00	-4,85710
mt:lrRNA	FBgn0013686	FBtr0100888	32368	975604	0.00000E+00	-4,91366
mt:rRNA:P	FBgn0013702	FBtr0100882	2	62	3.78452E-18	-4,95420
Fst	FBgn0037724	FBtr0082101	12	374	1.64425E-107	-4,96193
mt:ND2	FBgn0013680	FBtr0100857	151	5273	0.00000E+00	-5,12600
CG3264	FBgn0034712	FBtr0071781	11	399	6.11024E-117	-5,18081
CG10505	FBgn0034612	FBtr0071619	4	146	5.00948E-43	-5,18982
CG7882	FBgn0033047	FBtr0085966	2	81	2.62446E-24	-5,33985
Mur18B	FBgn0030999	FBtr0074672	4	182	8.03058E-55	-5,50779
mt:ND6	FBgn0013685	FBtr0100883	66	3640	0.00000E+00	-5,78533
mt:srRNA	FBgn0013688	FBtr0100890	5	357	1.91917E-111	-6,15785
mt:rRNA:L:CUN	FBgn0013698	FBtr0100887	18	1386	0.00000E+00	-6,26679
CG17752	FBgn0038718	FBtr0083779	2	157	2.08322E-49	-6,29462
mt:ND4L	FBgn0013683	FBtr0100880	33	2698	0.00000E+00	-6,35328
CG42235	FBgn0250757	FBtr0290137,FBtr0290138,FBtr0290139,FBtr0290140,FBtr0290141	0	121	8.77010E-41	-Infinity

CG42235	FBgn0250757	FTr0290139	0	104	4,86609E-35	-Infinity
CG42235	FBgn0250757	FTr0290140	0	92	5,45626E-31	-Infinity
CG2187	FBgn0017448	FTr0085861,FTr0303376	0	60	3,18975E-20	-Infinity

Supplementary Table 6: Genes down-regulated in *sd::Gal4>UAS::RpL12-Myc* vs *sd::Gal4/+*. FC: Fold Change.

Flybase Gene Symbol	Flybase ID Genes	Flybase ID Transcripts	Number of reads		Adjusted P-value	log ₂ (FC)
			<i>sd::Gal4>UAS::RpL12-Myc</i>	<i>sd::Gal4/+</i>		
<i>Cklibeta</i>	FBgn000259	FBtr0308084	151	302	4.25264E-20	-1
<i>Tao-1</i>	FBgn0031030	FBtr0303999	1664	3330	5.16696E-213	-1,00087
<i>eyg</i>	FBgn000625	FBtr0100170	241	483	1,41536E-31	-1,00299
<i>CG14464</i>	FBgn0033000	FBtr0299923	771	1546	1,48315E-99	-1,00374
<i>elF-4a</i>	FBgn0001942	FBtr0079176	6582	13214	0	-1,00547
<i>Sh3beta</i>	FBgn0035772	FBtr0076873,FBtr0302547,FBtr0302548	1276	2566	1,35724E-165	-1,00789
<i>Pkn</i>	FBgn0020621	FBtr0088601,FBtr0088603,FBtr0088604,FBtr0088605,FBtr0302604,FBtr0112897,FBtr0301511	1305	2625	1,62687E-169	-1,00827
<i>gro</i>	FBgn0001139	FBtr0084962,FBtr0084963,FBtr0084964,FBtr0084965,FBtr0084966,FBtr0302951,FBtr0302952	953	1919	2,54324E-124	-1,00981
<i>CG13025</i>	FBgn0036660	FBtr0075346	736	1486	6,14527E-97	-1,01366
<i>CG6084</i>	FBgn0086254	FBtr0076139	285	576	3,98708E-38	-1,01511
<i>Tsp42Ea</i>	FBgn0029508	FBtr0086171,FBtr0086172,FBtr0086173	183	370	9,90642E-25	-1,01568
<i>CG6091</i>	FBgn0036180	FBtr0273305,FBtr0273306	264	534	1,72904E-35	-1,01630
<i>gish</i>	FBgn0250823	FBtr0301304,FBtr0083262,FBtr0083261,FBtr0083264,FBtr0100331,FBtr0100332,FBtr0100333,FBtr0305071,FBtr0305072	170	344	4,73567E-23	-1,01687
<i>Pur-alpha</i>	FBgn0022361	FBtr0089995,FBtr0089993	201	407	2,77302E-27	-1,01783
<i>Pur-alpha</i>	FBgn0022361	FBtr0089996,FBtr0089994	200	405	4,90691E-27	-1,01792
<i>mask</i>	FBgn0043884	FBtr0084563	1369	2774	2,21313E-181	-1,01885
<i>CG17698</i>	FBgn0040056	FBtr0111166,FBtr0111168,FBtr0111167	568	1152	6,90771E-76	-1,02018
<i>mRpS21</i>	FBgn0044511	FBtr0082764	200	406	2,33562E-27	-1,02148
<i>CG1737</i>	FBgn0031374	FBtr0077811,FBtr0110882,FBtr0110883,FBtr0113011	232	471	1,62174E-31	-1,02180
<i>elF-4a</i>	FBgn0001942	FBtr0079178	6666	13540	0	-1,02233
<i>gus</i>	FBgn0026238	FBtr0089755,FBtr0089752,FBtr0089754,FBtr0089753,FBtr0089756	192	390	2,97285E-26	-1,02237
<i>vtd</i>	FBgn0260987	FBtr0113746	1837	3736	1,64579E-245	-1,02414
<i>alph</i>	FBgn0086361	FBtr0085443	1613	3283	3,94811E-216	-1,02527
<i>CG4662</i>	FBgn0038735	FBtr0083814	138	281	3,03576E-19	-1,02590
<i>ltp</i>	FBgn0035023	FBtr0300187,FBtr0290219	508	1035	1,01188E-68	-1,02673
<i>CG42342</i>	FBgn0259244	FBtr0299895,FBtr0299897	158	322	5,91379E-22	-1,02714
<i>4EHP</i>	FBgn0053100	FBtr0300475,FBtr0303159	179	365	9,71646E-25	-1,02794
<i>lmp</i>	FBgn0262735	FBtr0305150	3339	6817	0	-1,02972
<i>Cf2</i>	FBgn000286	FBtr0089647,FBtr0089648,FBtr0089649	543	1111	2,97210E-74	-1,03283
<i>CG13360</i>	FBgn0025620	FBtr0070147	152	311	2,56838E-21	-1,03284
<i>Csk</i>	FBgn0262081	FBtr0299728,FBtr0300548,FBtr0300546,FBtr0300547,FBtr0300549	1521	3114	4,36575E-207	-1,03375
<i>Nedd4</i>	FBgn0259174	FBtr0299642,FBtr0299645,FBtr0299647,FBtr0300519	676	1384	2,18570E-92	-1,03375
<i>CG31121</i>	FBgn0051121	FBtr0084723	285	584	2,00509E-39	-1,03501
<i>eyg</i>	FBgn000625	FBtr0075979	243	498	7,58304E-34	-1,03519
<i>CG4612</i>	FBgn0035016	FBtr0306136	3326	6819	0	-1,03577
<i>Sdc</i>	FBgn0010415	FBtr0273207,FBtr0305897	4229	8671	0	-1,03588
<i>CG4768</i>	FBgn0030790	FBtr0074332	523	1073	5,00838E-72	-1,03677
<i>Ranbp16</i>	FBgn0053180	FBtr0303646	187	384	2,36964E-26	-1,03807
<i>CG6700</i>	FBgn0032305	FBtr0301710	1168	2400	1,10371E-160	-1,03899
<i>bbg</i>	FBgn0087007	FBtr0273424,FBtr0273425,FBtr0273426	145	298	1,32010E-20	-1,03926
<i>Bsg</i>	FBgn0261822	FBtr0079570,FBtr0079574,FBtr0079567,FBtr0079566	459	944	9,72579E-64	-1,04029
<i>CG15535</i>	FBgn0039764	FBtr0085629	138	284	9,87170E-20	-1,04122
<i>qkr54B</i>	FBgn0022987	FBtr0086923,FBtr0086925	133	274	3,54544E-19	-1,04275
<i>CaMKI</i>	FBgn0016126	FBtr0089069,FBtr0089063,FBtr0089064,FBtr0089065,FBtr0089066,FBtr0089067,FBtr0089068	2301	4751	4,7632E-320	-1,04597
<i>Ckllalpha</i>	FBgn0015024	FBtr0073680,FBtr0300380	845	1745	5,89448E-118	-1,04620
<i>CG4612</i>	FBgn0035016	FBtr0306137	3394	7019	0	-1,04828
<i>Stk</i>	FBgn0046692	FBtr0111111	899	1860	3,86625E-126	-1,04891
<i>R</i>	FBgn0004636	FBtr0072867,FBtr0303154	5599	11589	0	-1,04952
<i>Sdc</i>	FBgn0010415	FBtr0071706,FBtr0071705,FBtr0273206,FBtr0273207	465	964	5,25968E-66	-1,05180
<i>CG8949</i>	FBgn0030812	FBtr0074412,FBtr0304839	1469	3046	7,80014E-207	-1,05208
<i>Sdc</i>	FBgn0010415	FBtr0071707,FBtr0301557	466	968	1,98752E-66	-1,05468
<i>mub</i>	FBgn0262737	FBtr0304980	4130	8594	0	-1,05719
<i>E2f</i>	FBgn0011766	FBtr0084119	347	723	4,71004E-50	-1,05906
<i>CG17490</i>	FBgn0040009	FBtr0111259	340	709	3,54907E-49	-1,06025
<i>CG17883</i>	FBgn0040005	FBtr0111291,FBtr0111292	603	1259	7,25742E-87	-1,06205
<i>CaMKI</i>	FBgn0016126	FBtr0089069,FBtr0089066,FBtr0089067,FBtr0089068	239	500	5,08635E-35	-1,06492
<i>Haspin</i>	FBgn0046706	FBtr0113784	954	1996	9,74021E-138	-1,06505
<i>ewg</i>	FBgn0005427	FBtr0089441,FBtr0308208,FBtr0308209	720	1508	1,96217E-104	-1,06657
<i>Bsg</i>	FBgn0261822	FBtr0079573	468	981	3,00647E-68	-1,06774
<i>Scm</i>	FBgn0003334	FBtr0082102	734	1546	5,01310E-108	-1,07469
<i>Rbp1-like</i>	FBgn0030479	FBtr0304001	1704	3590	6,59884E-250	-1,07506
<i>Wnt4</i>	FBgn0010453	FBtr0089291	224	472	1,55779E-33	-1,07529
<i>CG7668</i>	FBgn0036929	FBtr0074904,FBtr0074905	267	563	7,36560E-40	-1,07630
<i>Patronin</i>	FBgn0263197	FBtr0300603,FBtr0273447,FBtr0086950,FBtr0300604	619	1306	1,28358E-91	-1,07714
<i>nimC2</i>	FBgn0028939	FBtr0080589,FBtr0080588	144	304	5,12689E-22	-1,07800
<i>CG2316</i>	FBgn0039890	FBtr0089152	204	431	7,94365E-31	-1,07912
<i>fwe</i>	FBgn0261722	FBtr0075541	225	476	4,21292E-34	-1,08104
<i>csw</i>	FBgn0000382	FBtr0070380	760	1608	4,82866E-113	-1,08120
<i>[(2)s5379]</i>	FBgn0010704	FBtr0100673	1745	3701	1,76400E-260	-1,08469
<i>kn</i>	FBgn0001319	FBtr0112809	430	912	1,19272E-64	-1,08470
<i>[(2)s5379]</i>	FBgn0010704	FBtr0077840	1745	3702	1,19135E-260	-1,08508
<i>knrf</i>	FBgn0001323	FBtr0078212	572	1215	3,69085E-86	-1,08687
<i>Bsg</i>	FBgn0261822	FBtr0079568,FBtr0079569,FBtr0079571,FBtr0079572	530	1126	6,65705E-80	-1,08714
<i>N</i>	FBgn0004647	FBtr0070507	2603	5537	0	-1,08893
<i>smg</i>	FBgn0016070	FBtr0076550	242	515	4,22397E-37	-1,08957
<i>ttn</i>	FBgn0026160	FBtr0076267	942	2005	3,33567E-142	-1,08980
<i>Gef26</i>	FBgn0021873	FBtr0300039	171	364	1,90582E-26	-1,08994
<i>CG18812</i>	FBgn0042135	FBtr0088935,FBtr0088936,FBtr0088937	394	839	4,83348E-60	-1,09048

<i>mp</i>	FBgn0260660	FBtr0301105,FBtr0301106,FBtr0301107,FBtr0301108,FBtr0301109,FBtr0301110,FBtr0301111,FBtr0301113,FBtr0301114,FBtr0306638	161	343	5,23325E-25	-1,09115
<i>cic</i>	FBgn0262582	FBtr0305030	1618	3448	1,65213E-244	-1,09155
<i>Rfabg</i>	FBgn0087002	FBtr0089188	998	2127	4,77183E-151	-1,09171
<i>Ckl1beta</i>	FBgn0002259	FBtr0307896	2782	5931	0	-1,09215
<i>CG1180</i>	FBgn0034528	FBtr0086254	686	1463	2,42496E-104	-1,09265
<i>cib</i>	FBgn0026084	FBtr0070641,FBtr0307206	10104	21574	0	-1,09437
<i>Cf2</i>	FBgn000286	FBtr0304887	546	1166	1,72396E-83	-1,09459
<i>Mmp1</i>	FBgn0035049	FBtr0306856	418	893	4,43436E-64	-1,09516
<i>Sap47</i>	FBgn0013334	FBtr0083204,FBtr0083205,FBtr0083206,FBtr0083207,FBtr0083208,FBtr0083209,FBtr0083210,FBtr0301655	897	1917	6,66569E-137	-1,09567
<i>rl</i>	FBgn0003256	FBtr0113701,FBtr0113702	334	714	2,12481E-51	-1,09608
<i>unk</i>	FBgn0004395	FBtr0305571,FBtr0305572	1040	2225	5,22280E-159	-1,09722
<i>smg</i>	FBgn0016070	FBtr0076551,FBtr0290104	242	519	8,88267E-38	-1,10073
<i>CG30343</i>	FBgn0060343	FBtr0308205	221	474	1,18113E-34	-1,10084
<i>Sdc</i>	FBgn0010415	FBtr0071706,FBtr0071707,FBtr0071705,FBtr0273206,FBtr0273207,FBtr0301557	137	294	7,93932E-22	-1,10164
<i>llm</i>	FBgn0027339	FBtr0078582,FBtr0078581	1235	2654	7,39003E-191	-1,10366
<i>CG1115</i>	FBgn0037299	FBtr0078777,FBtr0305002	169	364	5,69829E-27	-1,10692
<i>CG5059</i>	FBgn0037007	FBtr0078216,FBtr0078217,FBtr0078218,FBtr0078219	1297	2794	1,04596E-201	-1,10715
<i>CG18812</i>	FBgn0042135	FBtr0306239	380	819	1,14834E-59	-1,10786
<i>Mmp1</i>	FBgn0035049	FBtr0273263,FBtr0304005,FBtr0304008,FBtr0304009,FBtr0304010,FBtr0304011	411	888	6,48101E-65	-1,11142
<i>PMCA</i>	FBgn0259214	FBtr0304050	2618	5673	0	-1,11565
<i>dbr</i>	FBgn0067779	FBtr0078100,FBtr0306537,FBtr0306539	249	540	5,10906E-40	-1,11681
<i>zfh2</i>	FBgn0004607	FBtr0307167	1034	2245	3,41884E-164	-1,11848
<i>CG11486</i>	FBgn0035397	FBtr0072998,FBtr0072999,FBtr0073000,FBtr0073001,FBtr0073002,FBtr0073003,FBtr0072991,FBtr0072992,FBtr0113130,FBtr0113131	336	730	5,97164E-54	-1,11944
<i>akirin</i>	FBgn0082598	FBtr0302544	4432	9640	0	-1,12108
<i>grh</i>	FBgn0259211	FBtr0300539	2135	4644	0	-1,12113
<i>Pi4KIIalpha</i>	FBgn0037339	FBtr0078755,FBtr0078756,FBtr0078757	125	272	1,42300E-20	-1,12168
<i>Dsp1</i>	FBgn0011764	FBtr0089262,FBtr0289960	1923	4190	1,76311E-307	-1,12359
<i>Pdk1</i>	FBgn0020386	FBtr0072464,FBtr0072465	710	1548	3,46048E-114	-1,12451
<i>Sh3beta</i>	FBgn0035772	FBtr0302548	227	495	5,46115E-37	-1,12474
<i>mim</i>	FBgn0053558	FBtr0302577,FBtr0302578,FBtr0113470,FBtr0302035,FBtr0306614,FBtr0306615,FBtr0306616	110	240	2,01466E-18	-1,12553
<i>Nipped-B</i>	FBgn0026401	FBtr0111119,FBtr0111118	538	1175	5,24400E-87	-1,12698
<i>Eph</i>	FBgn0025936	FBtr0301285	861	1883	2,45807E-139	-1,12895
<i>sdT</i>	FBgn0261873	FBtr0308217	575	1260	9,51224E-94	-1,13179
<i>CG1115</i>	FBgn0037299	FBtr0305001	146	320	2,17364E-24	-1,13210
<i>CG9821</i>	FBgn0037636	FBtr0081931	11169	24493	0	-1,13287
<i>CG40351</i>	FBgn0040022	FBtr0113869,FBtr0113870,FBtr0113871,FBtr0302243,FBtr0302244,FBtr0302245,FBtr0302246,FBtr0302247,FBtr0302248	2333	5119	0	-1,13368
<i>PRL-1</i>	FBgn0024734	FBtr0080857,FBtr0080856	3641	8009	0	-1,13729
<i>Nipped-B</i>	FBgn0026401	FBtr0301454,FBtr0301455,FBtr0301456	528	1162	4,02952E-87	-1,13800
<i>mim</i>	FBgn0053558	FBtr0302579,FBtr0302034	159	350	9,81333E-27	-1,13833
<i>CG11266</i>	FBgn0031883	FBtr0089638,FBtr0089639,FBtr0089640	391	861	8,46007E-65	-1,13884
<i>CG40191</i>	FBgn0058191	FBtr0113825,FBtr0113826	113	249	2,42924E-19	-1,13982
<i>CG2698</i>	FBgn0037536	FBtr0308076	176	388	9,93943E-30	-1,14048
<i>CG8949</i>	FBgn0030812	FBtr0304840	1481	3271	4,99217E-245	-1,14316
<i>CG11266</i>	FBgn0031883	FBtr0089637,FBtr0089635,FBtr0089636	392	866	2,19011E-65	-1,14351
<i>Dyrk3</i>	FBgn0027101	FBtr0100404	167	369	2,25841E-28	-1,14377
<i>Dyrk3</i>	FBgn0027101	FBtr0100405	167	369	2,25841E-28	-1,14377
<i>fbt6</i>	FBgn0033609	FBtr0088179,FBtr0088180	429	949	8,63769E-72	-1,14543
<i>fs(1)h</i>	FBgn0004656	FBtr0071118,FBtr0071120,FBtr0071121,FBtr0071122	1051	2329	1,57576E-175	-1,14795
<i>CG15628</i>	FBgn0031632	FBtr0077384	846	1877	7,06022E-142	-1,14970
<i>CG40191</i>	FBgn0058191	FBtr0113827	114	253	9,37541E-20	-1,15010
<i>prominin-like</i>	FBgn0026189	FBtr0073119,FBtr0073120	965	2144	2,29549E-162	-1,15170
<i>sgg</i>	FBgn0003371	FBtr0111035,FBtr0070471,FBtr0070472,FBtr0070473,FBtr0070474,FBtr0070475,FBtr0070476,FBtr0070466,FBtr0070467,FBtr0070468,FBtr0070469,FBtr0070470,FBtr0301966,FBtr0302185	188	418	2,34799E-32	-1,15277
<i>mub</i>	FBgn0262737	FBtr0078468,FBtr0304981,FBtr0304982	2777	6185	0	-1,15525
<i>unk</i>	FBgn0004395	FBtr0084402	1094	2439	1,56421E-185	-1,15668
<i>CG6700</i>	FBgn0032305	FBtr0080187	1914	4276	0	-1,15967
<i>CG31360</i>	FBgn0051360	FBtr0083480	258	577	1,09425E-44	-1,16120
<i>Ckl1beta</i>	FBgn0002259	FBtr0073558	2904	6510	0	-1,16462
<i>Lis-1</i>	FBgn0015754	FBtr0087236,FBtr0087238,FBtr0087239,FBtr0304747	103	231	1,99239E-18	-1,16525
<i>mrj</i>	FBgn0034091	FBtr0087193,FBtr0087194,FBtr0087195,FBtr0087196,FBtr0113084,FBtr0306652,FBtr0306653	626	1405	3,59501E-108	-1,16634
<i>Bsg</i>	FBgn0261822	FBtr0079570,FBtr0079568,FBtr0079569,FBtr0079573,FBtr0079567,FBtr0079571,FBtr0079572,FBtr0079566	1757	3947	3,01030E-303	-1,16764
<i>prominin-like</i>	FBgn0026189	FBtr0073118,FBtr0306258	1979	4461	0	-1,17260
<i>CG40178</i>	FBgn0058178	FBtr0113817,FBtr0113818	373	841	1,42394E-65	-1,17293
<i>ens</i>	FBgn0035500	FBtr0073269,FBtr0073266,FBtr0073268,FBtr0073267,FBtr0073265	1535	3462	1,23333E-267	-1,17337
<i>snmRNA:838</i>	FBgn0065081	FBtr0091797	409	925	2,95653E-72	-1,17735
<i>ovo</i>	FBgn0003028	FBtr0070740,FBtr0070738,FBtr0070739,FBtr0100408	1071	2425	1,30572E-188	-1,17903
<i>mp</i>	FBgn0260660	FBtr0301958	262	594	6,42873E-47	-1,18090
<i>Parp</i>	FBgn0010247	FBtr0113885	2081	4726	0	-1,18334
<i>alpha-Man-I</i>	FBgn0259170	FBtr0300512,FBtr0299632,FBtr0299633,FBtr0300513,FBtr0300514,FBtr0300515,FBtr0300516	420	955	3,50134E-75	-1,18511
<i>CG7971</i>	FBgn0035253	FBtr0072806	258	587	1,26070E-46	-1,18599
<i>Fbp2</i>	FBgn0000640	FBtr0079808	1368	3125	3,71057E-246	-1,19179
<i>Dcp2</i>	FBgn0036534	FBtr0304975	5414	12369	0	-1,19196
<i>CG40160</i>	FBgn0058160	FBtr0301802	101	231	5,46026E-19	-1,19354
<i>ovo</i>	FBgn0003028	FBtr0301914	1839	4223	0	-1,19355

<i>Pten</i>	FBgn0026379	FBtr0089900,FBtr0089901,FBtr0089904,FBtr0089905,FBtr0300562,FBtr0301521	111	255	5,90781E-21	-1,19994
<i>Cklalpha</i>	FBgn0015024	FBtr0073681,FBtr0073682,FBtr0300380	4876	11209	0	-1,20089
<i>Atf6</i>	FBgn0033010	FBtr0086081	1218	2808	3,49403E-224	-1,20503
<i>CR42723</i>	FBgn0261640	FBtr0303010	229	528	9,01143E-43	-1,20519
<i>bun</i>	FBgn0259176	FBtr0299656	428	987	2,51707E-79	-1,20544
		FBtr0303296	3035	6999	0	-1,20545
		FBtr0301360,FBtr0301361	3035	6999	0	-1,20545
<i>rl</i>	FBgn0003256	FBtr0113699	111	256	3,92375E-21	-1,20558
<i>hth</i>	FBgn0001235	FBtr0082256,FBtr0082254,FBtr0082255,FBtr0082253,FBtr0301345,FBtr0301956	2368	5471	0	-1,20814
<i>elF5</i>	FBgn0030719	FBtr0074147,FBtr0074146,FBtr0074144,FBtr0074148,FBtr0074145,FBtr0074150	157	363	9,02092E-30	-1,20921
<i>Rbp2</i>	FBgn0262734	FBtr0074279,FBtr0074280	8054	18674	0	-1,21325
<i>CR42722</i>	FBgn0261639	FBtr0303009	239	556	1,25553E-45	-1,21807
<i>vfl</i>	FBgn0259789	FBtr0307536	917	2134	8,26687E-173	-1,21857
<i>Ank</i>	FBgn0011747	FBtr0089173	131	305	2,05851E-25	-1,21924
<i>ci</i>	FBgn0004859	FBtr0089178	725	1692	1,28452E-137	-1,22268
<i>Dyrk3</i>	FBgn0027101	FBtr0100402,FBtr0100403,FBtr0100404,FBtr0100405	403	943	2,18515E-77	-1,22648
<i>syd</i>	FBgn0024187	FBtr0076769,FBtr0300412,FBtr0300413	134	314	2,37657E-26	-1,22853
<i>par-1</i>	FBgn0260934	FBtr0086452,FBtr0086459,FBtr0086453,FBtr0086454,FBtr0086455,FBtr0086457,FBtr0086458,FBtr0100390,FBtr0086460,FBtr0301505,FBtr0301506	1462	3426	1,06454E-279	-1,22858
<i>Adar</i>	FBgn0026086	FBtr0305499	1148	2694	1,52968E-220	-1,23063
<i>CG17159</i>	FBgn0039945	FBtr0113717,FBtr0113721	702	1649	1,81151E-135	-1,23205
<i>sm</i>	FBgn0003435	FBtr0086492,FBtr0100232,FBtr0301609,FBtr0304654,FBtr0304655,FBtr0304656	125	294	8,06989E-25	-1,23389
<i>CG7115</i>	FBgn0027515	FBtr0079523	130	306	6,93494E-26	-1,23502
<i>Tsp39D</i>	FBgn0032943	FBtr0273404	1442	3405	7,33644E-281	-1,23958
<i>Zyx</i>	FBgn0011642	FBtr0089210,FBtr0089211,FBtr0089212,FBtr0089213,FBtr0089214,FBtr0089215,FBtr0089216	1261	2978	7,19690E-246	-1,23978
<i>gish</i>	FBgn0250823	FBtr0301304,FBtr0305071,FBtr0305072	1118	2644	7,94552E-219	-1,24180
<i>Asator</i>	FBgn0039908	FBtr0300342,FBtr0300344	385	912	3,84307E-76	-1,24418
<i>fwe</i>	FBgn0261722	FBtr0075543	105	250	1,28715E-21	-1,25154
<i>sdt</i>	FBgn0261873	FBtr0089978,FBtr0100376,FBtr0110334,FBtr0089975,FBtr0100375,FBtr0089974,FBtr0308218,FBtr0308219,FBtr0308220	514	1224	1,36825E-102	-1,25176
<i>CG5065</i>	FBgn0034145	FBtr0087108,FBtr0302206	154	367	2,24687E-31	-1,25285
<i>PP2A-B'</i>	FBgn0042693	FBtr0290319	321	765	1,95058E-64	-1,25289
<i>Nos</i>	FBgn0011676	FBtr0100484	472	1126	9,60926E-95	-1,25435
<i>CG2233</i>	FBgn0029990	FBtr0071123	472	1126	9,60926E-95	-1,25435
<i>ogre</i>	FBgn0004646	FBtr0071036	1819	4345	0	-1,25621
<i>cals</i>	FBgn0039928	FBtr0089207	129	310	6,39671E-27	-1,26490
<i>daily</i>	FBgn0011577	FBtr0305901	2835	6822	0	-1,26685
<i>RecQ5</i>	FBgn0027375	FBtr0075714,FBtr0075715,FBtr0100362	278	669	2,80617E-57	-1,26692
<i>sky</i>	FBgn0032901	FBtr0081442,FBtr0081443,FBtr0081444,FBtr0081446,FBtr0081447,FBtr0081440,FBtr0081441,FBtr0301961	657	1586	3,66855E-135	-1,27143
<i>norpA</i>	FBgn0262738	FBtr0100670,FBtr0070651	895	2165	7,09472E-185	-1,27441
<i>Pdk1</i>	FBgn0020386	FBtr0072470,FBtr0072471,FBtr0072466,FBtr0072467	863	2088	2,76865E-178	-1,27469
<i>CG32350</i>	FBgn0052350	FBtr0070046	1234	2989	2,67323E-255	-1,27632
<i>myoglianin</i>	FBgn0026199	FBtr0089092,FBtr0089093,FBtr0089094,FBtr0089095	1046	2537	2,74952E-217	-1,27824
<i>TBPH</i>	FBgn0025790	FBtr0089624,FBtr0089626,FBtr0089627,FBtr0301643,FBtr0301644	146	356	2,16580E-31	-1,28591
<i>Mkk4</i>	FBgn0024326	FBtr0300443	706	1722	7,66679E-149	-1,28635
<i>par-1</i>	FBgn0260934	FBtr0100391,FBtr0100392,FBtr0301504	601	1468	3,71299E-127	-1,28842
<i>ri</i>	FBgn0003256	FBtr0113700	97	237	2,94223E-21	-1,28883
<i>CdGAPr</i>	FBgn0032821	FBtr0300966	221	540	2,40085E-47	-1,28891
<i>unk</i>	FBgn0004395	FBtr0305573	1206	2953	7,19489E-256	-1,29195
<i>RpL38</i>	FBgn0040007	FBtr0111120	9077	22236	0	-1,29261
<i>Dyrk3</i>	FBgn0027101	FBtr0100402,FBtr0100406	173	424	1,83968E-37	-1,29329
<i>CR41604</i>	FBgn0085814	FBtr0114270	408	1000	2,58936E-87	-1,29336
<i>CdGAPr</i>	FBgn0032821	FBtr0300967	220	540	1,81284E-47	-1,29546
<i>bow1</i>	FBgn0004893	FBtr0077490,FBtr0077491,FBtr0077492,FBtr0307026,FBtr0307027,FBtr0307028,FBtr0307029	483	1186	1,16326E-103	-1,29601
<i>heph</i>	FBgn0011224	FBtr0085885	124	305	2,52222E-27	-1,29847
<i>CG42724</i>	FBgn0261641	FBtr0303012,FBtr0303018	119	294	1,90589E-26	-1,30485
<i>CG42724</i>	FBgn0261641	FBtr0303013,FBtr0303016	119	294	1,90589E-26	-1,30485
<i>CG17528</i>	FBgn0261387	FBtr0111276,FBtr0111275,FBtr0111277	197	487	2,37831E-43	-1,30573
<i>Mkk4</i>	FBgn0024326	FBtr0081892	735	1820	2,55020E-160	-1,30812
<i>gro</i>	FBgn0001139	FBtr0305047	1834	4562	0	-1,31467
<i>CG4502</i>	FBgn0031896	FBtr0079417	327	816	4,82499E-73	-1,31928
<i>pncr013:4</i>	FBgn0262731	FBtr0091952	409	1021	3,70007E-91	-1,31981
<i>CG4502</i>	FBgn0031896	FBtr0079416	324	809	1,79217E-72	-1,32015
<i>stai</i>	FBgn0051641	FBtr0304908	2607	6517	0	-1,32182
<i>CR41604</i>	FBgn0085814	FBtr0114271,FBtr0114272	412	1034	4,75262E-93	-1,32752
<i>CR41604</i>	FBgn0085814	FBtr0114269	411	1032	8,44174E-93	-1,32823
<i>stai</i>	FBgn0051641	FBtr0079196,FBtr0079197,FBtr0079198	2583	6490	0	-1,32917
<i>Hrb98DE</i>	FBgn0001215	FBtr0085300,FBtr0085303	83	209	2,07856E-19	-1,33232
<i>Mhcl</i>	FBgn0026059	FBtr0083231	158	399	1,10417E-36	-1,33646
<i>plexA</i>	FBgn0025741	FBtr0089224,FBtr0100296	106	268	7,41937E-25	-1,33817
<i>Marf</i>	FBgn0029870	FBtr0070908,FBtr0070910	104	264	1,00277E-24	-1,34395
<i>clumscy</i>	FBgn0026255	FBtr0081476,FBtr0110895	137	349	1,62519E-32	-1,34905
<i>zip</i>	FBgn0005634	FBtr0072399,FBtr0100466,FBtr0100467,FBtr0302572,FBtr0302573,FBtr0302574,FBtr0302575,FBtr0306576	1064	2712	1,38663E-247	-1,34986
<i>mp</i>	FBgn0260660	FBtr0308095	104	266	4,11726E-25	-1,35484
<i>CG41454</i>	FBgn0084017	FBtr0111173	78	200	4,13435E-19	-1,35845
<i>CrebA</i>	FBgn0004396	FBtr0075557	631	1618	5,28727E-149	-1,35850
<i>myoglianin</i>	FBgn0026199	FBtr0089094	294	755	5,04510E-70	-1,36066
<i>Hr46</i>	FBgn0000448	FBtr0306346	358	922	1,09639E-85	-1,36481
<i>Atf6</i>	FBgn0033010	FBtr0086079,FBtr0086080	805	2078	8,45723E-193	-1,36813
<i>Df44-R2</i>	FBgn0033744	FBtr0113075	143	370	5,37724E-35	-1,37151
<i>CG12054</i>	FBgn0039831	FBtr0305118	1490	3863	0	-1,37441
<i>CG11727</i>	FBgn0262740	FBtr0073547	733	1902	8,34279E-178	-1,37563
<i>CR41597</i>	FBgn0085810	FBtr0114264	198	514	1,42652E-48	-1,37627
<i>CG8116</i>	FBgn0037614	FBtr0300543	133	348	1,96894E-33	-1,38766

<i>hth</i>	FBgn0001235	FBtr0100454	3987	10441	0	-1,38888
<i>pho</i>	FBgn0002521	FBtr0089204,FBtr0089205	1568	4113	0	-1,39127
<i>PMCA</i>	FBgn0259214	FBtr0304046,FBtr0304047,FBtr0304048,FBtr0304049,FBtr0300554,FBtr0300555,FBtr0300556,FBtr0300557	287	753	9.53534E-72	-1,39160
<i>vn</i>	FBgn0003984	FBtr0077082	276	725	3.85431E-69	-1,39331
<i>CaMKI</i>	FBgn0016126	FBtr0089065	476	1255	9.72904E-120	-1,39865
<i>CG11266</i>	FBgn0031883	FBtr0089638,FBtr0089639,FBtr0089635	195	517	3.75925E-50	-1,40669
<i>Ptp10D</i>	FBgn0004370	FBtr0073524,FBtr0273235	718	1904	1.31837E-182	-1,40698
<i>mRpS5</i>	FBgn0044510	FBtr0111147,FBtr0111146	420	1117	7.13268E-108	-1,41117
<i>H</i>	FBgn0001169	FBtr0083915,FBtr0083916	217	580	1.01908E-56	-1,41836
<i>Nhe3</i>	FBgn0028703	FBtr0273247,FBtr0273248,FBtr0273250	162	433	1.48752E-42	-1,41837
<i>UbcD2</i>	FBgn0015320	FBtr0080115,FBtr0080116	709	1897	7.24710E-184	-1,41986
<i>CG11266</i>	FBgn0031883	FBtr0089637	195	522	3.88705E-51	-1,42058
<i>CG30343</i>	FBgn0050343	FBtr0088594	290	778	4.86016E-76	-1,42372
<i>Adar</i>	FBgn0026086	FBtr0070299,FBtr0070300,FBtr0100557,FBtr0307895,FBtr0305498	151	411	3.84228E-41	-1,44459
<i>pUf68</i>	FBgn0028577	FBtr0072708,FBtr0072710,FBtr0300418	95	260	1.49000E-26	-1,45251
<i>bw</i>	FBgn0000241	FBtr0072117	126	345	5.22632E-35	-1,45317
<i>A2bp1</i>	FBgn0052062	FBtr0305093,FBtr0305096	1273	3499	0	-1,45871
<i>CG32709</i>	FBgn0052709	FBtr0305288	68	187	1.71352E-19	-1,45943
<i>Cam</i>	FBgn0000253	FBtr0088001,FBtr0088002	8477	23442	0	-1,46747
<i>sky</i>	FBgn0032901	FBtr0081445	276	764	1.75575E-77	-1,46890
<i>crq</i>	FBgn0015924	FBtr0078087	603	1670	1.00872E-168	-1,46962
<i>Galp449B</i>	FBgn0004435	FBtr0087829,FBtr0087830	334	930	8.17659E-95	-1,47738
<i>CG41520</i>	FBgn0087011	FBtr0114111,FBtr0114112,FBtr0302581,FBtr0302582	140	390	3.62801E-40	-1,47805
<i>tal-1A</i>	FBgn0259730	FBtr0299997	364	1015	1.24397E-103	-1,47947
<i>tal-2A</i>	FBgn0259731	FBtr0299998	364	1015	1.24397E-103	-1,47947
<i>tal-3A</i>	FBgn0259732	FBtr0299999	364	1015	1.24397E-103	-1,47947
<i>tal-AA</i>	FBgn0259733	FBtr0299996	364	1015	1.24397E-103	-1,47947
<i>CadN</i>	FBgn0015609	FBtr0081016,FBtr0081015,FBtr0100313,FBtr0100315	152	424	8.51733E-44	-1,47999
<i>CG32856</i>	FBgn0052856	FBtr0083239,FBtr0302551	86	240	4.48799E-25	-1,48063
<i>pho</i>	FBgn0002521	FBtr0089204	121	338	3.94237E-35	-1,48202
<i>Cklalpha</i>	FBgn0015024	FBtr0073680	5117	14301	0	-1,48275
<i>elF-4B</i>	FBgn0020660	FBtr0113680	78	218	7.65373E-23	-1,48278
<i>AP-1gamma</i>	FBgn0030089	FBtr0071295,FBtr0071297,FBtr0071298,FBtr0112965	84	235	1.47814E-24	-1,48420
<i>heph</i>	FBgn0011224	FBtr0300268,FBtr0300269	173	484	5.90781E-50	-1,48424
<i>pncr013:4</i>	FBgn0262731	FBtr0303019,FBtr0303020,FBtr0303021	168	471	1.11139E-48	-1,48727
<i>Df31</i>	FBgn0022893	FBtr0085919,FBtr0085920	29123	81808	0	-1,49008
<i>Df31</i>	FBgn0022893	FBtr0100293	29264	82324	0	-1,49219
<i>CG11727</i>	FBgn0262740	FBtr0300733	554	1561	9.18083E-161	-1,49451
<i>how</i>	FBgn0017397	FBtr0084177	1467	4160	0	-1,50371
<i>CaMKI</i>	FBgn0016126	FBtr0089066	67	190	1.87120E-20	-1,50377
<i>Zyx</i>	FBgn0011642	FBtr0089210,FBtr0089213	160	457	2.71772E-48	-1,51412
<i>qkr58E-3</i>	FBgn0022984	FBtr0290254	859	2461	6.85726E-258	-1,51851
<i>Dyrk3</i>	FBgn0027101	FBtr0100406	461	1324	1.91524E-139	-1,52206
<i>Akap200</i>	FBgn0027932	FBtr0079665	112	324	6.47659E-35	-1,53250
<i>how</i>	FBgn0017397	FBtr0301401	1394	4049	0	-1,53834
<i>Mitf</i>	FBgn0263112	FBtr0307326,FBtr0307327,FBtr0307329,FBtr0307330	172	501	5.31867E-54	-1,54240
<i>Ptp10D</i>	FBgn0004370	FBtr0073525,FBtr0073522	323	942	4.79061E-101	-1,54419
<i>gus</i>	FBgn0026238	FBtr0089755,FBtr0089752,FBtr0089754,FBtr0089757,FBtr0089753,FBtr0089756	457	1339	4.93461E-144	-1,55089
<i>lin19</i>	FBgn0015509	FBtr0088846	108	317	9.87245E-35	-1,55345
<i>slow</i>	FBgn0035539	FBtr0073291	84	247	3.17946E-27	-1,55605
<i>Zyx</i>	FBgn0011642	FBtr0089211,FBtr0089216	161	474	1.25213E-51	-1,55783
<i>gish</i>	FBgn0250823	FBtr0083262,FBtr0083261,FBtr0083265,FBtr0083264,FBtr0100332,FBtr0100333	783	2311	4.43206E-250	-1,56143
<i>Zyx</i>	FBgn0011642	FBtr0089212,FBtr0089215	161	476	3.08894E-52	-1,56390
<i>Mbs</i>	FBgn0005536	FBtr0112850,FBtr0112851,FBtr0112852,FBtr0301472,FBtr0301473,FBtr0301575,FBtr0308213,FBtr0308214,FBtr0308215,FBtr0308216	453	1340	1.62726E-145	-1,56465
<i>Antp</i>	FBgn0260642	FBtr0081654,FBtr0081655	340	1009	4.03823E-110	-1,56932
<i>linx2</i>	FBgn0027108	FBtr0071005,FBtr0071006	13280	39521	0	-1,57336
<i>qkr58E-3</i>	FBgn0022984	FBtr0307214	909	2715	2.23244E-297	-1,57860
<i>zip</i>	FBgn0005634	FBtr0072398	1395	4169	0	-1,57944
<i>Cam</i>	FBgn0000253	FBtr0304963,FBtr0304964	8960	26840	0	-1,58281
<i>Hr46</i>	FBgn0000448	FBtr0306345	706	2122	4.88718E-234	-1,58768
<i>shi</i>	FBgn0003392	FBtr0111036,FBtr0111037,FBtr0074118,FBtr0074119,FBtr0074121,FBtr0074122,FBtr0301597	432	1300	8.43643E-144	-1,58941
<i>CR43241</i>	FBgn0262886	FBtr0306297	91	274	7.23096E-31	-1,59024
<i>CG40228</i>	FBgn0063670	FBtr0113841	600	1813	3.02493E-201	-1,59534
<i>CG8500</i>	FBgn0037754	FBtr0082139	143	433	9.14005E-49	-1,59835
<i>Akap200</i>	FBgn0027932	FBtr0079665,FBtr0079667	5576	16929	0	-1,60219
<i>Akap200</i>	FBgn0027932	FBtr0079664,FBtr0079666	5576	16932	0	-1,60245
<i>Zyx</i>	FBgn0011642	FBtr0089210,FBtr0089213,FBtr0089215	199	605	4.20877E-68	-1,60417
<i>Dyb</i>	FBgn0033739	FBtr0087930,FBtr0087929,FBtr0100298,FBtr0305077	199	608	9.41844E-69	-1,61130
<i>CG40196</i>	FBgn0058196	FBtr0113831	176	538	7.09221E-61	-1,61203
<i>unc-13</i>	FBgn0025726	FBtr0089245	210	644	5.21925E-73	-1,61667
<i>lin19</i>	FBgn0015509	FBtr0088845	99	304	5.74404E-35	-1,61857
<i>CG42258</i>	FBgn0259143	FBtr0299558,FBtr0299559	372	1149	1.20900E-130	-1,62700
<i>CG15923</i>	FBgn0038814	FBtr0113254	676	2089	4.11093E-237	-1,62772
<i>pAbp</i>	FBgn0261619	FBtr0086740	525	1627	2.16402E-185	-1,63182
<i>Zyx</i>	FBgn0011642	FBtr0089211,FBtr0089212,FBtr0089214,FBtr0089216	225	702	8.38688E-81	-1,64155
<i>unc-13</i>	FBgn0025726	FBtr0089246,FBtr0089247	210	658	3.30170E-76	-1,64770
<i>CG17528</i>	FBgn0261387	FBtr0111274	72	227	5.86429E-27	-1,65662
<i>CG17698</i>	FBgn0040056	FBtr0111168,FBtr0111167	298	941	1.49195E-109	-1,65888
<i>mt-Cyt-b</i>	FBgn0013678	FBtr0100884	10582	33560	0	-1,66513
<i>CG11266</i>	FBgn0031883	FBtr0089639,FBtr0089635	62	197	1.30601E-23	-1,66786
<i>spz4</i>	FBgn0032362	FBtr0305261	55	175	3.34641E-21	-1,66985
<i>Ckl1beta</i>	FBgn0000259	FBtr0073562	58	185	2.16939E-22	-1,67340
<i>CG17715</i>	FBgn0041004	FBtr0111247	465	1491	1.33298E-175	-1,68098
<i>CG17683</i>	FBgn0262115	FBtr0111301	116	374	8.00901E-45	-1,68891
<i>CrebA</i>	FBgn0004396	FBtr0075558	1076	3520	0	-1,70990
<i>qkr54B</i>	FBgn0022987	FBtr0306248	550	1804	3.30019E-217	-1,71370

<i>Hr46</i>	FBgn0000448	FBtr0088366,FBtr0088368,FBtr0112799,FBtr0302438	563	1848	1,26810E-222	-1,71476
<i>pnocr13:4</i>	FBgn0262731	FBtr0303020	52	171	2,41338E-21	-1,71741
<i>CG17715</i>	FBgn0041004	FBtr0111249	640	2109	7,61203E-255	-1,72042
<i>clumsy</i>	FBgn0026255	FBtr0081476	44	145	2,87485E-18	-1,72048
<i>sgg</i>	FBgn0003371	FBtr0070475,FBtr0070476,FBtr0301966	1077	3564	0	-1,72648
		FBtr0082858	11411	37797	0	-1,72785
<i>sgg</i>	FBgn0003371	FBtr0070471,FBtr0070472,FBtr0070473,FBtr0070466,FBtr0070468,FBtr0070469,FBtr0070470	1085	3607	0	-1,73310
<i>mt:Coll</i>	FBgn0013676	FBtr0100868	24108	80212	0	-1,73431
<i>Pabp2</i>	FBgn0005648	FBtr0088786	136	462	6,85597E-58	-1,76429
<i>CG12567</i>	FBgn0039958	FBtr0113704,FBtr0113705,FBtr0300702,FBtr0300703,FBtr0300704	386	1316	2,79252E-164	-1,76949
<i>CG9894</i>	FBgn0031453	FBtr0077713,FBtr0077714,FBtr0307080	1577	5391	0	-1,77337
<i>myoglianin</i>	FBgn0026199	FBtr0089095	77	267	2,47473E-34	-1,79391
<i>Pdp1</i>	FBgn0016694	FBtr0076776,FBtr0076777,FBtr0300499,FBtr0306535	76	265	2,51395E-34	-1,80192
<i>Pur-alpha</i>	FBgn0022361	FBtr0089996,FBtr0089995,FBtr0089994,FBtr0089993	389	1363	1,89792E-174	-1,80894
<i>Cyp6g1</i>	FBgn0025454	FBtr0087992	69	243	1,02594E-31	-1,81629
<i>pallidin</i>	FBgn0036192	FBtr0300097,FBtr0300725,FBtr0300726	80	282	7,27341E-37	-1,81762
<i>CaMKII</i>	FBgn0004624	FBtr0089218,FBtr0089219,FBtr0089217	438	1545	9,24175E-199	-1,81860
<i>CaMKII</i>	FBgn0004624	FBtr0100146,FBtr0100147,FBtr0100148,FBtr0300378	438	1546	5,50608E-199	-1,81954
<i>CG17683</i>	FBgn0262115	FBtr0111298,FBtr0111299	68	244	2,17454E-32	-1,84327
<i>Mnt</i>	FBgn0023215	FBtr0307278,FBtr0301823	588	2113	4,46420E-276	-1,84540
<i>Nrg</i>	FBgn0002968	FBtr0071207,FBtr0071209,FBtr0301762,FBtr0301764,FBtr0305914	955	3445	0	-1,85093
<i>elF4G</i>	FBgn0023213	FBtr0089243,FBtr0112904	120	435	7,55305E-58	-1,85798
<i>gish</i>	FBgn0250823	FBtr0083263	845	3086	0	-1,86871
<i>elF4G</i>	FBgn0023213	FBtr0289951	120	439	8,85716E-59	-1,87119
<i>CaMKII</i>	FBgn0016126	FBtr0089067	131	484	2,69554E-65	-1,88544
<i>CaMKII</i>	FBgn0016126	FBtr0089069	53	198	1,99656E-27	-1,90144
<i>tlk</i>	FBgn0086899	FBtr0299580,FBtr0299582,FBtr0301659	44	165	5,18156E-23	-1,90689
<i>piwi</i>	FBgn0004872	FBtr0080166	38	143	5,90831E-20	-1,91194
<i>UBL3</i>	FBgn0026076	FBtr0074175	54	204	2,24984E-28	-1,91754
<i>elF4B</i>	FBgn0020660	FBtr0113679	123	469	8,35145E-65	-1,93093
<i>mt:Col</i>	FBgn0013674	FBtr0100861	38379	146749	0	-1,93496
<i>Antp</i>	FBgn0260642	FBtr0081647,FBtr0081648,FBtr0081649,FBtr0081650,FBtr0081651,FBtr0081652,FBtr0081653,FBtr0081656	485	1855	2,26490E-255	-1,93536
		FBtr0076660	582	2241	4,0709E-310	-1,94505
<i>Fas3</i>	FBgn0000636	FBtr0081051,FBtr0081052	1972	7762	0	-1,97677
<i>kn</i>	FBgn0001319	FBtr0087465,FBtr0112810,FBtr0301400	146	575	2,00160E-81	-1,97759
<i>Eph</i>	FBgn0025936	FBtr0089082,FBtr0089083,FBtr0089084	310	1229	2,62596E-174	-1,98714
<i>Ank</i>	FBgn0011747	FBtr0089174	117	465	1,75090E-66	-1,99072
<i>grk</i>	FBgn0001137	FBtr0079708	85	338	1,74675E-48	-1,99149
<i>plexA</i>	FBgn0025741	FBtr0089225,FBtr0089226,FBtr0089223	144	573	6,82466E-82	-1,99247
<i>CG2316</i>	FBgn0039890	FBtr0089148	33	132	1,62356E-19	-2
<i>CG32016</i>	FBgn0052016	FBtr0089229	80	321	2,16540E-46	-2,00450
<i>CG8419</i>	FBgn0031999	FBtr0079589	100	404	1,44467E-58	-2,01436
<i>lola</i>	FBgn0005630	FBtr0089365,FBtr0089347,FBtr0089361,FBtr0089360,FBtr0089366,FBtr0089355,FBtr0089354,FBtr0089346,FBtr0089345,FBtr0089364	128	518	6,20061E-75	-2,01681
<i>Galpha49B</i>	FBgn0004435	FBtr0304955	828	3452	0	-2,05973
<i>CG17715</i>	FBgn0041004	FBtr0111244,FBtr0111246,FBtr0111245,FBtr0111248,FBtr0306550,FBtr0306551	142	593	1,14625E-87	-2,06214
<i>Eph</i>	FBgn0025936	FBtr0089086	257	1076	6,00570E-159	-2,06584
<i>Ank</i>	FBgn0011747	FBtr0089172	29	122	8,17736E-19	-2,07276
<i>Mnt</i>	FBgn0023215	FBtr0307277,FBtr0301822	646	2748	0	-2,08878
<i>Rbp1-like</i>	FBgn0030479	FBtr0073790	233	997	8,48509E-150	-2,09726
<i>CG9894</i>	FBgn0031453	FBtr0307080	3611	15511	0	-2,10282
<i>swi2</i>	FBgn0034262	FBtr0086889	66	284	3,01724E-43	-2,10535
<i>Ank</i>	FBgn0011747	FBtr0089173,FBtr0089171,FBtr0089172,FBtr0300497,FBtr0300498	99	429	2,47363E-65	-2,11548
<i>CG9894</i>	FBgn0031453	FBtr0077713,FBtr0077714	2522	11197	0	-2,15047
<i>H</i>	FBgn0001169	FBtr0083914,FBtr0083917	426	1911	1,96911E-296	-2,16540
<i>CG17471</i>	FBgn0039924	FBtr0100543	53	241	3,07592E-38	-2,18497
<i>CG17471</i>	FBgn0039924	FBtr0100544	52	238	5,01616E-38	-2,19438
<i>Hr39</i>	FBgn0261239	FBtr0081480	209	966	2,89772E-153	-2,20852
<i>pnocr13:4</i>	FBgn0262731	FBtr0303019	75	351	1,52964E-56	-2,22651
<i>CG32016</i>	FBgn0052016	FBtr0089233	90	424	2,16374E-68	-2,23607
<i>mt:Coll</i>	FBgn0013675	FBtr0100863	6779	32317	0	-2,25315
<i>CG10006</i>	FBgn0036461	FBtr0113171	26	124	1,12738E-20	-2,25376
<i>CG10417</i>	FBgn0033021	FBtr0086092	71	341	6,05536E-56	-2,26388
<i>pnocr13:4</i>	FBgn0262731	FBtr0091952,FBtr0303019,FBtr0303020,FBtr0303021	39	190	1,40467E-31	-2,28445
<i>CG32016</i>	FBgn0052016	FBtr0089232	63	307	7,74506E-51	-2,28481
<i>CR43241</i>	FBgn0262886	FBtr0306296	30	149	2,98909E-25	-2,31228
<i>Pdp1</i>	FBgn0016694	FBtr0076775,FBtr0076776,FBtr0076777,FBtr0076780,FBtr0076782,FBtr0300499,FBtr0300500	120	608	1,55930E-102	-2,34104
<i>Galpha49B</i>	FBgn0004435	FBtr0087829,FBtr0087830,FBtr0087831,FBtr0087833,FBtr0087834,FBtr0304954	481	2445	0	-2,34573
<i>Pdp1</i>	FBgn0016694	FBtr0306535	122	623	1,68750E-105	-2,35235
<i>myoglianin</i>	FBgn0026199	FBtr0089092,FBtr0089093	70	373	5,15266E-65	-2,41375
<i>Hr39</i>	FBgn0261239	FBtr0081479,FBtr0081481	593	3193	0	-2,42881
<i>CG2225</i>	FBgn0032957	FBtr0304885	87	476	5,94596E-84	-2,45187
<i>CG2316</i>	FBgn0039890	FBtr0089147	25	140	1,36617E-25	-2,48543
<i>Pabp2</i>	FBgn0005648	FBtr0088785	918	5443	0	-2,56784
<i>how</i>	FBgn0017397	FBtr0100514	21	128	1,99577E-24	-2,60768
<i>pAbp</i>	FBgn0261619	FBtr0086743,FBtr0086739	201	1240	5,79967E-233	-2,62507
<i>pAbp</i>	FBgn0261619	FBtr0086738	201	1240	5,79967E-233	-2,62507
<i>ventrally-expressed-protein-D</i>	FBgn0053200	FBtr0307213	27	167	5,16887E-32	-2,62882
<i>CG2316</i>	FBgn0039890	FBtr0089146	17	108	3,98726E-21	-2,66742
<i>CG40196</i>	FBgn0058196	FBtr0113829,FBtr0113830,FBtr0301121	40	258	6,03165E-50	-2,68930
<i>UBL3</i>	FBgn0026076	FBtr0074174,FBtr0300787	82	533	5,23642E-103	-2,70044
<i>CG10417</i>	FBgn0033021	FBtr0086091	74	485	2,98528E-94	-2,71239
<i>CG7367</i>	FBgn0031976	FBtr0306002	49	323	3,43181E-63	-2,72068
<i>CG7367</i>	FBgn0031976	FBtr0301128	69	460	5,56643E-90	-2,73697
<i>CG3999</i>	FBgn0037801	FBtr0082225	20	135	5,58658E-27	-2,75489

CR30055	FBgn0050055	FBtr0303919	13	90	2,25888E-18	-2,79141
E2f	FBgn0011766	FBtr0084118	82	569	1,82339E-113	-2,79473
spo	FBgn0003486	FBtr0077130	12	91	2,20890E-19	-2,92283
mt:tRNA:Y	FBgn0013710	FBtr0100860	12	96	9,13081E-21	-3
CG15406	FBgn0031517	FBtr0077580	17	149	3,68354E-33	-3,13171
pncr013:4	FBgn0262731	FBtr0303020,FBtr0303021	65	623	1,52988E-141	-3,28072
TpnC25D	FBgn0031692	FBtr0079063	18	178	2,61405E-41	-3,30581
Act5C	FBgn0000042	FBtr0070822,FBtr0100662,FBtr0100663	709	7183	0	-3,34073
CG8979	FBgn0033669	FBtr0088052	31	316	2,36749E-73	-3,34958
CG32016	FBgn0052016	FBtr0089234	21	217	7,63743E-51	-3,36923
mt:tRNA:L:UUR	FBgn0013699	FBtr0100862	9	95	1,35926E-22	-3,39993
mt:ND4	FBgn0262952	FBtr0100879	1109	11843	0	-3,41670
CG32016	FBgn0052016	FBtr0089230,FBtr0089231	12	133	3,91783E-32	-3,47032
CG12990	FBgn0030859	FBtr0074479	18	226	3,04199E-56	-3,65025
mt:ND5	FBgn0013684	FBtr0100877	1906	26146	0	-3,77797
mt:ND3	FBgn0013681	FBtr0100870	57	871	1,88953E-226	-3,93364
CG9259	FBgn0032913	FBtr0081464	13	232	8,41808E-63	-4,15754
mt:tRNA:C	FBgn0013690	FBtr0100859	8	144	3,09840E-39	-4,16993
Zyx	FBgn0011642	FBtr0089214	14	255	2,89275E-69	-4,18707
Zyx	FBgn0011642	FBtr0089213,FBtr0089215,FBtr0089216	14	257	6,47050E-70	-4,19827
Zyx	FBgn0011642	FBtr0089210,FBtr0089211,FBtr0089212	14	257	6,47050E-70	-4,19827
CG10505	FBgn0034612	FBtr0071619	7	146	6,57442E-41	-4,38247
mt:ATPase6	FBgn0023672	FBtr0100867	1667	36678	0	-4,45959
mt:tRNA:W	FBgn0013709	FBtr0100858	5	112	6,96342E-32	-4,48543
mt:tRNA:G	FBgn0013694	FBtr0100869	5	115	7,21270E-33	-4,52356
CG15155	FBgn0032669	FBtr0081048	3	85	3,48753E-25	-4,82443
Fst	FBgn0037724	FBtr0082101	11	374	4,24785E-112	-5,08746
mt:ND1	FBgn0013679	FBtr0100886	268	9585	0	-5,16047
CG3264	FBgn0034712	FBtr0071781	10	399	7,96223E-122	-5,31832
CG7882	FBgn0033047	FBtr0085966	2	81	4,83172E-25	-5,33985
mt:lrRNA	FBgn0013686	FBtr0100888	21890	975604	0	-5,47795
Mur18B	FBgn0030999	FBtr0074672	4	182	1,75026E-56	-5,50779
CG40351	FBgn0040022	FBtr0302243	2	93	4,43424E-29	-5,53916
mt:ATPase8	FBgn0013673	FBtr0100866	290	16433	0	-5,82440
CG11892	FBgn0039313	FBtr0089644	4	235	1,72731E-74	-5,87652
CG11892	FBgn0039313	FBtr0089645	4	235	1,72731E-74	-5,87652
mt:srRNA	FBgn0013688	FBtr0100890	6	357	3,71141E-113	-5,89482
mt:ND2	FBgn0013680	FBtr0100857	74	5273	0	-6,15495
CG40351	FBgn0040022	FBtr0113870,FBtr0113871	2	147	1,97588E-47	-6,19967
CG40351	FBgn0040022	FBtr0302248	1	75	2,36728E-24	-6,22882
CG40351	FBgn0040022	FBtr0113869,FBtr0302244	1	75	2,36728E-24	-6,22882
mt:tRNA:L:CUN	FBgn0013698	FBtr0100887	14	1386	0	-6,62936
mt:ND6	FBgn0013685	FBtr0100883	33	3640	0	-6,78533
CG3292	FBgn0034710	FBtr0071783	4	462	1,82753E-152	-6,85175
mt:ND4L	FBgn0013683	FBtr0100890	19	2698	0	-7,14975
Muc11A	FBgn0052656	FBtr0089803	2	378	4,55348E-127	-7,56224
CG42235	FBgn0250757	FBtr0290139	0	104	5,31274E-36	-Infinity
CG10513	FBgn0039311	FBtr0114505	0	78	5,38516E-27	-Infinity
CG16727	FBgn0038719	FBtr0083780	0	386	3,41807E-134	-Infinity
CG17752	FBgn0038718	FBtr0083779	0	157	2,05423E-54	-Infinity
CG14292	FBgn0038658	FBtr0083725	0	55	4,66333E-19	-Infinity
CG42235	FBgn0250757	FBtr0290140	0	92	7,66522E-32	-Infinity
CG42235	FBgn0250757	FBtr0290137,FBtr0290138,FBtr0290139,FBtr0290140,FBtr0290141	0	121	6,66973E-42	-Infinity
mt:tRNA:P	FBgn0013702	FBtr0100882	0	62	1,79899E-21	-Infinity
CG10514	FBgn0039312	FBtr0084864	0	132	9,98338E-46	-Infinity

Supplementary Table 7: Genes de-regulated in *sd::Gal4>UAS::FH-cortoCD* vs *sd::Gal4/+* and *sd::Gal4>UAS::RpL12-Myc* vs *sd::Gal4/+*.

Genes up-regulated in <i>sd::Gal4>UAS::FH-cortoCD</i> wing discs	Genes up-regulated in <i>sd::Gal4>UAS::RpL12-Myc</i> wing discs	Shared up-regulated genes	Genes down-regulated in <i>sd::Gal4>UAS::FH-cortoCD</i> wing discs	Genes down-regulated in <i>sd::Gal4>UAS::RpL12-Myc</i> wing discs	Shared down-regulated genes
14-3-3zeta	7SLRNA:CR32864	7SLRNA:CR32864	A2bp1	4EHP	A2bp1
7SLRNA:CR32864	7SLRNA:CR42652	7SLRNA:CR42652	Act5C	A2bp1	Act5C
7SLRNA:CR42652	Aats-ala	Act57B	Adar	Act5C	Adar
Abi	Aats-glupro	Act5C	Akap200	Adar	Akap200
Act57B	Act57B	Aldh-III	akirin	Akap200	akirin
Act5C	Act5C	Arc-p20	Ank	akirin	Ank
Actn	Ahcy13	Arp11	Antp	ajph	Antp
Aldh-III	Aldh-III	asnj	AP-1gamma	alpha-Man-I	AP-1gamma
Arc-p20	alphaTry	ATPsyn-d	Att6	Ank	Att6
Ar79F	Arc-p20	B52	bow1	Antp	bow1
Arp11	Arp11	Beta5	Bsg	AP-1gamma	Bsg
asnj	ash2	betaTub56D	bun	Asator	bun
ATPsyn-Cf6	asnj	bou	bw	Att6	bw
ATPsyn-d	ATPsyn-b	br	CadN	bbg	CadN
awd	ATPsyn-d	brat	cals	bow1	cals
B52	B52	bim	Cam	Bsg	Cam
Bet5	Bet5	Bruce	CaMKI	bun	CaMKI
betaTub56D	betaTy	btsz	CaMKII	bw	CaMKII
bou	betaTub56D	capt	Cf2	CadN	Cf2
br	blot	Cctgamma	CG10006	cals	CG10006
brat	blw	CG10320	CG10417	Cam	CG10417
bim	EIM-4(-SPARC)	CG10527	CG10505	CaMKI	CG10505
Bruce	bou	CG11151	CG10513	CaMKII	CG10513
btsz	br	CG11438	CG10514	CdGAPr	CG10514
capt	brat	CG11505	CG1115	Cf2	CG1115
Cchi	bim	CG11854	CG11180	CG10006	CG11180
Cctgamma	Bruce	CG11873	CG11266	CG10417	CG11266
CG10320	btsz	CG11876	CG11486	CG10505	CG11486
CG10418	capt	CG11943	CG11727	CG10513	CG11727
CG10527	Cct5	CG11999	CG11892	CG10514	CG11892
CG10664	Cctgamma	CG12203	CG12054	CG1115	CG12054
CG11015	CG10249	CG12859	CG12567	CG11180	CG12567
CG11151	CG10320	CG13044	CG12990	CG11266	CG12990
CG11267	CG10527	CG13185	CG13025	CG11486	CG13025
CG11438	CG10912	CG13319	CG14135	CG11727	CG15923
CG11455	CG11151	CG13349	CG14526	CG11892	CG16727
CG11505	CG11438	CG13393	CG15923	CG12054	CG17471
CG11699	CG11505	CG1354	CG16727	CG12567	CG17528
CG11752	CG11854	CG13551	CG17471	CG12990	CG17683
CG11753	CG11873	CG13630	CG17528	CG13025	CG17698
CG11854	CG11876	CG13731	CG17683	CG13360	CG17715
CG11873	CG11943	CG14184	CG17698	CG14292	CG17752
CG11876	CG11999	CG14235	CG17715	CG14464	CG2225
CG11943	CG12115	CG14302	CG17752	CG15155	CG2233
CG11999	CG12125	CG14332	CG2187	CG15406	CG30343
CG12203	CG12203	CG14566	CG2225	CG15535	CG32016
CG12384	CG12859	CG15523	CG2233	CG15628	CG3264
CG12432	CG13044	CG1607	CG30343	CG15923	CG3292
CG12848	CG13185	CG16936	CG32016	CG16727	CG3999
CG12859	CG13319	CG17202	CG3264	CG17159	CG40196
CG12935	CG13323	CG1746	CG3292	CG17471	CG40351
CG13041	CG13324	CG1753	CG3999	CG17490	CG41520
CG13044	CG13349	CG18809	CG40196	CG17528	CG42235
CG13053	CG13393	CG2021	CG40351	CG17683	CG42258
CG13185	CG1354	CG2200	CG41520	CG17698	CG4502
CG13319	CG13551	CG2310	CG42235	CG17715	CG4662
CG13349	CG13630	CG2812	CG42258	CG17752	CG4768
CG13364	CG13731	CG30025	CG4502	CG17883	CG5059
CG13393	CG14184	CG30031	CG4662	CG18812	CG5065
CG1354	CG14235	CG30185	CG4768	CG2225	CG6700
CG13551	CG14302	CG30410	CG5059	CG2233	CG7115
CG13630	CG14332	CG30415	CG5065	CG2316	CG7367
CG13731	CG14566	CG30499	CG5958	CG2698	CG7882
CG13751	CG14619	CG32038	CG6357	CG30343	CG7971
CG13926	CG15044	CG3214	CG6700	CG31121	CG8116
CG13993	CG15523	CG3321	CG7115	CG31360	CG8419
CG14057	CG15818	CG33333	CG7367	CG32016	CG8500
CG14104	CG1607	CG34227	CG7882	CG32350	CG8979
CG14184	CG1620	CG34306	CG7971	CG3264	CG9259
CG14235	CG16936	CG34347	CG8116	CG32709	CG9894
CG14302	CG1702	CG34383	CG8419	CG32856	cib
CG14332	CG17121	CG34417	CG8500	CG3292	Cklalpha
CG14482	CG17202	CG34422	CG8745	CG3999	Cklbeta
CG14566	CG1746	CG3446	CG8979	CG40160	CR41597
CG14997	CG1753	CG3500	CG9259	CG40178	CR42722
CG15012	CG18809	CG3609	CG9894	CG40191	CR42723
CG15237	CG1943	CG3731	cib	CG40196	CR43241
CG15523	CG2021	CG42238	Cklalpha	CG40228	CrebA
CG1607	CG2200	CG42455	Cklbeta	CG40351	cirq
CG16936	CG2310	CG42497	CR41597	CG41454	Cyp6g1
CG1707	CG2812	CG42500	CR42722	CG41520	dbp
CG17202	CG30025	CG42574	CR42723	CG42235	Dcp2
CG17343	CG30031	CG42834	CR43241	CG42258	Df31
CG17374	CG30185	CG4692	CrebA	CG42342	Dsp1
CG1746	CG30410	CG5021	cirq	CG42724	Dyb
CG17508	CG30415	CG5261	Cyp6g1	CG4502	Dyrk3
CG1753	CG30499	CG5446	dbp	CG4612	E2f
CG17680	CG31676	CG5527	Dcp2	CG4662	eIF-4B
CG17776	CG31789	CG5548	Df31	CG4768	eIF5
CG18343	CG31937	CG5794	Dsp1	CG5059	Eph
CG18809	CG32038	CG5903	Dyb	CG5065	eyg
CG1969	CG3214	CG5938	Dyrk3	CG6084	Fas3

CG2021	CG32249	CG5941	E2f	CG6091	Fbp2
CG2200	CG32302	CG6543	eIF-4B	CG6700	Fst
CG2310	CG32529	CG6746	eIF5	CG7115	fwe
CG2812	CG33156	CG6793	Eph	CG7337	Galpha49B
CG2862	CG3321	CG7267	eyg	CG7367	Gef26
CG30025	CG33333	CG7414	Fas3	CG7668	gish
CG30031	CG33346	CG7580	Fbp1	CG7882	grk
CG30185	CG34227	CG7637	Fbp2	CG7971	gro
CG30410	CG34306	CG7834	Fst	CG8116	gus
CG30415	CG34347	CG8036	fwe	CG8419	H
CG30423	CG34383	CG8184	Galpha49B	CG8500	heph
CG30499	CG34417	CG8191	Gef26	CG8949	how
CG31126	CG34422	CG8664	gish	CG8979	Hr39
CG31548	CG3446	CG9027	grk	CG9259	Hr46
CG32038	CG3500	CG9065	gro	CG9821	hth
CG32069	CG3523	CG9205	Gs1	CG9894	inx2
CG3214	CG3609	CG9350	gus	ci	kn
CG32212	CG3731	CG9603	H	cib	l(2)s5379
CG32276	CG42238	CG9674	heph	cic	lin19
CG3321	CG42455	CG9775	HmgZ	Cklalpha	lola
CG33333	CG42497	cher	how	Cklbeta	Mbs
CG34227	CG42500	cic	Hr39	clumysy	Mncl
CG34242	CG42574	CoVa	Hr46	CR30055	Mitf
CG34250	CG42669	Cpr49Ag	Hsc70-3	CR41597	Mkk4
CG34306	CG42834	CR12628	hth	CR41604	Mnt
CG34347	CG4542	CR31144	inx2	CR42722	mj
CG34383	CG4692	CR33222	kn	CR42723	mRps5
CG34417	CG4769	CR34335	l(2)s5379	CR43241	mt.ATPase6
CG34422	CG5021	CR40502	lin19	CrebA	mt.ATPase8
CG34439	CG5261	CR40546	lola	crq	mt.Col
CG3446	CG5446	CR40560	lola	Csk	mt.Coll
CG3500	CG5527	CR40596	Lsd-1	csw	mt.CollI
CG3560	CG5548	CR40639	Mbs	Cyp6g1	mt.Cyt-b
CG3566	CG5794	CR40640	Mncl	dally	mt.tlRNA
CG3609	CG5903	CR40641	Mitf	dbp	mt.ND1
CG3621	CG5938	CR40642	Mkk4	Dcp2	mt.ND2
CG3625	CG5941	CR40668	Mnt	Df31	mt.ND3
CG3731	CG6543	CR40677	mj	Dh44-R2	mt.ND4
CG4036	CG6746	CR40728	mRps5	Dsp1	mt.ND4L
CG42238	CG6769	CR40766	mt.ATPase6	Dyb	mt.ND5
CG42239	CG6793	CR41535	mt.ATPase8	Dyrk3	mt.ND6
CG42377	CG6933	CR41539	mt.Col	E2f	mt.srRNA
CG42455	CG7267	CR41540	mt.Coll	eIF-4a	mt.tRNA:C
CG42497	CG7414	CR41544	mt.CollI	eIF-4B	mt.tRNA:G
CG42500	CG7465	CR41548	mt.Cyt-b	eIF4G	mt.tRNA:L:CUN
CG42574	CG7580	CR41583	mt.tlRNA	eIF5	mt.tRNA:L:UUR
CG42834	CG7637	CR41602	mt.ND1	ens	mt.tRNA:P
CG4692	CG7834	CR41609	mt.ND2	Eph	mt.tRNA:W
CG5021	CG7953	CR41613	mt.ND3	ewg	mt.tRNA:Y
CG5261	CG8036	mt.ND4	mt.ND4	eyg	Muc11A
CG5446	CG8111	mt.ND4L	mt.ND4L	Fas3	Mur18B
CG5527	CG8184	mt.ND5	mt.ND5	fbf6	myoglianin
CG5548	CG8191	mt.ND6	mt.ND6	Fbp2	nimC2
CG5569	CG8193	mt.srRNA	mt.srRNA	fs(1)h	Nipped-B
CG5703	CG8399	mt.tRNA:C	mt.tRNA:C	Fst	Nos
CG5794	CG8661	mt.tRNA:G	mt.tRNA:G	fwe	Nrg
CG5903	CG8664	mt.tRNA:L:CUN	mt.tRNA:L:CUN	Galpha49B	ogre
CG5938	CG8997	mt.tRNA:L:UUR	mt.tRNA:L:UUR	Gef26	pAbp
CG5941	CG9027	mt.tRNA:P	mt.tRNA:P	gish	Pabp2
CG6543	CG9065	mt.tRNA:W	mt.tRNA:W	grh	pallidin
CG6746	CG9172	mt.tRNA:Y	mt.tRNA:Y	grk	par-1
CG6793	CG9205	Muc11A	Muc11A	gro	Parp
CG6878	CG9331	Mur18B	Mur18B	gus	Pdk1
CG6891	CG9350	myoglianin	myoglianin	H	Pdp1
CG7181	CG9436	nimC2	nimC2	Haspin	pho
CG7267	CG9603	Nipped-B	Nipped-B	heph	PI4K1alpha
CG7414	CG9674	Nos	Nos	how	plexA
CG7580	CG9775	Nrg	Nrg	Hr39	PMCA
CG7603	cher	ogre	ogre	Hr46	pncr013:4
CG7630	chic	pAbp	pAbp	Hrb98DE	PRL-1
CG7637	cic	Pabp2	Pabp2	hth	prominin-like
CG7834	CoVa	pallidin	pallidin	imp	Ptp10D
CG8036	cp309	par-1	par-1	inx2	Pur-alpha
CG8184	Cpr49Ag	Parp	Parp	itp	qkr54B
CG8191	CR12628	Pdk1	Pdk1	jim	qkr58E-3
CG8204	CR31144	Pdp1	Pdp1	kn	R
CG8206	CR33222	pho	pho	knf	Rbp1-like
CG8664	CR34335	PI4K1alpha	PI4K1alpha	l(2)s5379	Rbp2
CG8891	CR40502	plexA	plexA	lin19	RecQ5
CG9027	CR40546	PMCA	PMCA	Lis-1	Rfabg
CG9034	CR40560	pncr013:4	pncr013:4	lola	Sap47
CG9065	CR40596	PRL-1	PRL-1	Marf	Scm
CG9205	CR40639	prominin-like	prominin-like	mask	Sdc
CG9240	CR40640	Ptp10D	Ptp10D	Mbs	sdt
CG9336	CR40641	Pur-alpha	Pur-alpha	Mhcl	sgg
CG9350	CR40642	qkr54B	qkr54B	mim	Sh3beta
CG9603	CR40668	qkr58E-3	qkr58E-3	Mitf	Sh3beta
CG9669	CR40677	R	R	Mkk4	shn
CG9674	CR40728	Rbp1-like	Rbp1-like	Mmp1	sky
CG9775	CR40766	Rbp2	Rbp2	Mnt	stai
cher	CR41535	RecQ5	RecQ5	mp	swi2
cic	CR41539	Rfabg	Rfabg	mj	syd
cl	CR41540	Sap47	Sap47	mRps21	tal-1A
CoVa	CR41544	Scm	Scm	mRps5	tal-2A
Cpr49Ag	CR41548	Sdc	Sdc	mt.ATPase6	tal-3A
Cpr49Ah	CR41583	sdt	sdt	mt.ATPase8	tal-AA
Cpr65Ec	CR41602	sgg	sgg	mt.Col	TBPH
Cpr66D	CR41609	Sh3beta	Sh3beta	mt.Coll	tna
Cpr78E	CR41613	shi	shi	mt.CollI	TpnC25D
CR12628	CycG	shy	shy	mt.Cyt-b	UbcD2
CR31144	Cyp4e2	stai	stai	mt.tlRNA	UBL3
CR33222	Cyt-b5	swi2	swi2	mt.tRNA	unk
CR34335	deltaTry	syd	syd	mt.ND1	ventrally-expressed-protein-D
				mt.ND2	vn

CR40469	Dhc64C	mRpl33	tal-1A	mt:ND3	zip
CR40502	dikar	mRpl49	tal-2A	mt:ND4	Zyx
CR40546	Doa	mRpl52	tal-3A	mt:ND4L	
CR40560	dom	mRps16	tal-AA	mt:ND5	
CR40596	dp	Msp-300	TBPH	mt:ND6	
CR40621	Dph5	N	tna	mt:siRNA	
CR40639	Dpy-30L1	nej	TotA	mt:tRNA:C	
CR40640	dro2	nocte	TpnC25D	mt:tRNA:G	
CR40641	Ef1beta	NP15.6	tup	mt:tRNA:L:CUN	
CR40642	Ef2b	Obp56d	UbcD2	mt:tRNA:L:UUR	
CR40668	EFTuM	Obp83g	UBL3	mt:tRNA:P	
CR40677	eIF-2alpha	obst-B	unk	mt:tRNA:W	
CR40728	eIF-3p40	olf186-F	ventrally-expressed-protein-D	mt:tRNA:Y	
CR40766	fabp	osa	vn	mub	
CR40959	faf	Oscp	zip	Muc11A	
CR40963	Fer1HCH	p16-ARC	Zyx	Mur18B	
CR41535	ft	pck		myoglianin	
CR41539	fu12	pcx		N	
CR41540	futsch	Pdsw		Nedd4	
CR41544	fwd	PHGPx		Nhe3	
CR41548	fzo	pix		nimC2	
CR41583	gammaTry	poe		Nipped-B	
CR41602	glo	Pros29		norpA	
CR41609	Got2	Rack1		Nos	
CR41613	hang	Rbcn-3A		Nrg	
CR43334	HERC2	RFeSP		ogre	
Cyp4g1	Hsc70-4	rg		ovo	
Cyp	Hsp26	rhea		pAbp	
Cy-b5	Hsp60	RNaseMRP:RNA		Pabp2	
deltaTry	Hsp68	RNaseP:RNA		pallidin	
Dhc64C	Hsp70Aa	mo		par-1	
dikar	Hsp70Ab	Roc1a		Parp	
Doa	Hsp70Ba	Rpl115		Patronin	
dom	Hsp70Bb	Rpl10Ab		Pdk1	
dp	Hsp70Bbb	Rpl11		Pdp1	
Dsp1	Hsp70Bc	Rpl12		pho	
Ef2b	Ing3	Rpl13		P4K11alpha	
eIF-3p40	Jon25Bi	Rpl13A		piwi	
Elongin-C	Jon25Bii	Rpl17		Pkn	
fabp	Jon65Aiii	Rpl18		plexA	
fd68A	Jon65Aiv	Rpl18A		PMCA	
f.	kek5	Rpl24		pnci013:4	
futsch	kis	Rpl26		PP2+-E'	
fwd	ksh	Rpl27		PRL-1	
gammaTry	kst	Rpl28		prominin-like	
glo	I(1)G0230	Rpl29		Pten	
Got2	I(1)G0334	Rpl3		Ptp10D	
GstD1	I(2)03659	Rpl31		pUf68	
GstS1	I(2)03709	Rpl32		Pur-alpha	
hang	I(2)35Di	Rpl34a		qkr54B	
HERC2	I(2)tid	Rpl34b		qkr58E-3	
hoip	lap	Rpl35		R	
HP4	LBR	Rpl35A		Ranbp16	
Hsc70-4	Lcp1	Rpl36		Rbp1-like	
Hsp26	Lcp2	Rpl36A		Rbp2	
Hsp60	Lcp3	Rpl37A		RecQ5	
Hsp68	Lcp4	Rpl40		Rfabg	
Hsp70Aa	levy	Rpl8		r1	
Hsp70Ab	LRP1	Rpl9		Rpl38	
Hsp70Ba	m2	RpLP1		Sap47	
Hsp70Bb	mamo	Rps10b		Scm	
Hsp70Bbb	mask	Rps11		Sdc	
Hsp70Bc	Mdn1	Rps12		sdt	
HSPC300	MED14	Rps13		sgg	
ldh	Megalin	Rps14a		Sh3beta	
janA	Mgstl	Rps14b		shi	
Jon25Bi	Mhc	Rps15		sky	
Jon65Aiii	Mi-2	Rps15Ab		slow	
Jon65Aiv	Mical	Rps17		sm	
kek5	MrgBP	Rps18		smg	
kis	mRpl22	Rps19a		snmRNA:838	
ksh	mRpl27	Rps20		spo	
I(1)G0230	mRpl33	Rps21		spz4	
I(1)G0255	mRpl35	Rps23		stai	
I(2)35Di	mRpl49	Rps26		Stik	
I(2)37Cg	mRpl52	Rps3		swi2	
I(2)eff	mRps16	Rps30		syd	
lap	mRps29	Rps4		tal-1A	
LBR	mRps35	Rps5a		tal-2A	
Lcp1	Mrf	Rps6		tal-3A	
Lcp2	Msp-300	Rps7		tal-AA	
Lcp3	Mur29B	Rps8		Tao-1	
Lcp4	N	Rps9		TBPH	
levy	nej	rut		tlk	
Lin29	nocte	scu		tna	
LRP1	NP15.6	sea		TpnC25D	
m2	Obp56d	shot		Tsp39D	
malpha	Obp83g	skpA		Tsp42Ea	
mamo	obst-B	sls		UbcD2	
mask	olf186-F	Smr		UBL3	
Megalin	osa	Sod		unc-13	
mei-P26	Oscp	spen		unk	
Mgstl	p16-ARC	sta		ventrally-expressed-protein-D	
Mhc	pck	stan		vfl	
Mi-2	pcx	Taf10		vn	
Mical	Pdsw	Tao-1		vtd	
Mic2	Pglym78	Ten-a		Wnt4	
mRpl17	Phae1	Ten-m		zfh2	
mRpl18	PHGPx	Tfb1		zip	
mRpl22	pix	TfIIA-S		Zyx	
mRpl27	poe	Tim10			
mRpl33	Ppox	Tom7			
mRpl42	proPO-A1	Tpi			

<i>mRpL48</i>	<i>Pros29</i>	<i>trol</i>
<i>mRpL49</i>	<i>Prosalpha5</i>	<i>trx</i>
<i>mRpL51</i>	<i>px</i>	<i>Trxr-1</i>
<i>mRpL52</i>	<i>r</i>	<i>tuti</i>
<i>mRpL55</i>	<i>Rack1</i>	<i>tweek</i>
<i>mRpS11</i>	<i>raptor</i>	<i>tyf</i>
<i>mRpS14</i>	<i>Rbcn-3A</i>	<i>uif</i>
<i>mRpS16</i>	<i>RFesP</i>	<i>Updo</i>
<i>Msp-300</i>	<i>rg</i>	<i>vfi</i>
<i>N</i>	<i>rhea</i>	<i>Vha68-2</i>
<i>Neb-cGP</i>	<i>RNaseMRP:RNA</i>	<i>vnc</i>
<i>nej</i>	<i>RNaseP:RNA</i>	<i>vsg</i>
<i>nocte</i>	<i>rno</i>	<i>w</i>
<i>Not1</i>	<i>Roc1a</i>	<i>yip7</i>
<i>NP15.6</i>	<i>Rpl15</i>	<i>zormin</i>
<i>Nurf-38</i>	<i>Rpl10Ab</i>	<i>zye</i>
<i>Nxt1</i>	<i>Rpl11</i>	
<i>Obp56d</i>	<i>Rpl12</i>	
<i>Obp83g</i>	<i>Rpl13</i>	
<i>Obp99a</i>	<i>Rpl13A</i>	
<i>obst-B</i>	<i>Rpl17</i>	
<i>off186-F</i>	<i>Rpl18</i>	
<i>Or2a</i>	<i>Rpl18A</i>	
<i>osa</i>	<i>Rpl24</i>	
<i>Oscp</i>	<i>Rpl26</i>	
<i>ox</i>	<i>Rpl27</i>	
<i>p16-ARC</i>	<i>Rpl28</i>	
<i>Pcd</i>	<i>Rpl29</i>	
<i>pck</i>	<i>Rpl3</i>	
<i>Pcmt</i>	<i>Rpl31</i>	
<i>pcx</i>	<i>Rpl32</i>	
<i>PDCD-5</i>	<i>Rpl34a</i>	
<i>Pdsw</i>	<i>Rpl34b</i>	
<i>PHGPx</i>	<i>Rpl35</i>	
<i>pix</i>	<i>Rpl35A</i>	
<i>ple</i>	<i>Rpl36</i>	
<i>pncr002:3R</i>	<i>Rpl36A</i>	
<i>poe</i>	<i>Rpl37a</i>	
<i>primo-1</i>	<i>Rpl40</i>	
<i>primo-2</i>	<i>Rpl8</i>	
<i>Pros29</i>	<i>Rpl9</i>	
<i>Prosbeta1</i>	<i>RpLP1</i>	
<i>Rack1</i>	<i>RpS10b</i>	
<i>Rbcn-3A</i>	<i>RpS11</i>	
<i>Rcd4</i>	<i>RpS12</i>	
<i>RFesP</i>	<i>RpS13</i>	
<i>rg</i>	<i>RpS14a</i>	
<i>rhea</i>	<i>RpS14b</i>	
<i>RNaseMRP:RNA</i>	<i>RpS15</i>	
<i>RNaseP:RNA</i>	<i>RpS15Ab</i>	
<i>rno</i>	<i>RpS17</i>	
<i>Roc1a</i>	<i>RpS18</i>	
<i>Rpb11</i>	<i>RpS19a</i>	
<i>Rpb12</i>	<i>RpS20</i>	
<i>Rpl15</i>	<i>RpS21</i>	
<i>RpL10Ab</i>	<i>RpS23</i>	
<i>RpL11</i>	<i>RpS26</i>	
<i>RpL12</i>	<i>RpS3</i>	
<i>RpL13</i>	<i>RpS30</i>	
<i>RpL13A</i>	<i>RpS4</i>	
<i>RpL14</i>	<i>RpS5a</i>	
<i>RpL17</i>	<i>RpS6</i>	
<i>RpL18</i>	<i>RpS7</i>	
<i>RpL18A</i>	<i>RpS8</i>	
<i>RpL24</i>	<i>RpS9</i>	
<i>RpL26</i>	<i>Rpl3</i>	
<i>RpL27</i>	<i>rut</i>	
<i>RpL28</i>	<i>Sac1</i>	
<i>RpL29</i>	<i>scf</i>	
<i>RpL3</i>	<i>Scsalpha</i>	
<i>RpL30</i>	<i>scu</i>	
<i>RpL31</i>	<i>sdt</i>	
<i>RpL32</i>	<i>sea</i>	
<i>RpL34a</i>	<i>Sgs3</i>	
<i>RpL34b</i>	<i>shot</i>	
<i>RpL35</i>	<i>Sin</i>	
<i>RpL35A</i>	<i>skpA</i>	
<i>RpL36</i>	<i>sls</i>	
<i>RpL36A</i>	<i>Smr</i>	
<i>RpL37A</i>	<i>Sod</i>	
<i>RpL40</i>	<i>Sop2</i>	
<i>RpL41</i>	<i>Sp1</i>	
<i>RpL7A</i>	<i>spen</i>	
<i>RpL8</i>	<i>Spn27A</i>	
<i>RpL9</i>	<i>Spp</i>	
<i>RpLP1</i>	<i>sta</i>	
<i>RpS10b</i>	<i>stan</i>	
<i>RpS11</i>	<i>Taf10</i>	
<i>RpS12</i>	<i>Tao-1</i>	
<i>RpS13</i>	<i>Ten-a</i>	
<i>RpS14a</i>	<i>Ten-m</i>	
<i>RpS14b</i>	<i>Tfb1</i>	
<i>RpS15</i>	<i>TfIIA-L</i>	
<i>RpS15Ab</i>	<i>TfIIA-S</i>	
<i>RpS17</i>	<i>Tlg</i>	
<i>RpS18</i>	<i>Tim10</i>	
<i>RpS19a</i>	<i>Tom7</i>	
<i>RpS20</i>	<i>Tpi</i>	
<i>RpS21</i>	<i>trol</i>	
<i>RpS23</i>	<i>trx</i>	
<i>RpS26</i>	<i>Trxr-1</i>	
<i>RpS28b</i>	<i>Tsp</i>	
<i>RpS3</i>	<i>tuti</i>	

RpS30	tweek
RpS4	tyf
RpS5a	Ubp64E
RpS6	uif
RpS7	Updo
RpS8	vari
RpS9	vav
rut	verm
scu	vfi
SdhC	Vha68-2
sdk	vnc
sea	vsg
shot	w
skpA	wdb
sli	yip7
sls	zormin
SmD2	Zw
SmF	zye
Smr	
snj	
snRNA:U12:73B	
Sod	
Spase12	
Spase22-23	
spen	
sphinx	
sta	
stan	
stv	
sun	
Taf10	
Tao-1	
Ten-a	
Ten-m	
Tfb1	
TfIIA-S	
Tim10	
Tina-1	
Tom7	
Tpi	
trf	
trx	
Trx-1	
tutI	
tweek	
tyf	
uif	
Updo	
vfi	
Vha100-2	
Vha44	
Vha68-2	
vnc	
Vps28	
vsg	
w	
wb	
Wnk	
yip7	
zormin	
zye	

Supplementary Table 8: Ontology of genes up-regulated in *sd::Gal4>UAS::FH-cortoCD* vs *sd::Gal4/+*.

<i>sd::Gal4>UAS::FH-cortoCD</i>							
GO ID	Description	Category	GO CortoCD up	GO total	padj dh	Enrichment	
GO:0006412	translation	Biological process	105	511	5.33000E-59	7.13183	
GO:0007052	mitotic spindle organization	Biological process	39	209	4.87000E-19	6.47665	
GO:0000022	mitotic spindle elongation	Biological process	35	84	5.92000E-30	14.46180	
GO:0022008	neurogenesis	Biological process	29	557	8.61400E-03	1.80707	
GO:0000398	nuclear mRNA splicing, via spliceosome	Biological process	28	417	3.88092E-04	2.33053	
GO:0009408	response to heat	Biological process	23	93	8.59000E-14	8.58375	
GO:0007411	axon guidance	Biological process	21	278	6.46852E-04	2.62184	
GO:0008340	determination of adult lifespan	Biological process	20	160	8.54000E-07	4.33853	
GO:0048813	dendrite morphogenesis	Biological process	20	197	2.03000E-05	3.52368	
GO:0001666	response to hypoxia	Biological process	13	41	3.21000E-09	11.00500	
GO:0015992	proton transport	Biological process	12	40	3.01000E-08	10.41250	
GO:0006457	protein folding	Biological process	12	140	6.45273E-03	2.97499	
GO:0006120	mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone	Biological process	11	34	6.07000E-08	11.22910	
GO:0006123	mitochondrial electron transport, cytochrome c to oxygen	Biological process	9	17	1.09000E-08	18.37490	
GO:0016339	calcium-dependent cell-cell adhesion	Biological process	9	43	6.61000E-05	7.26451	
GO:0042067	establishment of ommatidial planar polarity	Biological process	8	45	5.74748E-04	6.17035	
GO:0001736	establishment of planar polarity	Biological process	8	55	2.01248E-03	5.04847	
GO:0015986	ATP synthesis coupled proton transport	Biological process	7	25	1.08471E-04	9.71830	
GO:0016458	gene silencing	Biological process	7	32	4.62982E-04	7.59242	
GO:0008587	imaginal disc-derived wing margin morphogenesis	Biological process	7	38	1.27531E-03	6.39362	
GO:0016203	muscle attachment	Biological process	7	40	1.69778E-03	6.07394	
GO:0007156	homophilic cell adhesion	Biological process	7	46	3.60910E-03	5.28169	
GO:0006122	mitochondrial electron transport, ubiquinol to cytochrome c	Biological process	6	13	2.02000E-05	16.01920	
GO:0001737	establishment of imaginal disc-derived wing hair orientation	Biological process	6	37	6.45273E-03	5.62836	
GO:0006464	protein modification process	Biological process	6	37	6.45273E-03	5.62836	
GO:0006417	regulation of translation	Biological process	5	17	1.31501E-03	10.20830	
GO:0007016	cytoskeletal anchoring at plasma membrane	Biological process	5	20	2.72343E-03	8.67706	
GO:0042066	perineurial glial growth	Biological process	4	11	2.59640E-03	12.62120	
GO:0043524	negative regulation of neuron apoptosis	Biological process	4	12	3.57898E-03	11.56940	
GO:0007519	skeletal muscle tissue development	Biological process	4	15	8.06719E-03	9.25553	
GO:0046331	lateral inhibition	Biological process	4	16	9.03428E-03	8.67706	
GO:0003735	structural constituent of ribosome	Molecular function	136	326	8.78000E-126	14.47950	
GO:0008553	hydrogen-exporting ATPase activity, phosphorylative mechanism	Molecular function	32	113	2.81000E-21	9.82888	
GO:0003779	actin binding	Molecular function	26	202	6.02000E-09	4.46739	
GO:0005214	structural constituent of chitin-based cuticle	Molecular function	21	256	2.56151E-04	2.84716	
GO:0004129	cytochrome-c oxidase activity	Molecular function	18	42	2.05000E-15	14.87500	
GO:0004364	glutathione transferase activity	Molecular function	14	66	1.48000E-07	7.36235	
GO:0005200	structural constituent of cytoskeleton	Molecular function	14	67	1.67000E-07	7.25246	
GO:0003954	NADH dehydrogenase activity	Molecular function	11	37	1.48000E-07	10.31870	
GO:0008121	ubiquinol-cytochrome-c reductase activity	Molecular function	10	18	6.75000E-10	19.28230	
GO:0008137	NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity	Molecular function	9	52	2.89676E-04	6.00719	
GO:0008010	structural constituent of chitin-based larval cuticle	Molecular function	9	61	8.08884E-04	5.12089	
GO:0042623	ATPase activity, coupled	Molecular function	9	87	8.10495E-03	3.59051	
GO:0008017	microtubule binding	Molecular function	9	88	8.18785E-03	3.54970	
GO:0004550	nucleoside diphosphate kinase activity	Molecular function	8	12	9.23000E-09	23.13880	
GO:0003713	transcription coactivator activity	Molecular function	8	44	4.95016E-04	6.31059	
GO:0003899	DNA-directed RNA polymerase activity	Molecular function	8	65	5.60861E-03	4.27178	
GO:0003993	acid phosphatase activity	Molecular function	4	15	8.06719E-03	9.25553	
GO:0005811	lipid particle	Cellular component	75	339	1.69000E-43	7.67881	
GO:0005875	microtubule associated complex	Cellular component	48	359	2.31000E-17	4.64065	
GO:0022625	cytosolic large ribosomal subunit	Cellular component	47	79	4.15000E-50	20.64920	
GO:0005737	cytoplasm	Cellular component	43	859	1.96990E-03	1.73743	
GO:0022627	cytosolic small ribosomal subunit	Cellular component	40	63	3.83000E-44	22.03700	
GO:0005840	ribosome	Cellular component	30	65	3.22000E-27	16.01920	
GO:0005739	mitochondrion	Cellular component	23	333	1.03516E-03	2.39726	
GO:0016021	integral to membrane	Cellular component	21	1302	8.18785E-03	0.55981	
GO:0005747	mitochondrial respiratory chain complex I	Cellular component	19	71	4.99000E-12	9.28812	
GO:0030532	small nuclear ribonucleoprotein complex	Cellular component	15	104	6.75000E-06	5.00599	
GO:0005762	mitochondrial large ribosomal subunit	Cellular component	14	66	1.46000E-07	7.36235	
GO:0005751	mitochondrial respiratory chain complex IV	Cellular component	13	24	1.08000E-12	18.80030	
GO:0005750	mitochondrial respiratory chain complex III	Cellular component	11	20	7.80000E-11	19.08950	
GO:0005681	spliceosomal complex	Cellular component	11	107	2.72980E-03	3.56814	
GO:0030018	Z disc	Cellular component	9	24	3.64000E-07	13.01560	
GO:0000276	mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex, coupling factor F(Cellular component	7	17	6.75000E-06	14.29160	
GO:0016589	NURF complex	Cellular component	6	21	4.01453E-04	9.91664	
GO:0005884	actin filament	Cellular component	6	29	1.96990E-03	7.18101	
GO:0005665	DNA-directed RNA polymerase II, core complex	Cellular component	6	34	4.32027E-03	6.12498	
GO:0000221	vacuolar proton-transporting V-type ATPase, V1 domain	Cellular component	6	36	5.75482E-03	5.78470	
GO:0016585	chromatin remodeling complex	Cellular component	4	9	1.18597E-03	15.42590	

Supplementary Table 9: Ontology of genes down-regulated in *sd::Gal4>UAS::FH-cortoCD* vs *sd::Gal4+*.

<i>sd::Gal4>UAS::FH-cortoCD</i>		Down-regulated genes				
GO ID	Description	Category	GO CortoCD down	GO total	padj dh	Enrichment
GO:0006468	protein phosphorylation	Biological process	39	545	1.63623E-14	4.90240
GO:0006355	regulation of transcription, DNA-dependent	Biological process	25	520	4.66378E-06	3.29365
GO:0007411	axon guidance	Biological process	16	278	7.19313E-05	3.94290
GO:0006470	protein dephosphorylation	Biological process	11	181	9.76596E-04	4.16346
GO:0007391	dorsal closure	Biological process	11	222	3.63564E-03	3.39453
GO:0000910	cytokinesis	Biological process	10	144	7.40291E-04	4.75749
GO:0007314	oocyte anterior/posterior axis specification	Biological process	8	38	2.62282E-06	14.42270
GO:0016339	calcium-dependent cell-cell adhesion	Biological process	8	43	6.15976E-06	12.74560
GO:0008045	motor axon guidance	Biological process	8	58	5.06639E-05	9.44936
GO:0007623	circadian rhythm	Biological process	8	106	1.98046E-03	5.17040
GO:0007173	epidermal growth factor receptor signaling pathway	Biological process	7	51	1.75769E-04	9.40304
GO:0016319	mushroom body development	Biological process	7	88	3.00987E-03	5.44949
GO:0048096	chromatin-mediated maintenance of transcription	Biological process	6	21	1.33277E-05	19.57370
GO:0045197	establishment or maintenance of epithelial cell apical/basal polarity	Biological process	6	37	2.67995E-04	11.10940
GO:0000122	negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	Biological process	6	81	8.93779E-03	5.07466
GO:0016325	oocyte microtubule cytoskeleton organization	Biological process	5	20	1.75769E-04	17.12700
GO:0007613	memory	Biological process	5	26	5.98728E-04	13.17460
GO:0016199	axon midline choice point recognition	Biological process	5	29	9.41246E-04	11.81170
GO:0007279	pole cell formation	Biological process	5	36	2.15059E-03	9.51498
GO:0006897	endocytosis	Biological process	5	49	6.23756E-03	6.99060
GO:0045879	negative regulation of smoothened signaling pathway	Biological process	4	19	1.99002E-03	14.42270
GO:0006471	protein ADP-ribosylation	Biological process	4	21	2.59000E-03	13.04910
GO:0016458	gene silencing	Biological process	4	32	9.28695E-03	8.56348
GO:0008284	positive regulation of cell proliferation	Biological process	4	32	9.28695E-03	8.56348
GO:0045196	establishment or maintenance of neuroblast polarity	Biological process	3	10	3.76314E-03	20.55240
GO:0010628	positive regulation of gene expression	Biological process	3	11	4.95626E-03	18.68400
GO:0008069	dorsal/ventral axis specification, ovarian follicular epithelium	Biological process	3	11	4.95626E-03	18.68400
GO:0035293	chitin-based larval cuticle pattern formation	Biological process	3	12	6.20375E-03	17.12700
GO:0046665	amnioserosa maintenance	Biological process	3	13	7.13897E-03	15.80950
GO:0006541	glutamine metabolic process	Biological process	3	13	7.13897E-03	15.80950
GO:0006508	proteolysis	Biological process	1	767	1.62465E-03	0.08932
GO:0004674	protein serine/threonine kinase activity	Molecular function	35	373	2.57122E-16	6.42835
GO:0003700	sequence-specific DNA binding transcription factor activity	Molecular function	26	570	6.38596E-06	3.12492
GO:0003677	DNA binding	Molecular function	22	720	5.29163E-03	2.09330
GO:0008137	NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity	Molecular function	19	52	2.04418E-19	25.03170
GO:0003729	mRNA binding	Molecular function	14	275	7.30575E-04	3.48767
GO:0005154	epidermal growth factor receptor binding	Molecular function	10	18	2.12265E-12	38.05990
GO:0000166	nucleotide binding	Molecular function	10	179	2.80619E-03	3.82725
GO:0008143	poly(A) RNA binding	Molecular function	9	13	2.19504E-12	47.42850
GO:0004129	cytochrome-c oxidase activity	Molecular function	9	42	4.55577E-07	14.68030
GO:0004879	ligand-dependent nuclear receptor activity	Molecular function	8	65	9.51982E-05	8.43174
GO:0004714	transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity	Molecular function	7	30	6.60813E-06	15.98520
GO:0004683	calmodulin-dependent protein kinase activity	Molecular function	6	9	5.63042E-08	45.67190
GO:0003714	transcription corepressor activity	Molecular function	6	35	2.08578E-04	11.74420
GO:0005516	calmodulin binding	Molecular function	6	53	1.61019E-03	7.75561
GO:0042393	histone binding	Molecular function	5	15	5.06639E-05	22.83600
GO:0005044	scavenger receptor activity	Molecular function	5	42	3.63564E-03	8.15570
GO:0004385	guanylate kinase activity	Molecular function	4	14	7.27467E-04	19.57370
GO:0004708	MAP kinase kinase activity	Molecular function	4	17	1.38602E-03	16.11950
GO:0008187	poly-pyrimidine tract binding	Molecular function	3	13	7.13897E-03	15.80950
GO:0005001	transmembrane receptor protein tyrosine phosphatase activity	Molecular function	3	14	8.74457E-03	14.68030
GO:0005634	nucleus	Cellular component	73	1905	6.47121E-14	2.62524
GO:0005886	plasma membrane	Cellular component	36	594	2.03122E-11	4.15199
GO:0005739	mitochondrion	Cellular component	25	333	1.35150E-09	5.14323
GO:0005811	lipid particle	Cellular component	20	339	4.01418E-06	4.04176
GO:0005921	gap junction	Cellular component	8	31	6.10760E-07	17.67940
GO:0005747	mitochondrial respiratory chain complex I	Cellular component	7	71	1.10459E-03	6.75430
GO:0045169	fusome	Cellular component	5	54	8.93779E-03	6.34332
GO:0016323	basolateral plasma membrane	Cellular component	4	16	1.10459E-03	17.12700
GO:0043186	P granule	Cellular component	4	31	8.73491E-03	8.83972

Annexe 7 : Liste de publications antérieures à la thèse.

1. *N Engl J Med*. 2005 Dec 22;353(25):2654-66.

Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer.

Pageès F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molidor R, Mlecnik B, Kirilovsky A, Nilsson M, Damotte D, Meatchi T, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Galon J.

BACKGROUND: The role of tumor-infiltrating immune cells in the early metastatic invasion of colorectal cancer is unknown.

METHODS: We studied pathological signs of early metastatic invasion (venous emboli and lymphatic and perineural invasion) in 959 specimens of resected colorectal cancer. The local immune response within the tumor was studied by flow cytometry (39 tumors), low-density-array real-time polymerase-chain-reaction assay (75 tumors), and tissue microarrays (415 tumors).

RESULTS: Univariate analysis showed significant differences in disease-free and overall survival according to the presence or absence of histologic signs of early metastatic invasion ($P < 0.001$). Multivariate Cox analysis showed that an early conventional pathological tumor-node-metastasis stage ($P < 0.001$) and the absence of early metastatic invasion ($P = 0.04$) were independently associated with increased survival. As compared with tumors with signs of early metastatic invasion, tumors without such signs had increased infiltrates of immune cells and increased levels of messenger RNA (mRNA) for products of type 1 helper effector T cells (CD8, T-BET [T-box transcription factor 21], interferon regulatory factor 1, interferon-gamma, granzyme B) but not increased levels of inflammatory mediators or immunosuppressive molecules. The two types of tumors had significant differences in the levels of expression of 65 combinations of T-cell markers, and hierarchical clustering showed that markers of T-cell migration, activation, and differentiation were increased in tumors without signs of early metastatic invasion. The latter type of tumors also had increased numbers of CD8⁺ T cells, ranging from early memory (CD45RO⁺CCR7⁺CD28⁺CD27⁺) to effector memory (CD45RO⁺CCR7⁺CD28⁻CD27⁻) T cells. The presence of high levels of infiltrating memory CD45RO⁺ cells, evaluated immunohistochemically, correlated with the absence of signs of early metastatic invasion, a less advanced pathological stage, and increased survival.

CONCLUSIONS: Signs of an immune response within colorectal cancers are associated with the absence of pathological evidence of early metastatic invasion and with prolonged survival.

2. *Science*. 2006 Sep 29;313(5795):1960-4.

Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome.

Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pageès C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoué F, Bruneval P, Cugnenc P, Trajanoski Z, Fridman WH, Pageès F.

The role of the adaptive immune response in controlling the growth and recurrence of human tumors has been controversial. We characterized the tumor-infiltrating immune cells in large cohorts of human colorectal cancers by gene expression profiling and in situ immunohistochemical staining. Collectively, the immunological data (the type, density, and location of immune cells within the tumor samples) were found to be a better predictor of patient survival than the histopathological methods currently used to stage colorectal cancer. The results were validated in two additional patient populations. These data support the hypothesis that the adaptive immune response influences the behavior of human tumors. In situ analysis of tumor-infiltrating immune cells may therefore be a valuable prognostic tool in the treatment of colorectal cancer and possibly other malignancies.

3. *J Immunol*. 2008 Oct 15;181(8):5350-9.

Activation of human peripheral IgM⁺ B cells is transiently inhibited by BCR-independent aggregation of Fc gammaRIIB.

Fournier EM, Sibénil S, Costes A, Varin A, Fridman WH, Teillaud JL, Sautès-Fridman C.

Immune complexes can trigger a SHIP-1-independent proapoptotic signal in mouse class-switched IgG(+) B cells and plasma cells by binding to Fc gammaRIIB, in the absence of concomitant coaggregation with BCR, hence regulating plasma cell survival and participating in the selection of B cells producing high affinity Abs during secondary Ab responses. By contrast, we demonstrate in the present study that the unique aggregation of Fc gammaRIIB on human peripheral IgM(+) B cells does not induce apoptosis but transiently inhibits B cell proliferation and calcium influx triggered by BCR cross-linking. Using human peripheral B cells and IIA1.6 lymphoma B cells expressing

wild-type human Fc gammaRIIB (IIA1.6-Fc gammaRIIB), we also show that the unique aggregation of human Fc gammaRIIB induces ITIM phosphorylation. This aggregation provokes the recruitment of phosphorylated SHIP-1 by Fc gammaRIIB and inhibits the constitutive phosphorylation of Akt in human IIA1.6-Fc gammaRIIB cells. This inhibitory signaling pathway is abrogated in IIA1.6 cells expressing ITIM-mutated Fc gammaRIIB (Fc gammaRIIB(Y292G)), suggesting that ITIM phosphorylation is necessary for Fc gammaRIIB-induced B cell blockade. Overall, we demonstrate that the unique aggregation of Fc gammaRIIB on human peripheral IgM(+) B cells is sufficient to transiently down-regulate their activation without inducing apoptosis. Our results suggest that Fc gammaRIIB could negatively regulate IgM(+) B cells before class-switch occurrence and that its unique engagement by immune complexes represents a reversible checkpoint for peripheral IgM(+) B cells.

4. **Cancer Res.** 2009 Mar 15;69(6):2685-93. Epub 2009 Mar 3.

Coordination of intratumoral immune reaction and human colorectal cancer recurrence.

Camus M, Tosolini M, Mlecnik B, Pagès F, Kirilovsky A, Berger A, **Costes A**, Bindea G, Charoentong P, Bruneval P, Trajanoski Z, Fridman WH, Galon J.

A role for the immune system in controlling the progression of solid tumors has been established in several mouse models. However, the effect of immune responses and tumor escape on patient prognosis in the context of human cancer is poorly understood. Here, we investigate the cellular and molecular parameters that could describe in situ immune responses in human colorectal cancer according to clinical parameters of metastatic lymph node or distant organ invasion (META- or META+ patients). Primary tumor samples of colorectal carcinoma were analyzed by integrating large-scale phenotypic (flow cytometry, 39 patients) and gene expression (real time reverse transcription-PCR, 103 patients) data sets related to immune and protumoral processes. In META- colorectal cancer primary tumors with high densities of T cells, we observed significant positive correlations between markers of innate immune cells [tumor-associated macrophages, dendritic cells, natural killer (NK) cells, and NKT cells] and markers of early-activated T cells. Significant correlations were also observed between markers of cytotoxic and effector memory T-cell subpopulations. These correlation profiles were absent in tumors with low T-cell infiltrates and were altered in META+ tumors with high T-cell infiltrates. We show that the coexpression of genes mediating cytotoxicity (GNLY) and Th1 adaptive immune responses (IRF1) accurately predicted patient survival independently of the metastatic status. High intratumoral mRNA expression of the proangiogenic mediator vascular endothelial growth factor was associated with significantly reduced survival rates in patients expressing high mRNA levels of GNLY. Investigation of the colorectal cancer primary tumor microenvironment allowed us to uncover the association of favorable outcomes with efficient coordination of the intratumoral immune response.

5. **British Journal of Cancer** (Accepted 18 Apr 2012)

FADD protein release mirrors the development and aggressiveness of human non-small-cell lung cancer

Yann Cimino*, **Anne Costes***, Diane Damotte, Pierre Validire, Sylvie Mistou, Nicolas Cagnard, Marco Alifano, Jean-François Regnard, Gilles Chiocchia, Catherine Sautès-Fridman, Léa Tourneur.

BACKGROUND: The need to unfold the underlying mechanisms of lung cancer aggressiveness, the deadliest cancer in the world, is of prime importance. Because FADD is the key adaptor molecule transmitting the apoptotic signal delivered by death receptors, we studied the presence and correlation of intra- and extracellular FADD protein with development and aggressiveness of non-small-cell lung cancer (NSCLC).

METHODS: Fifty NSCLC patients were enrolled in this prospective study. Intracellular FADD was detected in patients' tissue by immunohistochemistry. Tumors and distant non tumoral lung biopsies were cultured through trans-well membrane in order to analyse extracellular FADD. Correlation between different clinical/histological parameters with level/localisation of FADD protein has been investigated.

RESULTS: FADD could be specifically downregulated in tumoral cells and FADD loss correlated with the presence of extracellular FADD. Indeed, human NSCLC released FADD protein, and tumoral samples released significantly more FADD than non tumoral tissue ($P = 0.000003$). FADD release by both tumoral and non tumoral tissue increased significantly with the cancer stage, and was correlated with both early and late steps of the metastasis process.

CONCLUSION: FADD release by human NSCLC could be a new marker of poor prognosis as it correlates positively with both tumor progression and aggressiveness.

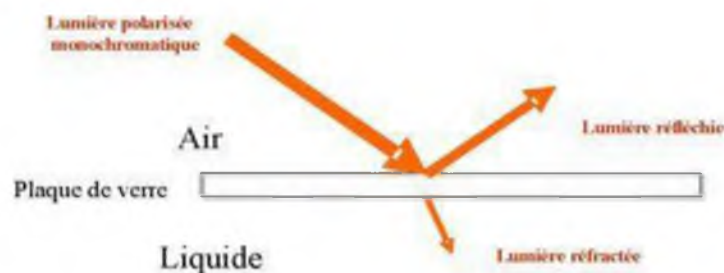
Annexe 8 : Principe de méthodes utilisées

Principe de la méthode Résonance Plasmonique de Surface (BIACORE).

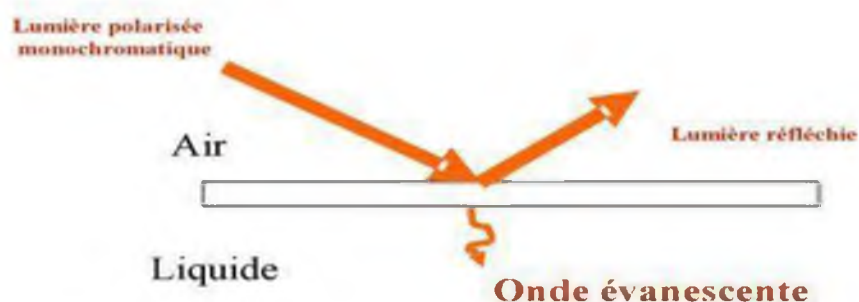
Le terme « Biacore » est généralement employé à tort puisqu'il s'agit d'une marque (comme le fameux Frigidaire) et non pas d'une technique. Le nom de la technique est la « résonance plasmonique de surface » (c'est pourquoi le terme Biacore est utilisé...).

Principe de la résonance plasmonique de surface :

Lorsqu'un faisceau de lumière polarisée monochromatique illumine une interface entre deux milieux d'indices de réfraction différents, une partie de la lumière incidente est réfléchi sur l'interface et l'autre partie est réfractée à travers la surface.

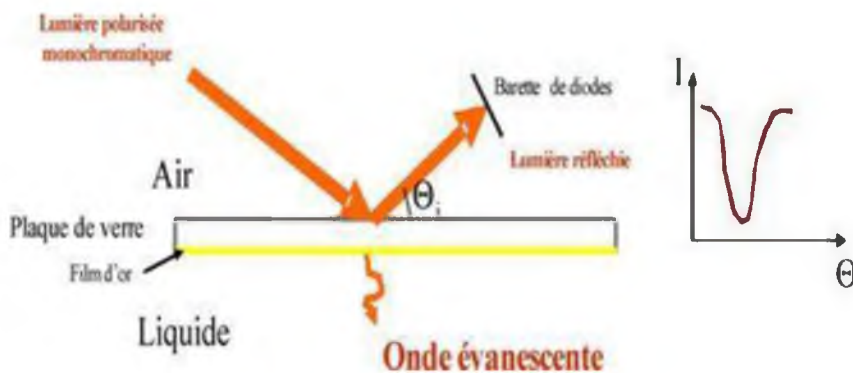


Dans des conditions de réflexion interne la lumière peut être réfléchi totalement. Cela dépend de l'angle d'incidence du faisceau lumineux. Dans ce cas l'angle de réfraction est nul. La lumière est caractérisée par différentes composantes électromagnétiques. L'une de ces composantes est l'onde évanescente qui se propage perpendiculairement à l'interface sur une distance équivalente à sa longueur d'onde.



La zone traversée par l'onde est appelée champ évanescent. Le faisceau incident est riche en photons, ces derniers peuvent entrer en résonance avec des électrons libres. L'application consiste à déposer sur l'interface une couche de métal (l'or) riche en électrons libres, ce qui

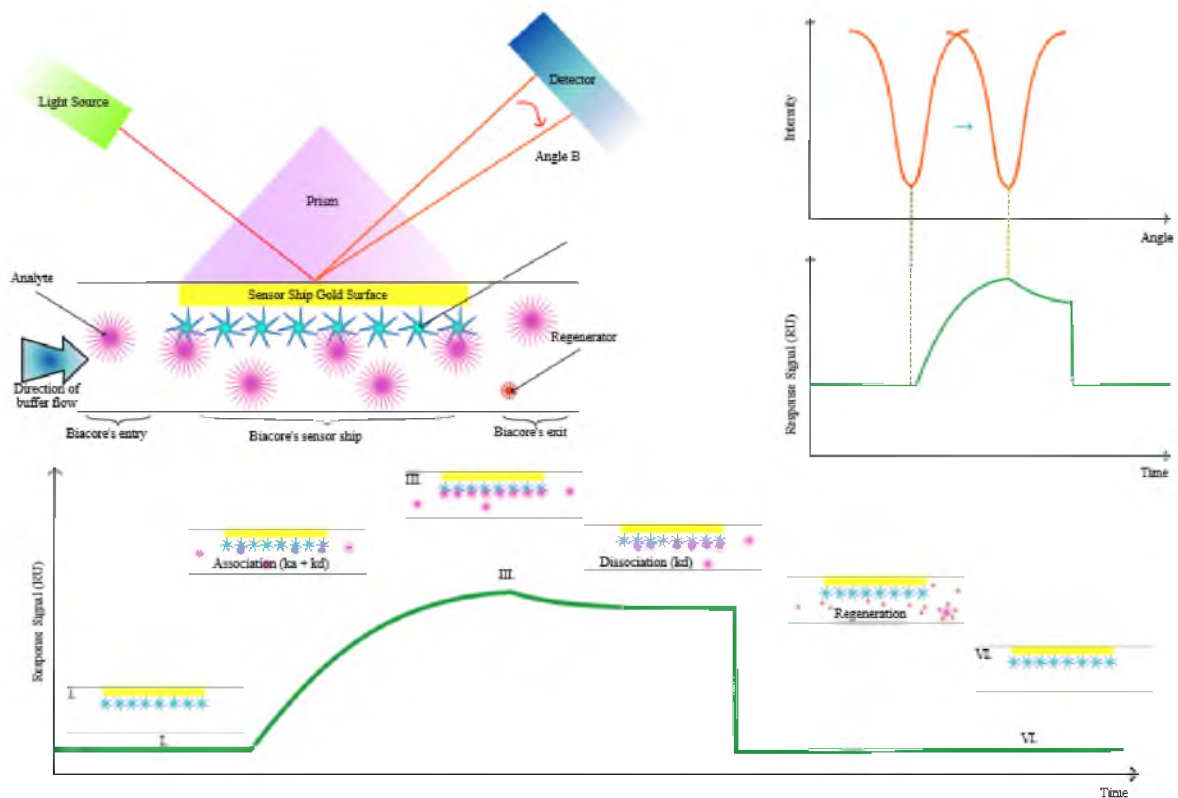
permet aux électrons libres et aux photons de rentrer en résonance. Ce phénomène est appelé résonance plasmonique de surface (SPR). Une des caractéristiques de la SPR est qu'elle dégage de l'énergie visible dans le faisceau réfléchi qui peut être transduite par des barrettes de diode. Ainsi la chute d'intensité du faisceau réfléchi peut être mesurée à travers l'enregistrement de variations d'angle de résonance. Cet angle est d'intensité minimum. Il est appelé angle de résonance.



Dans les conditions de réflexion totale, l'angle de résonance est étroitement lié à la densité du milieu. En effet, les changements dans la densité changent directement l'indice de réfraction du milieu du champ évanescent qui fait varier à son tour l'angle de résonance. En conséquence, l'enregistrement des variations de l'angle de résonance permet de visualiser les interactions en temps réel et sans marquage.

Une fine couche de métal (Or) riche en électrons, est déposée sur l'interface. Les photons de l'onde évanescente vont entrer en résonance avec les nuages électroniques du métal (plasmon). Le faisceau réfléchi va présenter une chute d'intensité avec un angle défini, l'angle de résonance. Les interactions moléculaires entre un ligand retenu sur la surface et un analyte en solution vont entraîner un changement de masse qui va modifier l'indice de réfraction du milieu et décaler la position de l'angle de résonance. La variation de l'angle de résonance est proportionnelle à la quantité d'analyte fixée sur le ligand immobilisé.

(source : <http://www.ifr83.idf.inserm.fr/page.asp?page=3763#paragraphe-55304>)



Concrètement, le ligand est fixé covalamment à la surface d'or (CortoCD, HP1CD et PC-CD dans notre étude). L'analyte en solution est injecté par la machine (différents peptides RPL12, ainsi que des peptides contrôles H3K9me3, H3K27me3, H3non méthylé...). Lors de l'injection, on observe la courbe ascendante, correspondant à l'association. En haut du pic, l'injection est terminée, le tampon d'injection sans analyte passe dans la puce et les interactions non spécifiques se dissocient, c'est l'étape de dissociation. La pente de la courbe correspond ici à la vitesse de dissociation, elle est inversement proportionnelle à l'affinité du ligand pour l'analyte. La puce est ensuite régénérée en glycine 2M pour éliminer les analytes associés au ligand et peut être réutilisée pour un autre cycle d'analyse.

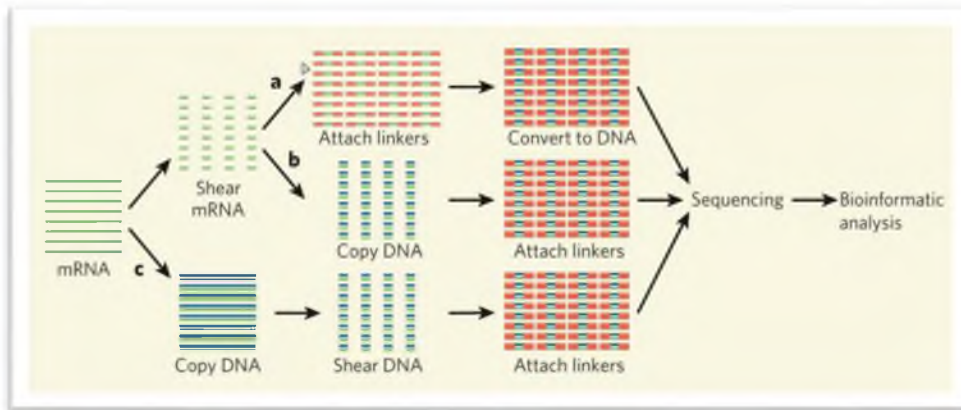


Figure 1 : préparation des bibliothèques Tiré de Graveley et al., 2008

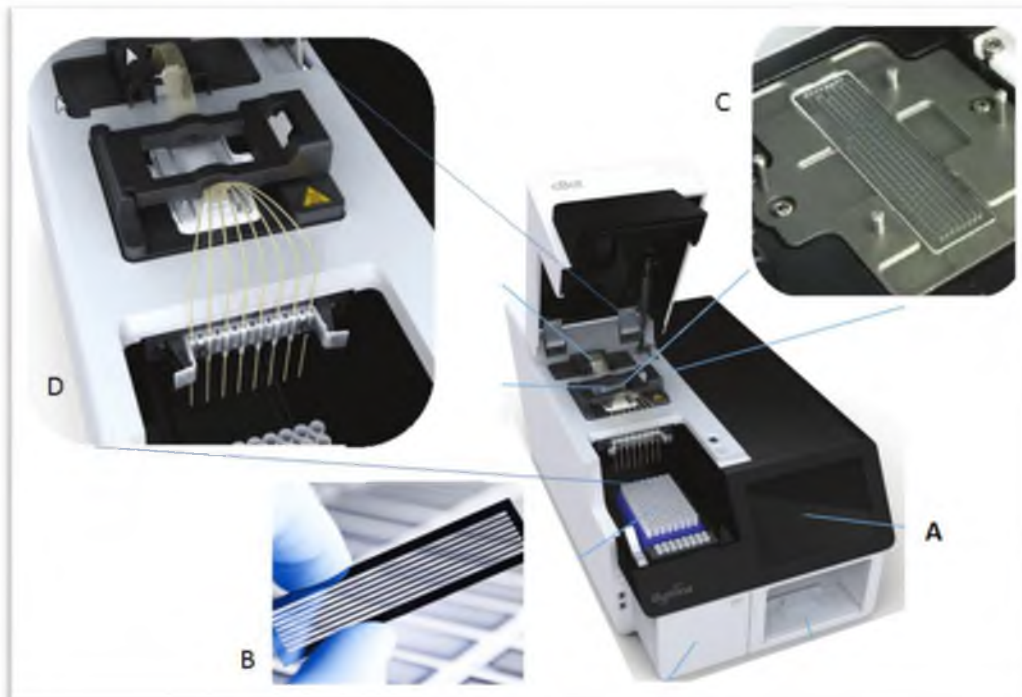


Figure 2 : c-Bot Illumina

- (A) Le robot cBot permet la génération des clusters sur la lame (flowcell)
- (B) La lame est insérée dans la chambre thermostatée
- (C) puis les bibliothèques vont être injectées sur la lame par le système d'injection
- (D) La génération de clusters à partir d'une seule molécule d'ADN est réalisée dans ce robot, elle implique l'immobilisation de la molécule et son extension vers l'extrémité 3'

Principe et méthode du RNAseq

Diverses techniques sont envisageables pour préparer les échantillons afin de les analyser par RNAseq. L'ARN total est purifié par des techniques sans solvants (qui risqueraient d'interférer avec la suite du protocole et d'en réduire le rendement), puis les ARN ribosomiques sont éliminés, soit par déplétion (kit ribominus sur principe de sondes LNA), soit par enrichissement des ARNm (purification à l'aide de billes oligo d(T) dont le rendement est moins bon mais le coût largement moins élevé). Les ARNm peuvent alors être traités de différentes manières (Figure 1), je ne développe ici que celle que nous avons suivie (b) :

Les ARN sont fragmentés par sonication ou par nébulisation. Les ARNm sont rétrotranscrits en cDNA en utilisant des random primers (b), puis les extrémités sont réparées et les adaptateurs (*linkers*) sont ajoutés. Les adaptateurs permettent l'ancrage des fragments d'ADN à séquencer sur la lame (*flowcell*) et l'identification de la librairie construite après séquençage en cas d'indexation (multiplexing) des échantillons ainsi que les primers de séquençage. Après ligation des adaptateurs, quatre cycles de PCR sont réalisés pour enrichir la librairie.

Après purification et vérification de la qualité des échantillons au Bioanalyseur (Agilent), les librairies sont déposées sur la lame à l'aide d'un robot (Figure 2).

La lame est composée de huit lignes recouvertes de paires d'oligos (Figure 3A). Les librairies sont hybridées sur la lame grâce aux adaptateurs, puis le brin complémentaire est synthétisé par une polymérase (Figure 3B). Le fragment double brin est dénaturé puis un lavage élimine le fragment d'origine et le brin néo-synthétisé est fixé covalamment à la lame (Figure 3C). L'extrémité libre du brin s'hybride à un primer adjacent sur la lame en formant un pont, puis un autre cycle de polymérisation est appliqué avant dénaturation du pont (Figure 3D). Plusieurs cycles d'amplification sont répétés jusqu'à couverture de la lame (Figure 3E). Les brins complémentaires sont clivés et éliminés par lavages successifs (Figure 3F). On génère ainsi entre 750 000 et 800 000 clusters par mm². La lame est ensuite prête à être séquencée.

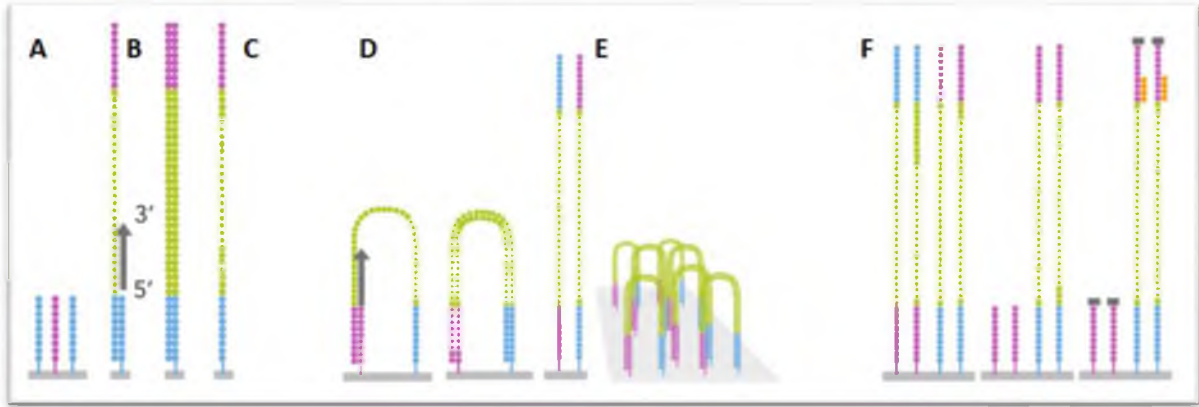


Figure 3 : Génération des clusters sur la lame

Adapté de Wang et al., 2009

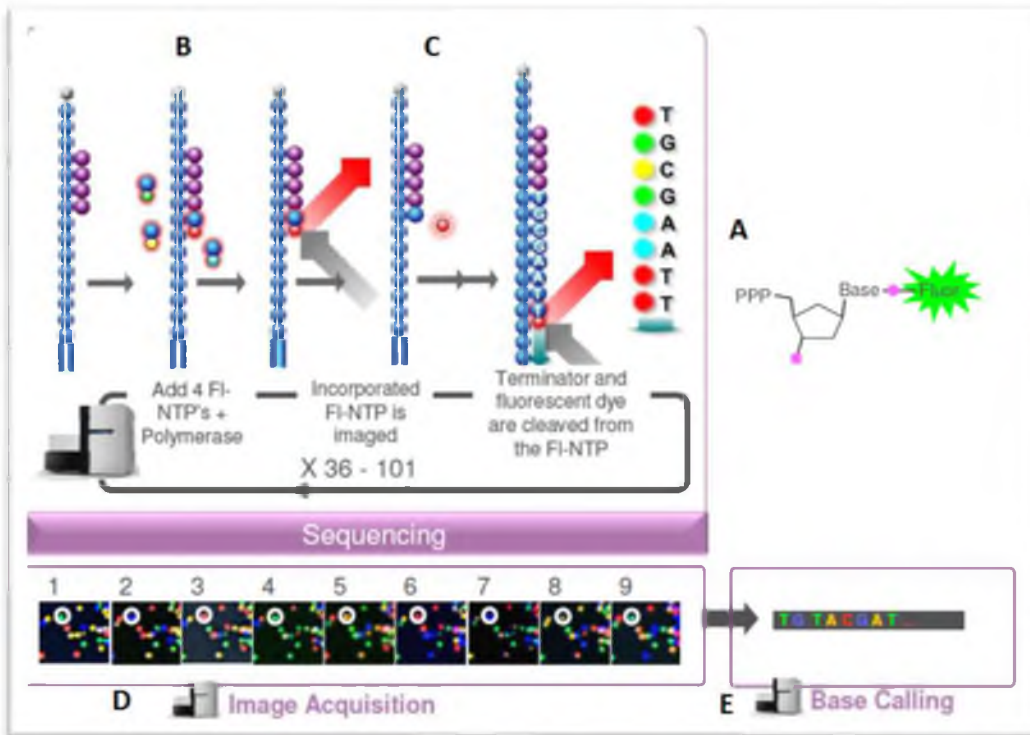


Figure 4 : Séquencage par un Hi-Seq 2000.

Adapté de <http://get.genotoul.fr>

La lame est ensuite insérée dans le HiSeq afin d'y être séquencée. Au premier cycle, les primers de PCR sont injectés afin d'amorcer le séquençage, puis à chaque cycle, les quatre types de nucléotides triphosphate couplés à un fluorophore (Fl-NTP) sont injectés simultanément (Figure 4A). L'incorporation du Fl-NTP à la chaîne nucléotidique néosynthétisée permet l'émission de sa fluorescence qui est mesurée par l'appareil (Figure 4B). Sur le Hi-Seq 2000, le temps d'acquisition de chaque cycle dure 50 minutes. Le dernier nucléotide incorporé est ensuite déprotégé, son résidu fluorescent est clivé (Figure 4C). Un autre cycle peut commencer. Le temps total de lecture est donc totalement dépendant de la taille souhaitée des fragments. Pour notre étude, nous avons séquencé en « *paired end* » sur 50 bp (séquençage des deux brins sur 50 paires de bases à partir d'une extrémité). Après chaque cycle d'acquisition d'image, le « *base calling* » (Figure 4D) permet d'identifier quel nucléotide a été ajouté et à quel endroit. Chaque cluster possède des coordonnées (x, y) sur la lame. Chaque base (A, T, G, C) est couplée à un fluorophore différent. La détection d'une couleur spécifique et donc une base, est reliée à un point de coordonnées précis. La séquence du brin est incrémentée à chaque cycle (Figure 4E).

Après séquençage, les données représentent plusieurs gigabytes. Les fichiers sont validés, démultiplexés, puis alignés sur le génome de référence, et passés au contrôle qualité par différentes méthodes de vérifications bioinformatiques (CASAVA, FastQC, ...) avant d'être utilisables par l'utilisateur. Le soutien d'une équipe bioinformatique est extrêmement appréciable pour traiter les données haut débit.

La technique de RNA-Seq permet l'analyse des ARNm mais également des transcrits alternatifs, ce que ne permettent pas les microarrays. L'analyse en paired-end facilite l'alignement des séquences, permet de détecter plus facilement les insertions/délétions et les jonctions entre les exons.